

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA**

**Raiva e encefalite viral eqüina no semiárido Nordeste,  
Brasil**

**MARIA LUANA CRISTINY RODRIGUES SILVA**

**PATOS-PB**

**2010**



Universidade Federal de Campina Grande  
Centro de Saúde e Tecnologia Rural  
Campus de Patos - PB



## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

# **Raiva e encefalite viral eqüina no semiárido Nordeste, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

**MARIA LUANA CRISTINY RODRIGUES SILVA**

Dr. Albério Antônio de Barros Gomes

**Orientador**

**PATOS-PB**

**2010**

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO  
CAMPUS DE PATOS - UFCG

S586e  
2010

Silva, Maria Luana Cristiny Rodrigues.

Raiva e encefite viral eqüina leste no semiárido nordestino, Brasil /  
Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva - Patos: CSTR/UFCG, 2010.

115p.: il.

Inclui bibliografia.

Orientador: Albério Antônio de Barros Gomes.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Centro de  
Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina  
Grande.

1 – Zoonoses virais - Dissertação. 2 – Encefalite. I – Título.

CDU: 614

Nome: SILVA, Maria Luana Cristiny Rodrigues

Título: Raiva e encefalite viral eqüina no semiárido Nordeste, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora:

**Dr. Albério Antônio de Barros Gomes**

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Instituição: UFCG/CSTR Patos-PB**

Julgamento: \_\_\_\_\_

**Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia**

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Instituição: UFRPE Recife-PE**

Julgamento: \_\_\_\_\_

**Dr. Clebert José Alves**

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Instituição: UFCG/CSTR Patos-PB**

Julgamento: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTO

**A**gradeço primeiramente a Deus por sempre está comigo em todas as horas, abençoando este momento de vitória e satisfação, e pela luz que clareia meu caminho, pois nem a altura, nem a profundidade, nem alguma criatura poderá me separar do amor de Deus.

A meus pais João Figueiredo (In memorial) e Salete Rodrigues por sempre mostrarem o caminho da honestidade, dignidade, seriedade, companheirismo e amor que nasce na simplicidade e se fortalece ao nascer do sol diariamente.

A minha irmã Layssa Ryama, meu cunhado Romero Barros e meu sobrinho Lucas Ryan pela compressão e amor a todo instante.

Aos meus familiares que sempre estiveram presente em minha vida, apoiando.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFCG/CSTR pela oportunidade.

Gostaria de demonstrar um sincero agradecimento aos professores Dr. Albério Gomes, Dr. Sérgio Santos, Dr. Franklin Riet-Correa, pelos ensinamentos, orientação, confiança, oportunidade e incentivo sempre demonstrado.

A Doutoranda Carolina Souza ao constante apoio, amizade e força pela realização do meu trabalho.

Ao Laboratório de Histopatologia pelo apoio na realização deste trabalho.

A Clínica de Grandes animais pelo apoio no atendimento dos casos.

Ao Instituto Pasteur de São Paulo representado pelas Dra. Ivanete Kotait, Dra. Luiza Carriero e a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos docentes e funcionários da UAMV/CSTR/UFCG.

Aos amigos do CSTR/UFCG, em especial Silvano, Glauco, Jefferson e Fabrine.

Aos Dr. Fumio Ito, Dr. Paulo Brandão pelo apoio.

Aos parceiros japoneses Dr. Tadeo Sakai e Dr. Takuya Itou, da Nihon University, e seus orientados.

Aos amigos do VPS/FMVZ/USP.

Ao laboratório de Virologia da UFSM, pela realização do intercâmbio entre mestrados, incluindo os professores, pós-graduandos e graduandos. Aos amigos da UFSM em especial Juliana Targino pela acolhida no período de estágio.

Aos veterinários que atenderam os animais incluídos neste estudo e aos proprietários por ter cedido estes animais.

As ULSAV, SEDESA, MAPA, ULTRA-PATOS em especial Dr. Tarcísio Maia pelo apoio.

A Secretária de Saúde da Paraíba em nome de Dr. Francisco Assis.

A ADAGRI, em nome de Dr. Joaquim.

A Dr. Humberto e equipe no Rio Grande do Norte.

A Clínica de Bovinos de Garanhuns-UFPE representada pelo Dr. José Augusto, médicos veterinários, residentes e a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

*Dedicatória*

**A** Deus, meu pai (In memorial) minha mãe, minha irmã, meu sobrinho e a todos que contribuíram para essa oportunidade.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>08</b>
<b>1.Capítulo 1. Distribuição do vírus rábico em ruminantes naturalmente infectados.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Capítulo 2. Paralytic rabies in swine .....</b>	<b>24</b>
<b>3. Capítulo 3. Eastern Equine Encephalitis in Northeastern Brazil.....</b>	<b>38</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
Anexos.....	60
Anexo 1: Declaração da Bioética.....	61
Anexo 2: Raiva paralítica em suínos. ....	63
Anexo 3: Encefalite eqüina leste no Nordeste do Brazil.....	76
Anexo 4. Normas da Pesquisa Veterinária Brasileira.....	98
Anexo 5. Normas do Brazilian Journal of Microbiology.....	100
Anexo 6. Normas da Veterinary Research.....	108



“O historiador do lado vencedor facilmente se inclina a interpretar o sucesso de curto prazo em termos de uma teologia ex post de longo prazo. Isso não acontece com os derrotados. Sua experiência básica é que tudo aconteceu diferente do esperado ou planejado [...] Eles têm uma necessidade maior de explicar por que outra coisa ocorreu e não aquilo que achavam que aconteceria. Isso pode estimular a busca de causas de médio e longo prazo que expliquem a [...] surpresa [...] gerando percepções mais duradouras e, conseqüentemente, de maior poder explicativo. No longo prazo, os ganhos em compreensão histórica têm advindo dos derrotados.”

(Koselleck, R. O presente como História. 243-255p. In: Hobsbawm, E. Sobre História. São Paulo: Companhia das Letras, 1998.)

## INTRODUÇÃO

O conhecimento da epidemiologia, sinais clínicos, patologia e o diagnóstico das enfermidades das espécies domésticas no semiárido são importantes para a implantação de programas de controle e erradicação. Na região a doença infecciosa mais importante, que afeta o sistema nervoso central é a raiva. O desenvolvimento de técnicas corretas de diagnóstico desta doença, assim como o conhecimento da sua epidemiologia permitirá desenvolver campanhas de controle mais eficientes. Nesta dissertação, seguindo a normativa do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), são apresentados dois trabalhos sobre raiva: um descrevendo os resultados de um estudo comparativo das técnicas (imunofluorescência direta, inoculação em camundongos e exame histológico) utilizadas pelo Centro de Saúde e Tecnologia Rural da UFCG no diagnóstico da doença em ruminantes e outro descrevendo a epidemiologia, sinais clínicos e patologia de um surto de raiva em suínos transmitida por morcegos hematófagos. O primeiro será enviado para publicação à Pesquisa Veterinária Brasileira e o segundo à Brazilian Journal of Microbiology.

Por outro lado, o diagnóstico diferencial das encefalites nas diferentes espécies animais é de extrema importância. Dentre essas doenças são importantes as encefalites virais dos eqüinos, que incluem as encefalites eqüinas leste, oeste e venezuelana, que apesar da sua extrema importância, por se tratar de zoonoses, têm sido pouco relatadas atualmente no nosso país, principalmente no referente a epidemiologia, sinais clínicos patologia e isolamento e identificação dos vírus. No Brasil, que apresenta características ecológicas, demográficas, sanitárias, socioeconômicas e políticas que favorecem o aparecimento de doenças emergentes e reemergentes, até o momento já foram diagnosticadas as encefalites eqüinas leste e oeste (Kotait et al., 2008). Nesta dissertação são descritos, pela primeira vez no Brasil, aspectos epidemiológicos, sinais clínicos e patologia, assim como o isolamento e caracterização molecular do vírus, em dois surtos de encefalomielite eqüina leste ocorridos nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Ceará entre os anos de 2008 e 2009. Esse trabalho a ser enviado à Veterinary Research é importante para o conhecimento e a vigilância epidemiológica das encefalites eqüinas no Brasil, principalmente levando em consideração o risco de surgimento no país da febre do Nilo Ocidental, já disseminada nos Estados Unidos e recentemente diagnosticada na Argentina (Morales et al., 2006).

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

Kotait I., Ito F. H., Carrieri M. L., Souza M. C. A. M., Peres N. F., Ferrari J. J. F., Araújo F. A. A. & Gonçalves V. L. N. 2008. Programa de Vigilância de Zoonoses e Manejo de Eqüídeos do Estado de São Paulo. Módulo II: Principais zoonoses virais de eqüídeos e vigilância epidemiológica em unidades municipais. Boletim Epidemiológico Paulista. 5 (54): 18-26.

Morales M. A., Barrandeguy M., Fabbri C., Garcia J. B., Vissani A., Trono K., utierrez G., Pigretti S., Menchaca H., Garrido N., Taylor N., Fernandez F., Levis S. & Enría D. 2006. West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina. Emerging Infectious Diseases. 12(10): 1559-1561.

*“Os problemas significativos com os quais nos deparamos não podem ser resolvidos no mesmo nível de pensamento em que estávamos quando os criamos”.*

*(ALBERT EINSTEIN, 2004).*

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da Pesquisa Veterinária Brasileira de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2009 de 04 de fevereiro de 2009, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

**Distribuição do vírus rábico no sistema nervoso central em ruminantes  
naturalmente infectados<sup>1</sup>**

Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva\*<sup>2</sup>, Glauco José Nogueira de Galiza<sup>2</sup>, Franklin  
Riet-Correa<sup>2</sup>, Sérgio Santos de Azevedo<sup>2</sup>, José Augusto Bastos Afonso<sup>3</sup>  
e Albério Antônio de Barros Gomes<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Silva M. L. C. R., Galiza G. J. N., Riet-Correa F., Azevedo S. S., Afonso J. A. B. & Gomes A. A. B. 2010. [ **Distribution of rabies vírus in the central nervous system in naturally infected ruminants**]. Distribuição do vírus rábico em herbívoros naturalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, PB 58700-000, Brazil. E-mail: [luacristiny@yahoo.com.br](mailto:luacristiny@yahoo.com.br)

With the aim to study the distribution of lesions and the rabies virus in spontaneous cases of rabies in ruminants and to determine the efficiency of the direct immunofluorescent test (DIF), mouse inoculation (MI) and presence of Negri bodies in the diagnosis of the disease, 48 cases of the disease were examined. Samples of frontal, temporal, parietal and occipital cerebral cortex, hippocampus, thalamus, rostral and caudal colliculi, cerebellum, pons, medulla oblongata, basal nuclei and sections of the cervical, thoracic and lumbar spinal cord were examined. Of the 48 samples examined all were positive on DIF and MI, and in 30 (62.5%) Negri bodies were observed. However there were differences in the results of the three tests in the different regions of the central nervous system. In the samples of the cerebral cortex in 38 cattle, the frequency of inclusion bodies was low (11%-37%), and also the positivity to DIF and MI (60%-80%). In contrast, all samples of thalamus, pons and spinal cord were positive to DIF and MI. In other regions of the brain stem, positivity to these tests varied between 60% and 96.7%. On histologic examination, the major frequency of Negri bodies (88.2%) was observed in the cerebellum. In eight sheep the DIF and MI tests were positive in all sections of the CNS examined and Negri bodies were found in three

---

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

Aceito para publicação em .....

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

<sup>2</sup> Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande. Campus de Patos. Avenida Santa Cecília, CX. P 64. CEP 58700-00, Patos, PB. \* Autora para correspondência [luacristiny@yahoo.com.br](mailto:luacristiny@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Clínica de Bovinos- Campus Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av: Bom Pastor, s/n. Caixa postal 152. Bairro Mundaú. Cep: 55.292-901.

animals. Only two goats were examined; both were positive in DIF and MI tests and in one Negri bodies were found. These results suggest that the recommendations of the Brazilian Technical Manual for Rabies of Herbivores is adequate for rabies diagnosis, because their recommendations include the histologic study and the examination of cerebellum, and sections of the brainstem with high positivity to DIF and MI tests. However, a better recommendation is to send for DIF and MI half of the brain cut longitudinally and samples of the spinal cord, which will permit to examine one or two sections, and if those are negative to return to the material and examine the rest of the sections. In contrast, to collect samples of the brain or half brain can be inappropriate for the diagnosis of other diseases of the CNS, for which the study of the whole fixed brain is necessary to recognize the symmetry or distribution of lesions. In these situations by the results obtained here, it can be recommended to send different sections of the spinal cord for DIF and MI tests and to fix the whole brain for gross and histologic examinations.

**INDEX TERMS:** rabies, immunofluorescent test, mouse inoculation, Negri bodies, laboratory diagnosis.

**RESUMO.-** Com o objetivo de identificar a distribuição das lesões e do vírus rábico no sistema nervoso central de casos espontâneos de raiva em ruminantes e comparar as técnicas de imunofluorescência direta (IFD), inoculação em camundongos (ICC) e presença de corpúsculos de Negri para o diagnóstico da doença foram analisados materiais proveniente de 48 casos de raiva, incluindo amostras de córtex frontal, temporal, parietal e occipital, hipocampo, tálamo, colículo rostral e caudal, cerebelo, ponte, medula oblonga, núcleo da base e porções da medula cervical, torácica e lombar. De 48 amostras analisadas, todas foram positivas na IFD e na ICC e em 30 (62,5%) foram encontrados corpúsculo de Negri (CN). No entanto, houve diferenças importantes no resultados dos três testes nas diferentes regiões do SNC avaliadas. Nos cortes de córtex cerebral, em 38 bovinos, a presença de corpúsculos de inclusão foi baixa (11% - 37%) assim como a positividade para IFD e ICC (60%-80%). Pelo contrário, todas as amostras de ponte, tálamo e medula testados foram positivas para IFD e ICC. Em outras regiões do tronco encefálico e também no cerebelo a positividade para ICC e IFD foi de 60% a 96,7%. No cerebelo foi encontrada a maior frequência (88,2%) de corpúsculos de inclusão. Em oito ovinos as provas de ICC e IFD foram positivas em todos os cortes

e foram observados corpúsculos de inclusão em três animais. Foram analisados somente dois casos de caprinos encontrando-se corpúsculos de inclusão em um e ambos foram positivos para IFD e ICC. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a conduta recomendada pelo Manual Técnico de Controle da Raiva dos Herbívoros (MTCRH) permite o diagnóstico de raiva associando o estudo histológico aos testes de IFD e ICC que incluem cerebelo, tálamo e tronco encefálico que apresentam alta positividade para as provas de IFD e ICC. No entanto, a melhor conduta é a de incluir metade do encéfalo cortado longitudinalmente e amostras de medula. Isto permite examinar por IFD e ICC uma ou mais regiões onde essas provas apresentam maior positividade e, posteriormente, se essas provas fossem negativas, retornar ao material original e examinar outras regiões. Por outro lado, a coleta de amostras dos locais recomendados pela MTCRH, assim com a coleta de metade do encéfalo, podem prejudicar o diagnóstico de outras doenças para o qual é necessário o estudo de todo o encéfalo após a fixação em formaldeído, para constatar a simetria e a distribuição das lesões. Nestes casos, com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode ser recomendado para diagnóstico laboratorial de raiva o envio exclusivo de porções da medula cervical, dorsal e lombar, já que as três porções apresentaram 100% de positividade nas provas de IFD e ICC. Além disso, o estudo histológico de todas as porções do cérebro incluídas neste trabalho permitirá complementar o diagnóstico.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** raiva, imunofluorescência, inoculação em camundongos, corpúsculos de Negri, diagnóstico laboratorial.

## INTRODUÇÃO

No Brasil a raiva é descrita desde 1911 (Carini 1911) e a partir de 1966 implantou-se o Plano de Combate à Raiva dos Herbívoros, atualmente denominado Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras Encefalopatias (PNCRH), que tem como objetivo diminuir a prevalência da doença nos herbívoros domésticos (Brasil 2009).

Mesmo com a implantação do Programa a raiva ainda ocorre de maneira endêmica na região do semiárido Brasileiro em diferentes espécies de animais domésticos (Gomes 2004, Lima e al. 2005). Ocorrendo também em outros estados do país (Lemos 2005, Rech 2007). São freqüentes os relatos de amostras de equinos e bovinos negativas à imunofluorescência direta (IFD) e positivas na inoculação intracerebral em camundongos (ICC) (Carrieri et al. 2006, Carvalho 2001). Vários são



os relatos de raiva animal no Brasil, no entanto são poucos os que descrevem a porção do sistema nervoso central (SNC) que proporciona melhor o diagnóstico. Peixoto et al. (2000) encontraram pouca concordância dos resultados entre as provas de IFD, ICC e exame histopatológico. Rech et al. (2006a) e Lima et al. (2005) descreveram os locais das lesões no SNC no exame histopatológico e Bingham & Van Der Merwe (2002) indicaram a presença de corpúsculos fluorescentes em vários segmentos do SNC de várias espécies. Diante do exposto, este trabalho objetivou identificar a distribuição das lesões no SNC em casos de infecção natural da raiva em ruminantes e comparar as técnicas IFD, ICC e exame histopatológico no diagnóstico laboratorial da doença. Com essa informação será possível determinar as amostras a serem enviadas ao laboratório para exame histológico, IFD e ICC, evitando os resultados falsos negativos.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisadas 48 amostras de ruminantes com diagnóstico positivo para raiva em pelo menos um dos testes padrão, procedentes da região do semiárido nordestino, necropsiados pelo setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (CSTR/UFCG), no período de janeiro de 2004 a julho de 2009, e pela Clínica de Bovinos de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no período de abril de 2008 a julho de 2009. Sendo 26 bovinos, dois caprinos e oito ovinos da Paraíba e 12 bovinos do Pernambuco.

Essas amostras foram analisadas mediante as técnicas de IFD, ICC e exame histopatológico, padronizando os cortes para serem analisados em córtex frontal, temporal, parietal e occipital, hipocampo, tálamo, colículo rostral e caudal, cerebelo, ponte, medula oblonga, núcleos da base e porções da medula cervical, torácica e lombar dos animais.

Na prova da IFD, com os cortes já descritos anteriormente, as lâminas com inclusões intracitoplasmáticas fluorescentes e/ou poeira antigênica foram registradas como sendo positivas, de conformidade com o método descrito por Goldwasser & Kissling (1958), com modificação descrita por Dean et al. (1996).

A ICC foi realizada com 0,03mL de inóculo da suspensão a 10% (p/v) em camundongos albinos, com idade de 21 dias, criados no Biotério do CSTR/UFCG. Para cada segmento da amostras foram utilizados grupos constituídos de seis indivíduos. Após a infecção foram mantidos no infectório do Laboratório de Virologia do

CSTR/UFCG. Os animais inoculados foram observados por um período de 30 dias com observações diárias, e leitura a cada 24 horas. Mortes ocorridas antes do quinto dia pós-inoculação não foram consideradas como sendo de raiva, conforme a metodologia descrita por Koprowski (1996). Para a confirmação da presença do vírus rábico nos camundongos que morreram no período de observação, os cérebros foram submetidos à técnica de IFD. Os camundongos que não adoeceram no período de observação foram eutanasiados com éter etílico e incinerados, conforme regras estabelecidas pela Comissão de Bioética do CSTR/UFCG (Protocolo de Aprovação na Bioética 129/2009).

No exame histopatológico o encéfalo e a medula foram fixados em formol tamponado a 10% e cortados transversalmente em fatias de 3 a 5 mm de espessura. Amostras das regiões mencionadas anteriormente foram embebidas em parafina, cortadas em secções de 4-5  $\mu\text{m}$  e coradas com hematoxilina-eosina.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De 48 amostras analisadas, todas foram positivas na IFD e ICC e em 30 foram encontrados corpúsculos de Negri (CN) no exame histopatológico. No entanto, não houve diferenças importantes nos resultados dos três testes nas diferentes regiões do SNC avaliadas (Quadro 1). Em bovinos somente 11% a 37% dos cortes das diferentes regiões do córtex resultaram positivas para corpúsculos de inclusão, sendo também baixa a frequência de encefalite ou meningite. Também nas técnicas de IFD e ICC a positividade foi baixa no córtex, variando de 60% a 80%. Nos cortes de tronco encefálico e medula houve também uma baixa frequência de CN, sendo maior o número de testes positivos tanto para IFD e ICC nas diferentes regiões do tronco encefálico. Com isso observa-se que todas as amostras de ponte, tálamo e medula testados foram positivas para IFD e ICC. Quando são analisados os resultados dos três testes nos cortes de cerebelo observa-se que nesse órgão foi encontrada a maior frequência de CN, mesmo em casos sem outras lesões histológicas, e que as provas de IFD e ICC foram positivas em todos os casos analisados. Isto sugere que o tálamo, a ponte, o cerebelo e a medula são de eleição para realização de IFD e ICC e que o cerebelo é o local mais indicado para a procura de CN.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a conduta recomendada pelo Manual Técnico de Controle da Raiva dos Herbívoros (MTCRH) (Brasil 2005) permite o diagnóstico de raiva associando o estudo histológico aos testes de IFD e ICC, já que incluem o cerebelo, tálamo e o tronco encefálico, que apresentam alta positividade para

as provas de IFD e ICC. Outra possibilidade de envio ao laboratório de virologia seria metade do encéfalo cortado longitudinalmente e amostras de medula. Isto permitiria examinar por IFD e ICC uma ou mais regiões onde essas provas apresentam maior positividade e, posteriormente, se essas provas fossem negativas, retornar ao material original e examinar outras regiões. Por outro lado, a coleta de amostras dos locais recomendados pela MTCRH, assim com a coleta de metade do encéfalo pode prejudicar o diagnóstico de outras doenças, para o qual é necessário o estudo de todo o encéfalo após a fixação em formaldeído, para constatar a simetria e a distribuição das lesões. Nestes casos, com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode ser recomendado para diagnóstico laboratorial de raiva o envio exclusivo de porções da medula cervical, dorsal e lombar, já que as três porções apresentaram 100% de positividade nas provas de IFD e ICC. Além disso, o estudo histológico de todas as porções do sistema nervoso central permitirá complementar o diagnóstico através da observação de corpúsculos de inclusão, que neste trabalho foram observados em 68% (26/38) dos casos em bovinos. Essa frequência de observação foi menor do que encontrada por Lima et al. (2005), em 87 % dos casos (20/23), e por Rech (2007) em 83,3 % (20/24), é a mesma frequência encontrada por Langohr et al. (2003), em 68% (17/25) dos casos, e maior do que a encontrada por Lemos (2005), em 48 % (13/27) dos casos nas células de Purkinje. Macruz et al. (1977) não encontraram corpúsculo de inclusão no hipocampo, cerebelo, bulbo e medula de 20 bovinos infectados experimentalmente e os mesmos materiais foram diagnosticados como raiva pela IFD e ICC.

Os relatos de raiva em pequenos ruminantes são menos frequentes. Nos casos examinados nesse trabalho, todos os fragmentos avaliados em materiais de ovinos foram positivos na IFD e na ICC, sem exceção, ressaltando que a maioria apresentou poeira antigênica na IFD. No entanto, corpúsculos de inclusão foram observados somente em 37,5% (3/8) dos ovinos (Quadro 1). Guedes et al. (2007) observaram a presença de CN em um caprino e um ovino examinados (100%), Lima et al (2007) em dois caprinos (100 %) e em três de quatro ovinos (75%) e Rissi et al. (2008) encontraram CN nos dois ovinos examinados (100%). Em relação aos caprinos, as amostras dos dois animais examinados apresentaram corpúsculos de inclusão e as únicas regiões examinadas pela IFD e ICC foram positivas. Enquanto não seja avaliado um número maior de materiais provenientes de caprinos e ovinos com raiva, as amostras a serem enviadas para o diagnóstico da doença nestas espécies podem ser semelhantes às recomendadas para bovinos.

No presente estudo 10 amostras, seis de bovinos e quatro de ovinos, encontravam-se em estado de decomposição, na IFD alguns cortes resultaram positivos, enquanto que outros cortes apresentaram fluorescência não específica, como relatado por Trimarchi & Debbie (1991). Essas amostras apresentaram um período de incubação maior nos camundongos, variando de 15 a 17 dias, enquanto que nas amostras não autolizadas o período de incubação foi de 7-13 dias. No entanto, o período clínico, tanto nas amostras autolizadas quanto nas não autolizadas, foi semelhante, de 3 a 5 dias. Carvalho (2001) encontraram sensibilidade da IFD de 73 % em materiais em decomposição, valor menor da sensibilidade encontrada por Keane & Little (1987) em materiais em bom estado, que foi de 99,8 % . Nesse trabalho a sensibilidade de 100% para as duas provas deve-se provavelmente ao grande número de amostras examinadas por cada animal.

Pela rapidez com que são obtidos os resultados, a realização correta da prova de IFD em materiais enviados corretamente é muito importante para o diagnóstico de raiva. Os diagnósticos falsos positivos na IFD podem ser decorrentes da qualidade na confecção da lâmina, conjugado e experiência do leitor das lâminas, em alguns casos que apresentam baixos títulos virais podendo apresentar apenas poeira antigênica discreta que pode passar despercebida.

Os resultados deste trabalho mostram que as falhas de diagnóstico de raiva utilizando corretamente os exames histopatológico, IFD, ICC em materiais corretamente enviados, se ocorre, é um evento raro. Além disso, mesmo não tendo sido observados CN e sendo negativas as provas de IFD e ICC podemos utilizar a prova de imunohistoquímica nos blocos utilizados para exame histológico. Ressalta também a importância de realizar uma necropsia adequada, retirando todo o encéfalo, pelo menos partes representativas da medula e o núcleo do trigêmeo para exame histológico, como recomendado por Rech et al. (2006b), Rissi et al. (2008) e Pedroso et al. (2008).

## REFERÊNCIAS

- Bingham J. & Van Der Merwe M. 2002. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Meth.* 101:85–94.
- Brasil 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil/ Ministério da

- Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal-Brasília: MAPA/DAS/DAS, 440p.
- Brasil 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Controle da Raiva dos herbívoros/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal-Brasília: MAPA/DAS/DAS, 104p.
- Carini A. 1911. Sur une grande épizootie de rage. *Ann. L'Inst. Past.* 25:843-846.
- 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. 105 p.
- Dean D.J., Abelseth M.K. & Atanasiu P. 1996. The fluorescent antibody test, p. 88-95. In: Meslin F-X., Kaplan M. M., Koprowski H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies.* 4 ed. World Health Organization, Geneva, 476 p.
- Goldwasser R.A. & Kissling R.E. 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98:219-223.
- Gomes A.A.B. 2004. Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil. 107 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Guedes K.M.R., Riet-Correa F., Dantas A.F.M.; Simões S.V.D., Neto E.G.M., Nobre V.M.T. & Medeiros R.M.T. 2007. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesq. Vet. Bras.* 27(1):29-38.
- 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.
- Koprowski H.T. 1996. The mouse inoculation. p.80-87. In: Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H (Ed.). *Laboratory techniques in rabies.* 4 ed., World Health Organization, Geneva, 476 p.
- Langohr I.M., Irigoyen L.F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2003. Aspectos epidemiológicos e clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural* 33(1):125-131.

- Lemos R. A. A. 2005. Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil. 155 p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- 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.
- Macruz R., Nilsson M. R. & Côrtes J. A. 1977. Raiva experimental em bovinos: histopatologia do sistema nervoso central. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. S. Paulo* 14 (1):123-127.
- 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 imunohistoquímica 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.
- Peixoto Z.M.P., Cunha E.M.S., Souza M.C.A.M., Silva L.H.Q., Carrieli M.L., Lazarini S.R.F., Amatuzzi E.A., Germano P.M.L. & Kotait I. 2000. Diagnóstico laboratorial da raiva dos herbívoros: aspectos peculiares. Seminário Internacional de Raiva. São Paulo, 51 p.
- Rech R.R., Rissi D.R., Pierezan F., Inkelmann M.A. & Barros C.S.L. 2006a. Raiva em herbívoros: 27 casos. Encontro Nacional de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário, ENDIVET, p. 43-44.
- Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. 228 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- Rech R.R., Rissi D.R., Silva M.C., Inkelmann M.A. & Barros C.S.L. 2006b. Histomorfologia do gânglio de Gasser, da *rete mirabile* carotídea e da hipófise de bovinos: estudo de 199 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 26(2):105-111.
- Rissi D.R., Pierezan F. & Kommers G.D. 2008. Ocorrência de raiva em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10):495-500.
- Trimarchi C.V. & Debbie J.G. 1991. The fluorescent antibody in rabies, p 220-229. In: Baer G. M. *The Natural History of Rabies*. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 620 p.

**Quadro 1: Resultados dos testes de imunofluorescência direta (IFD), inoculação intracerebral em camundongos (ICC) e estudo histopatológico, em 38 amostras de bovinos e oito de ovinos, com diagnóstico positivo para raiva, em diferentes regiões do sistema nervoso central, provenientes da região semiárida do nordeste brasileiro, nos anos de 2004 a 2009.**

Fragmento	Exame histopatológico				Total	IFD	ICC
	Corpúsculo de inclusão	Manguito perivascular	Gliose	Meningite		Nº de positivos /Total	Nº de positivos /Total
	Nº de positivos	Nº de positivos	Nº de positivos	Nº de positivos			
<b>Bovinos</b>							
CF	9 (37,5%)	12 (50 %)	2 (8,33%)	6 (25,0%)	24	21 (30)	25 (32)
CP	3 (15,78%)	2 (10,52 %)	00	2 (10,52 %)	19	7 (11)	8 (12)
CT	4 (20,0 %)	4 (20,0 %)	1 (5,0 %)	1 (5,0 %)	20	7 (10)	8 (10)
CO	2 (11,76 %)	2 (11,76 %)	00	1 (5,88%)	17	6 (10)	7 (10)
NB	5 (27,77 %)	11 (61,11%)	2 (11,11%)	00	18	9 (10)	9 (10)
HP	1 (5,55%)	1 (5,55%)	00	00	18	6 (10)	7 (10)
TA	10 (41,66%)	21 (87,5%)	2 (8,33%)	1 (4,16%)	24	30 (31)	34 (34)
CR	5 (31,25%)	9 (56,25%)	2 (12,5%)	1 (6,25%)	16	9 (10)	9 (10)
CC	5 (35,71%)	5 (35,71 %)	1 (7,14%)	1 (7,14%)	14	9 (10)	9 (10)
PT	8 (26,66%)	14 (46,66%)	2 (6,66%)	00	30	32 (32)	36 (36)
MO	4 (25,0%)	11 (68,75%)	3 (18,75%)	00	16	9 (10)	9 (10)
CE	30 (88,21%)	20 (58,82%)	2 (5,88%)	13 38,23%	34	32 (32)	35 (35)
MC	10 (58,82%)	10 (58,82%)	3 (17,64%)	1 (5,88%)	17	4 (4)	6 (6)
MT	7 (41,17%)	7 (41,17%)	3 (17,64%)	00	17	4 (4)	6 (6)
ML	7 (41,17%)	10 (58,82%)	3 (17,64%)	1 (5,88%)	17	4 (4)	6 (6)
<b>Ovinos</b>							
CF	2 (28,57%)	4 (57,14%)	0	4 (57,14%)	7	5 (5)	5 (5)
CP	0	0	0	3 (60,0%)	5	4 (4)	4 (4)
CT	0	0	0	2 (33,33%)	6	4 (4)	4 (4)
CO	0	0	0	3 (42,85%)	7	4 (4)	4 (4)
NB	1 (14,28%)	1 (14,28%)	1 (14,28%)	2 (28,57%)	7	4 (4)	4 (4)
HP	0	2 (33,33%)	0	0	6	4 (4)	4 (4)
TA	0	2 (28,57%)	0	1 (14,28%)	7	7 (7)	7 (7)
CR	1 (16,66%)	2 (33,33%)	0	1(16,66%)	6	4 (4)	4 (4)
CC	0	2 (33,33%)	1(16,66%)	1(16,66%)	6	4 (4)	4 (4)
PT	0	2 (40,0%)	1 (20,0%)	0	5	6 (6)	6 (6)
MO	0	3 (60,0%)	1 (20,0%)	0	5	4 (4)	4 (4)
CE	2 (25,0%)	2 (25,0%)	0	4(50,0%)	8	8 (8)	8 (8)
MC	1 (14,28%)	3 (42,85%)	0	1 (14,28%)	7	2 (2)	2 (2)
MT	0	3 (50,0%)	0	1 (16,66%)	6	2 (2)	2 (2)
ML	0	1 (16,66%)	0	0	6	2 (2)	2 (2)

<sup>a</sup> CF = córtex frontal, CP = córtex parietal, CT = córtex temporal, CO = córtex occipital, NB = núcleos da base, TL= tálamo, HP = hipocampo, TA = tálamo, CR = colículo rostral, CC = colículo caudal, PT=ponte, MO = medula oblongata, CE = cerebelo, MC = medula cervical, MT = medula torácica, ML= lombar.

<sup>b</sup> P/T = número de positivos / número total

<sup>c</sup> IFD = Imunofluorescência Direta.

<sup>d</sup> ICC = Inoculação Intracerebral em camundongos.

<sup>e</sup> EH = Exame histopatológico.

<sup>f</sup> CN = Corpúsculos de Negri.

<sup>g</sup> MG = Manguito.

<sup>h</sup> GL = gliose.

“Sábio é quem tem coragem de identificar suas loucuras e procurá-las. Não esconde sua irracionalidade, trata-a. Muitos impulsivos ferem durante a vida toda seus íntimos porque nunca assumiram sua ansiedade. Somos ótimos para nos esconder.” (*ALBERT EINSTEIN, 2004*).



O presente trabalho foi formatado segundo as normas da Brazilian Journal of Microbiology de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2009 de 04 de fevereiro de 2009, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

## PARALYTIC RABIES IN SWINE

**Clarice Ricardo de Macedo Pessoa<sup>1</sup>, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva<sup>1</sup>, Albério Antônio de Barros Gomes<sup>1</sup>, Andrea Isabel Estévez Garcia<sup>2</sup>, Fumio Honma Ito<sup>2</sup>, Paulo Eduardo Brandão<sup>2</sup>, Franklin Riet-Correa<sup>4\*</sup>**

*1 Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, Bairro Santa Cecília, CEP 58700-970, Caixa Postal 64, Patos, Paraíba, Brazil*

*2 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

### ABSTRACT

Rabies virus was diagnosed in two pigs in the semiarid region of Paraíba State, Brazil. Main clinical signs were paresis and paralysis of the pelvic limbs. The histological lesions were diffuse non-suppurative encephalomyelitis with severe lesions in the spinal cord, mild to severe lesions in the brain stem, and mild or absent lesions in the forebrain. The virus was identified by RT-PCR as a *Desmodus rotundus* strain. Despite the various diagnosis of rabies in pigs this is the first report of clinical signs and pathology of pig rabies transmitted by vampire bats.

**Keyword:** vampire bats, epidemiology, virus isolation, zoonotic.

### INTRODUCTION

Rabies virus (RV) presents special tropism to the central nervous system (CNS) causing acute encephalomyelitis, and provoking a very lethal neurological disease in mammals. RV belongs to the genus *Lyssavirus* within the family *Rhabdoviridae*, and it is a important public health problem in Brazil, because the epidemiological situation is complex and there is an overlap between the two major prevailing cycles: dogs and vampire bats(9).

---

<sup>4</sup> Corresponding author: [franklin.riet@pq.cnpq.br](mailto:franklin.riet@pq.cnpq.br)

This country has reduced human rabies through the control of the disease in dogs and, actually, human cases of rabies transmitted by bats are more common than those transmitted by dogs (15). The virus is also frequently isolated from wild animals, mainly from wild canines (3), but the importance of these animals as a source for rabies in domestic animals is unknown.

Rabies is rare in swine and there are few reports on the epidemiologic, clinical and pathologic characteristics of the disease in this species. In an outbreak of swine rabies transmitted by a dog in China the main clinical signs were aggressiveness and other cerebral signs(10). In USA, in 10 cases of rabies transmitted by wild animals, mainly raccoons, mongoose and skunks, clinical signs were fever, aggression, restlessness, ptyalism, anorexia, head rubbing, progressive paralysis, depression, and vocalization (6)

In Brazil there are several reports of identification of rabies virus from swine from the states of Pará(2), Tocantins(18), Goiás (9), Mato Grosso (16) and Rio Grande do Sul (21) but there are no reports on the epidemiology, clinical signs and pathology of the disease in this species. Some of those viruses were originated from dogs (9) and others from vampire bats (2). The objective of this paper is to report, for the first time, the epidemiology, clinical and pathology of an outbreak of rabies transmitted by vampire bats in swine.

## **MATERIAL AND METHODS**

In June 2009, the Pathology Section of the Veterinary Animal Hospital belonging to the Federal University of Campina Grande, state of Paraíba, received two pigs presenting neurological signs. The two animals were raised in a piggery with other 28 pigs of different ages, in the municipality of Mãe D'Água, in the semiarid of Paraíba. Both animals were submitted to euthanasia and necropsied. Samples of tissues from the thoracic and abdominal cavities, the whole brain and spinal cord of a pig, and half brain and spinal cord of another pig were fixed in 10% buffered formalin. The tissues samples and samples of transverse sections of the CNS including the spinal cord (cervical, thoracic and lumbar), cerebellum, cortex, cerebellar peduncles, medulla oblongata, pons, rostral and caudal colliculi, hippocampus, thalamus, basal nuclei and internal capsule were embedded in

paraffin, sectioned in 4-5  $\mu\text{m}$  slices and stained with hematoxylin- eosin for histological examination. The trigeminal ganglia from Fig 2 was also studied histologically.

From Fig 2, fragments of the brain and spinal cord from similar regions than those examined histologically were examined for rabies through the direct fluorescent antibody test (FAT) and mouse inoculation test (MIT). For the MIT, the suspensions were prepared from the brain and spinal cord materials, each samples being individually macerated and diluted to make a 20% suspension (weight/volume) with a solution of sterilized distilled water containing 2% (v/v) rabbit sera, penicillin (500 UI/mL) and streptomycin (1,560 UI/mL). After centrifuging at 2,000 G for 10 minutes, a volume of 0.03 mL was inoculated intracerebrally in groups of ten mice, according to Koprowski(11). Mice were daily observed for 30 days for rabies signs, and the confirmation of rabies was by the FAT. Mice used for diagnostic and virus isolation procedures were 21 day-old Swiss albino, lineage CH3 Rockefeller, weighing 11-15 g, and maintained at the Federal University of Campina Grande facilities. The FAT was performed according to the technique of Goldwasser & Kissling(7) modified by Dean *et al.*(5). The historical and clinical data were obtained by interviewing the owner, and the epidemiological information was completed after the inspection of the piggery.

The rabies virus isolated from swine identified as PN169PB was submitted to RNA extraction from a 10% viral suspension, using Trizol® (Invitrogen®), according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was carried out as described by Macedo *et al.*(13), using sense primer 504 (5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3') and antisense primer 304 (5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3') targeted to the nucleoprotein gene and M-MLV Reverse Transcriptase™ and Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

The amplicon was sequenced with both primers using BigDye 3.1™ (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions and the sequences were obtained in an ABI-377™ automatic sequencer (Applied Biosystems).

For the construction of a dendrogram, DNA sequences retrieved from Genbank were employed and aligned by CLUSTAL/W method, using the Bioedit 7.0.9.0 program. and a nucleotide distance tree was generated with the Neighbor-Joining algorithm and MCL model using the MEGA software with 1000 bootstrap repetitions(20).

## RESULTS

The first animal to show clinical signs (Fig 1) was a 45 days-old male pig, showing flacid paralysis of the pelvic limbs during two days, which was presumptively diagnosed as trauma. At necropsy, gross lesions were not observed. Upon histological examination, non-suppurative encephalomyelitis with perivascular cuffs composed by lymphocytes, plasma cells and rare macrophages, diffuse or multifocal gliosis, neuronophagia, hemorrhages and vasculitis were observed notably in gray matter (Fig. 1). These lesions were mild in all regions of brainstem, severe in spinal cord and absent in the telencephalon. Since the lesions were similar to those of rabies, a visit to the farm was made to get additional epidemiological data. During the visit, another animal (Fig 2) was found with nervous signs and conducted to the Veterinary Hospital. It was a 30 month-old pregnant sow, and the signs started 8 days before the visiting day. It showed anorexia and paresis followed by paralysis of the pelvic limbs and tail (Fig. 2). During examination was in lateral recumbence, adopting a sitting dog position when forced to stand. The cutaneous sensitivity and cutaneous trunci reflex were severely decreased. At necropsy, no significant lesions were observed. The histological lesions were non-suppurative encephalomyelitis, meningitis, and trigeminal ganglioneuritis, with the same cell characteristics observed in Fig 1 (Fig.1). Those lesions were mild in telencephalon and cerebellum and severe in brainstem and spinal cord. The leptomeninges were diffusely infiltrated by mononuclear cells with presence of perivascular cuffings.

All the fragments examined were negative by the FAT and the samples of the thalamus, pons, medulla oblongata and cervical, thoracic and lumbar medulla were positive by MIT. The swine virus isolated showed maximum identity with bovine rabies virus transmitted by *D. rotundus* bats of the São Paulo State (Fig. 3).

The place where the pigs were raised (Fig. 4A) was located in the neighboring of the town (Fig. 4B) and the pigs were feed mainly with home residues. The town is surrounded by mountains with caves, rocks and covered by the native forest (*caatinga*) typical of the semiarid region (Fig. 4 B-D). No vaccination or deworming had been done before the rabies outbreak. The owner remembered that approximately 6 months ago he noted the presence of a bat inside the pen and the signal of blood feeding in one animal.

After the confirmation of rabies diagnosis, he was advised to vaccinate the remaining animals. Eight days after vaccination with a commercial rabies vaccine (raivacel® -Vallée) an adult sow showed clinical signs similar to those observed in the previous cases, but recovered in 10-12 days. No more cases were observed later.

## DISCUSSION

In Brazil, rabies is frequently diagnosed in cattle and horses (12). Sheep and goats are less common affected (12) and the disease is rare in swine. In absence of cattle and horses, which are favorite source for vampire bats, other species, including swine are alternative source of food for *D. rotundus* (1, 21). Despite the reports on the isolation of rabies virus in swine there are only rare reports on the clinical signs of the disease in this species. In an outbreak of rabies transmitted initially by a dog, the main clinical signs were aggressiveness, hyperexcitation, and roaring, with a furious rabies pig jumping the pen wall to bite other pigs, which were later affected with a furious form of the disease (10). In contrast, in the outbreak reported in this paper clinical signs were exclusively of the paralytic form, similar to that observed in most cases of bovine rabies (12). Those clinical signs are due to the distribution of the lesions in the affected animals which showed severe lesions on the spinal cord in both animals, mild (Fig 1) or severe (Fig 2) lesions of the brain stem, and absence (Fig 1) or mild lesions (Fig 2) in the telencephalon. To the best of our knowledge this is the first report on clinical signs and pathology of rabies transmitted by vampire bats in pigs.

The sensibility of FAT for the diagnosis of pig rabies is questioned. Yates *et al.* (22) found four pigs negative for FAT but positive for MIT. Prins and Yates (17) analyzed 11 pigs, only one was FAT-negative, but all of them were MIT-positives. Also the absence of Negri bodies in the cases reported in this paper and in other reports (14), indicates the difficulties in the diagnosis of rabies in swine, and the importance of the differential diagnosis with other swine viral encephalitis with lesions similar to those of rabies (19). The rapid diagnosis of rabies transmitted by bats in swine is also very important because, in some occasions, human cases of rabies transmitted by vampire bats were preceded by swine cases (15).

The genetic typing of the virus suggested that the transmitter was a *D. rotundus* bat. The existence of caves in the region favors the presence of vampire bats and, consequently, the transmission of the virus to other animal hosts, including wild animals, which perpetuates the presence of virus in the Brazilian semiarid region (8). Due to the seriousness of the disease, it is important to reinforce the vaccination of all farm animals, including pigs, to prevent the disease in animals and man. The Pasteur Institute of São Paulo registered from 1980 to 1995, one case of human rabies transmitted by a pig, which is considered an animal offering a median risk (4). As a consequence in any pig with neurological signs rabies is an alternative diagnostic, and there is the possibility of human transmission.

## REFERENCES

1. Baer G. M. (1991). Vampire bat and bovine paralytic rabies, p. 389-404. In: BAER, G. M. The natural history of rabies. 2 ed. CRC, Boca Raton. 620 p.
2. Barbosa, T.F.S.; Medeiros, D.B.A.; Travassos da Rosa, E.S.; Casse, L.M.N.; Medeiros, R.; Pereira, A.S.; Vallinoto, A.C.R.; Vallinoto, M.; Begot, A.L.; Lima, R.J.S.; Vasconcelos, P.F.C.; Nunes, M.R.T. (2008). Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. *Virol.* 370, 228–236.
3. Bernardi, F.; Nadin-Davis, S.A.; Wandeler, A.I.; Armstrong, J.; Gomes A.AB., Lima, F.S.; Nogueira, F.R.B.; Ito, F.H. (2005). Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *J. Gen. Virol.* 86, 3153-3162.
4. Costa, W.A.; Ávila, C.A.; Valentine, E.J.G.; Reichmann, M.L.A.B.; Cunha, R.S.; Guidolin, R.; Panachão, M.R.I.; Omoto, T.M.; Bolzan, V.L. (1999). Profilaxia da raiva humana. Manual Técnico do Instituto Pasteur - n.4
5. Dean, D.J.; Abelseth, M.K.; Atanasiu, P. (1996). The fluorescent antibody test. In: Meslin, F-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. Laboratory techniques in rabies. 4. ed. Geneva: World Health Organization, pp. 88-95.

6. DuVernoy, T. S.; Mitchell, K. C.; Myers, R. A.; Walinski, L. W.; Tinsley, M. O. 2008. The first laboratory-confirmed rabid pig in Maryland, 2003. *Zoon. Pub. Health.* 55, 431-435.
7. Goldwasser R.A. & Kissling R.E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98, 219-223.
8. Gomes, A. A. B. (2004). *Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil.* São Paulo, Brasil, 107p. (Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo).
9. Ito, M.; Itou, T.; Shoji Y.; Sakai, T.; Ito, F.H.; Arai, Y. T.; Takasaki, T.; Kurane, I. (2003). Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. clin. virol.* 26, 317-330.
10. Jiang, Y.; Yu, X.; Wang, L.; Lu, Z.; Liu, H.; Xuan, H.; Hu, Z.; Tu, C. 2008. Na outbreak of pig rabies in Hunan province, China. *Epidemiol. Infect.* 136, 504-508.
11. Koprowski, H. (1996). The mouse inoculation test. *In: World Health Organization. Laboratory techniques in rabies.* 4 ed. Geneve: WHO, pp. 80-87.
12. 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.
13. Macedo, C.I.; Camielli, P.Jr.; Brandão, P.E.; Travassos da Rosa, E.; Oliveira, R.N.; Galera, J.; Medeiros, R.; Machado, R.; Oliveira, R.C.; Carrieri, M.L.; Kotait, I. (2006). Diagnosis of Human Rabies Cases by Polymerase Chain Reaction of Neck-Skin Samples. *Braz. J. Infect. Dis.* 10 (5), 341-345.
14. Morehouse, L.G.; Kintner, L. D.; Nelson, S. L. (1968). Rabies in swine. *J Am. Vet Med Assoc.* 153:57-64.
15. Ministério da Saúde. Raiva humana transmitida por morcegos no estado do Pará e Maranhão. Acesso : [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs) 22-02-2010.
16. Nociti, D.L.P.; Caramori Júnior, J.G.; Matta G.C.A.; Aguiar, D.M.. (2009). Raiva em suíno no estado de Mato Grosso - relato de infecção conjunta com bovino da mesma propriedade. *Arq. Inst. Biol.* 76 (2), 269-271.



17. Prins, L.; Yates, W.D.G. (1986). Rabies in Western Canada, 1978-1984. *Can. Vet. J.* 27, 164-169.
18. Silva, R.O.S.; Costa Filho, R.B.; Pessoa, L.C.D.; Pires, P.S.; Salvarani, F.M.; Soares Filho, P.M.; Assis R.A.; Lobato, F.C.F. (2008). Surto de raiva em suínos em Miracema, Tocantins, Brasil. *Ciênc. .Vet. Trop*, 11 (2/3), 73-75.
19. Summers, B.A; Cummings, J.F.; Lahunta, A. (1994). Inflammatory diseases of the central nervous system. p. 95-188.In:Veterinary Neurophatology. Mosby, St. Louis MO.
20. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. (2007). S MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1596-1599.
21. Teixeira, T.F.; Holz, C.L.; Caixeta, S.P.M.B.; Dezen, D.; Cibulski, S.P.; Silva, J. Rosa, J.C.A.; Schmidt, E.; Ferreira, J.C.; Batista, H.B.C.R.; Caldas, E.; Franco, A. Roehe, P. M. (2008). Diagnóstico de raiva no Rio Grande do Sul, Brasil, de 1985 a 2007. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10),515-520.
22. Yates, W. D. G.; Rehmtulla, A. J.; McIntosh, D. W. (1983). Porcine rabies in Western Canada. *Can. Vet. J.* 24, 162-163.

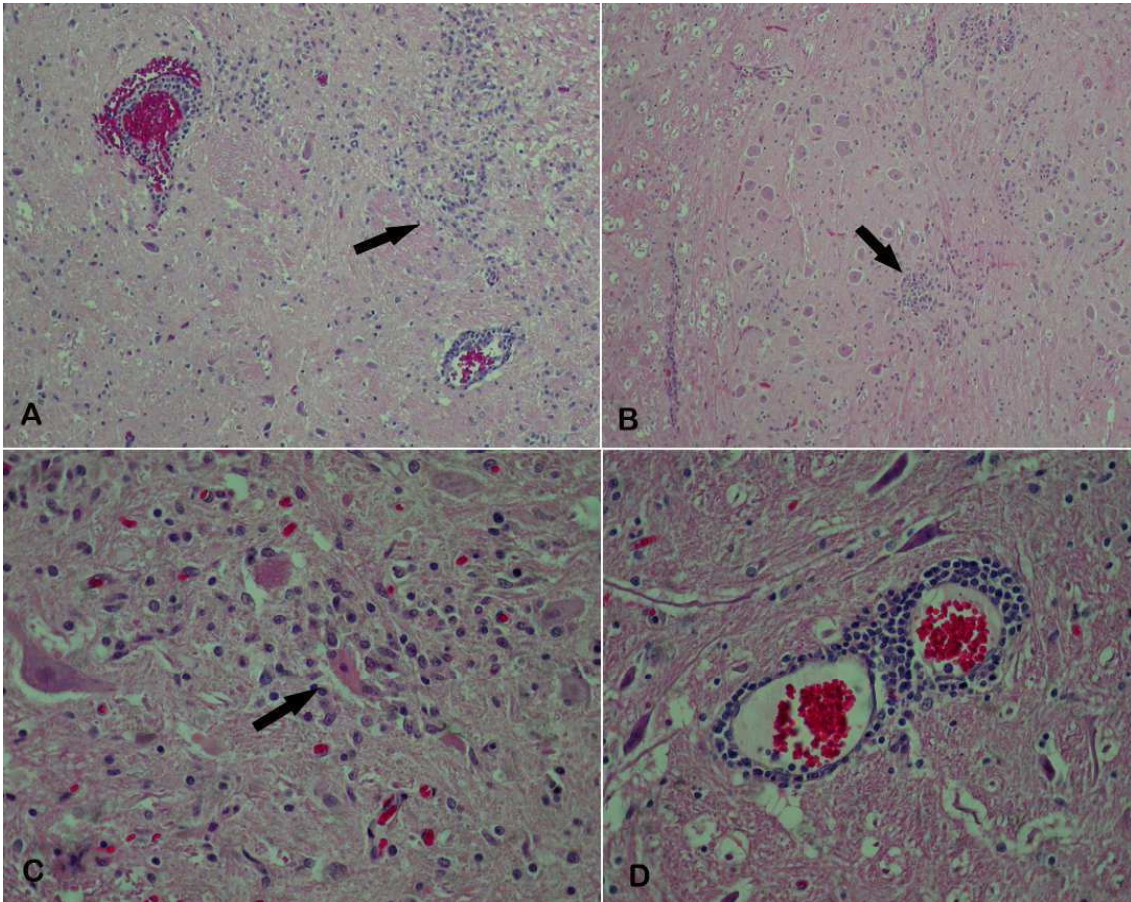


Fig. 1. Rabies in pigs. A) Rostral colliculi, Fig 1. B) Medulla oblongata, Fig 1. C) Thoracic spinal cord, Fig 1. D) Medulla oblongata, Fig 2. Focal gliosis (A and B) (arrows), perivascular cuffing (A-arrow head- and D), and neuronophagia (C) (arrow) are observed. HE, x10 (A and B), and x40 (C and D).



Fig. 2. The sow (Fig 2) affected by rabies shows paralysis of the hind limbs.

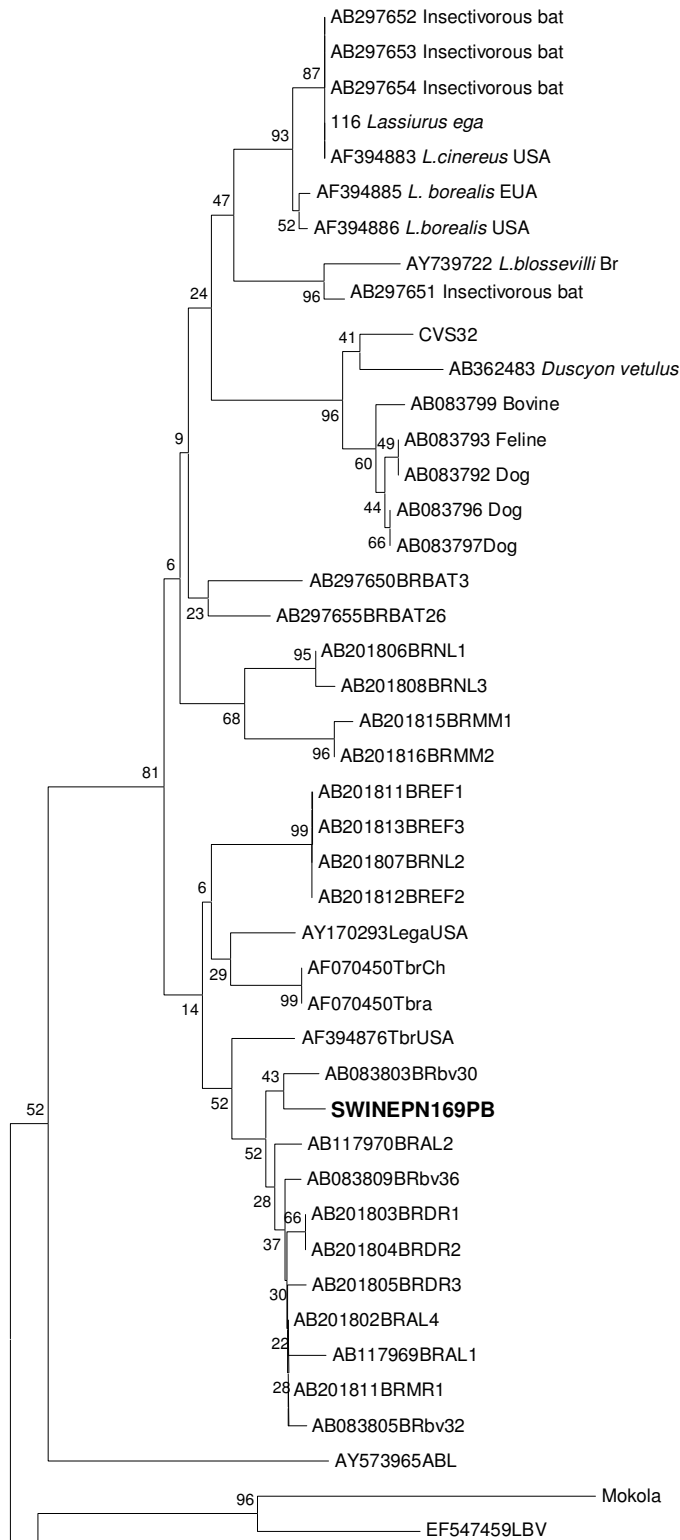


Fig. 3 Phylogenetic tree for partial RABV nucleoprotein gene showing strain **SWINEPNI69PB** (in bold) and homologous sequences retrieved from the Genbank. The numbers at each branch are 1000 bootstrap replicates. The bar represents the number of substitutions per site. The **SWINEPNI69PB** sample was situated in the clade from bovine origin, close to haematophagous bat group.



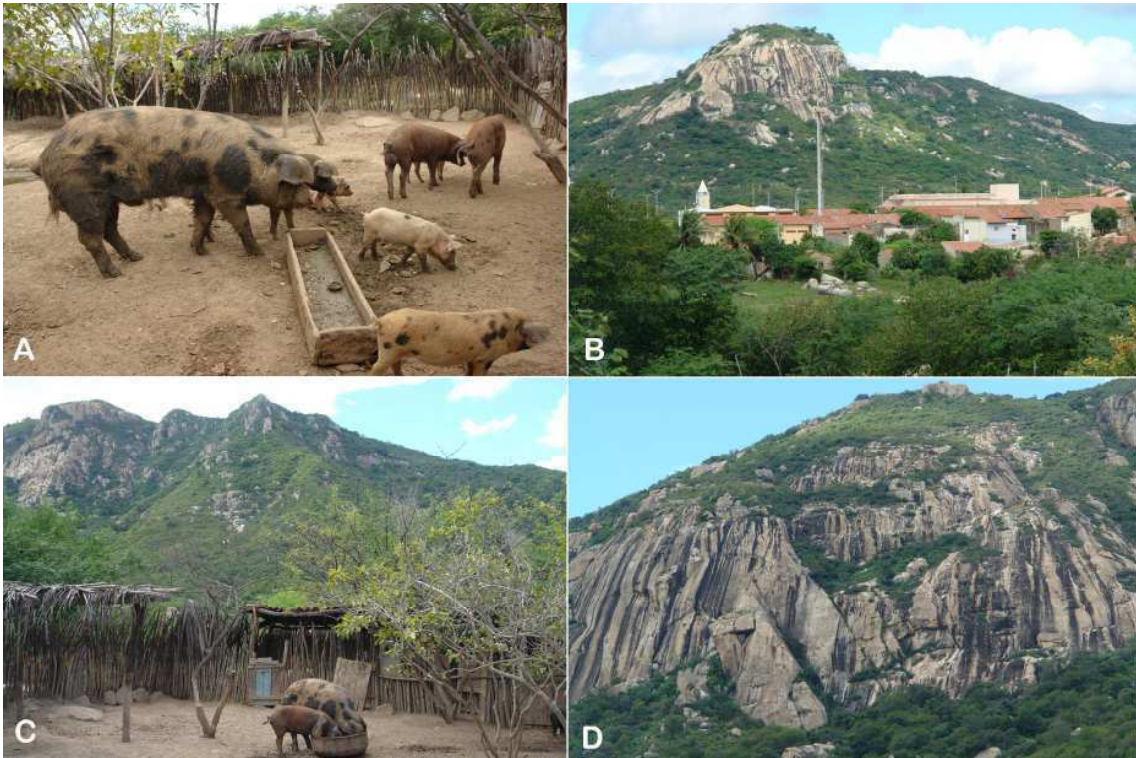


Fig. 4. The aspect of the piggery (A and C) and the town (B) surrounded by mountains with caves, rocks and covered by the native forest (B, C and D).

*“S em sonhos as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas se tiver grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem”. (AUGUSTO CURY, 2004).*

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da Veterinary Research de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2009 de 04 de fevereiro de 2009, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

## Eastern Equine Encephalitis in Northeastern Brazil

Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva<sup>5</sup>, Glauco José N. Galiza<sup>1</sup>, Antônio Flávio M. Dantas<sup>1</sup>, Rafael de Novaes Oliveira<sup>2</sup>, Keila Yamamoto<sup>2</sup>, Samira Maria Achkar<sup>2</sup>, Franklin Riet-Correa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Health and Technology Rural (CSTR) Federal University of Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, 58700-000 Patos, Paraíba, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto Pasteur, São Paulo, Brazil.

**Abstract** - Outbreaks of eastern equine encephalitis observed from May 2008 to August 2009 in the Brazilian states of Pernambuco, Ceará, and Paraíba are reported. The disease occurred in 93 farms affecting 229 equidae with a case fatality rate of 80.27%. Main clinical signs were circling, depression or hyperexcitability, ataxia, and progressive paralysis with a clinical manifestation period of 3-15 days. Main histologic lesions were a diffuse lymphocytic encephalomyelitis with neuronal death, satellitosis, neuronophagia, and hemorrhages being more severe in the cerebral grey matter of the telencephalon, diencephalon and mesencephalon. Some animals had also areas of malacia in the telencephalon, thalamus and basal nuclei. From one case, the virus was isolated by mice inoculation and in other 13 cases was identified as eastern equine encephalitis virus by semi-nested RT-PCR. After DNA sequencing, all samples were identified as eastern equine encephalitis through the blastn analysis, but samples from the Ceará and Paraíba states corresponded to the same cluster, and the sample from Pernambuco to a different cluster.

**Equine encephalomyelitis/ semi-nested RT-PCR/ laboratory diagnosis/  
Brazilian semiarid**

---

<sup>5</sup> \*Corresponding author: [franklin.riet@pq.cnpq.br](mailto:franklin.riet@pq.cnpq.br)



## 1. INTRODUCTION

Eastern equine encephalitis (EEE) is a zoonotic disease caused by a virus of the family *Togaviridae*, genus *Alphavirus* [3]. Viruses of this genus are mainly associated with disease of the central nervous system (CNS) of horses and humans, who are the terminal hosts, while infected birds usually act as reservoirs and do not develop disease [18]. However, domestic and wild birds including pheasants, emus and broilers [18] have often been affected and there are record of the disease in other species, including sheep [6], dogs [14] and deer [35, 37].

In South America there have only been two cases of fatal EEE reported in humans, one in Bahia, Brazil [2] and another in Trinidad [10], while in North America, over 100 fatal cases have been reported. This difference can be attributed to the distinct pathogenic characteristics of the agents and habits of the vectors involved. Weaver et al. [40] emphasized that the U.S. variants were more virulent for humans and horses than the South America variants. Fatality rate for humans with an U.S. variant ranged from 50% to 75% [41].

Mosquitoes of the species *Culiseta melanura*, *Coquilletidia perturbans*, *Ochlerotatus sollicitans*, *Aedes vexans*, and *Culex erraticus* are the main transmitters of the agent in the US [39]. In Brazil there are reports of virus isolation in *Aedes (Ochlerotatus) fulvus*, *Aedes (Och.) taeniorhynchus*, *Culex (Culex) sp.*, *Culex (Melanoconion) sp.*, *Culex (Mel.) spissipes*, *Culex (Mel.) pedroi*, and *Mansonia sp* [38]. The transmission of the virus to horses occurs exclusively by mosquitoes that have previously taken blood meal from viremic birds [18].

In the state of São Paulo, Brazil, during the period of 1978 to 1990, several species of birds have been diagnosed positive for EEE by means of the haemagglutinin-inhibition test, including *Porzana albicollis*, *Guirra guira*, *Synallaxis spixi*, *Anabacerthia amaurotis*, *Troglodytes aedon*, *Passer domesticus*, *Geothlypis aequinoctialis*, *Thraupis sayaca*, *Tachyphocelus coronatus*, and *Zonotrichia capensis* among the resident birds. Antibodies were detected also in

the migratory birds such as *Columbina talpacoti*, *Thraupis palmarum*, *Sporophila caerulescen* and *Machetornis rixosus* [17]. In the states of Amapá and Pará antibodies were found in *Ramphocelus carbo*, *Thamnophilus aethiops* and *Phlegopsis nigromaculata* [38].

In Brazil there are few reports on the isolation of EEE virus from horses [1, 7, 11, 27]. Most studies of the disease are based on antibodies detected in horses, humans and wild vertebrates or on isolation of the virus from vectors, in the states of Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins, Ceará, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo [4, 8, 9, 13, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 36, 39]. There are no detailed reports on the epidemiology, clinical signs and pathology of the disease. The objective of this report is to describe the epidemiology, clinical signs and pathology of outbreaks of EEE that occurred in 2008 and 2009 in the semiarid region of the states of Pernambuco, Paraíba and Ceará, Northeastern Brazil.

## 2. MATERIAL AND METHODS

Epidemiological data were obtained from May 2008 to August 2009 on visits to 11 farms in Pernambuco, 40 in Ceará, and 80 in Paraíba. During visits, affected animals were examined clinically and 14 necropsies were performed. During the necropsies, samples of the organs of the thoracic and abdominal cavities, and the CNS were collected for histologic examination. These samples were fixed in 10% buffered formalin solution. After fixation the brain and spinal cord specimens were cut transversely into 3-5 mm thickness sections, and samples of frontal, temporal, parietal and occipital lobes, hippocampus, basal nuclei, thalamus, rostral and caudal colliculi, pons, cerebellum, medulla oblongata, and cervical, thoracic and lumbar spinal cord were embedded in paraffin, cut into 4-5  $\mu\text{m}$  sections of and then stained with hematoxylin-eosin.

Serum samples, one during the clinical disease and another 15 days later, were collected from two horses, not vaccinated against equine encephalitis, and sent to the Biological Institute of Sao Paulo to determine the antibody titers for

equine eastern and western encephalitis by means of the neutralization test in cell culture.

Rabies-direct fluorescent antibody test (FAT) was conducted on brain smears, according to the technique of Goldwasser & Kissling [19], with the slight modification described by Dean *et al.* [12]. The mouse inoculation test (MIT) was performed in newborn albino mice, of the CH3–Rockefeller strain. The mice were inoculated with 0.03 mL of 10% suspension prepared from the CNS samples of necropsied horses, according to Koprowski [26]. Mice were observed daily for 30 days for any neurologic signs or death.

RNA extraction was carried out using Trizol<sup>®</sup> according to the guidelines of the manufacturer, from the original specimens of horses. In 10 samples, the extraction was performed in a pool of brain stem and cerebellum and in three, in a pool of cervical cord, hippocampus and frontal cortex. As a positive control we used a sample of fixed virus of Western Equine Encephalitis Virus (WEEV), assigned by the Instituto Evandro Chagas (IEC), state of Pará, and maintained in Swiss albino mice. As a negative control, ultra pure water free of DNase and RNase was used. The positive and negative controls, together with the 13 CNS samples, were submitted to the semi-nested RT-PCR technique directed toward amplification of a fragment of 310 base pairs (nucleotides 283 to 592) of the non-structural protein 1 (NSP1) of the genus *Alphavirus*, according to the protocol described by Pfeffer [33].

In the semi-nested PCR, a negative control was used for every three samples tested, to obtain greater control over possible contamination of the reaction. The primers used in the semi-nested RT-PCR are described in Table I. The fragment of 310 bp resulting from the semi-nested RT-PCR was purified from 1% agarose gel with the kit QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit according to the manufacturer's instructions and quantified with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) agarose gel 2%, according to the manufacturer's instructions. For each reaction of DNA sequencing, between 2.5 and 10 ng of DNA were used.

Table I: Description of the primers used for Semi-Nested RT-PCR

Primer	Sense	Use	Sequence	Position in the Genome
A1	Sense	RT-PCR	5'AGAGCDTTTTTCGCAWSTRG CHW 3'	nucleotide 159-180
A2	Antisense	RT-PCR/Semi-Nested PCR	5'ACATRAANKGNGTNGTRTC RAANCCDAYCC 3'	nucleotide 563-592
A3	Sense	Semi-Nested PCR	5' TGYCCNVTGMDNWSYVCNG ARGAYCC 3'	nucleotide 283-308

The DNA fragments were subjected to bidirectional DNA sequencing, with primers A2 and A3 in separate reactions using the kit BigDye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The purification of the sequencing reaction was performed by Sephadex™ G-50 fine (GE Healthcare Bio-sciences), on plates with Multiscreen HV filter in 96 wells plates. After purification, the sequences were generated in automatic genetic analyzer ABI-3130 (Applied Biosystems™). The confirmation of the sequencing and determination of viral species was performed using the application blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

The identification of the virus carried by semi-nested RT-PCR were performed on 13 horse specimens collected: one from the municipality of Exu, in the state of Pernambuco; one from Jaguaribe, and two from Várzea Alegre, in the state of Ceará; and two from São João do Rio do Peixe, two from Coremas, two from Poço de José de Moura, one from Uiraúna, one from Paulista, and one from Patos in the state of Paraíba.

### 3. RESULTS

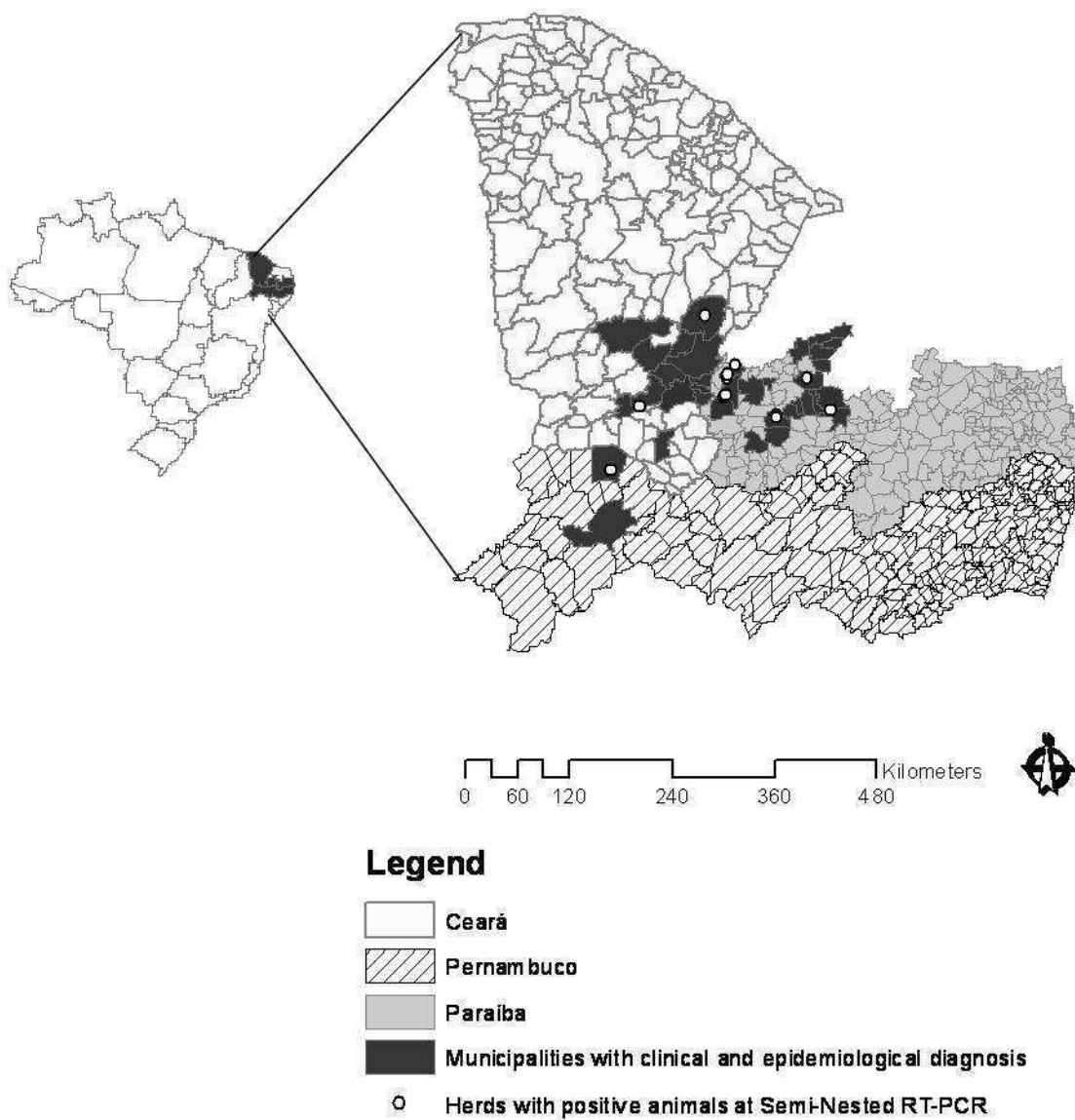
#### 3.1. Epidemiology

The sequencing of the isolates that the sample isolated from Pernambuco was of a different cluster than the samples isolated from Paraíba and Ceará that belonged to another cluster, indicating the occurrence of two outbreaks: one in

Pernambuco in 2008, and another in Paraíba and Ceará in 2009. The first outbreak occurred in the state of Pernambuco from April to August 2008. The initial case occurred in the municipality of Parnamirim, with cases extending later to the municipality of Exu. A total of 11 farms were involved, 60 horses died and only one recovered.

Another outbreak occurred in the states of Ceará, and Paraíba, during the period of March to July 2009. In Ceará, the disease occurred in the municipalities of Jaguaribe, Iguatú, Missão Velha, Faria Brito, Baixio, Acopiara, Cedro, Umari, Ico, Ipaumirim, Óros, Lavras da Manguabeira and Várzea Alegre. In Paraíba, the disease was registered in the municipalities of Cajazeiras, São João do Rio do Peixe, Coremas, Poço de José de Moura, Uiraúna, Brejo do Cruz, São José do Brejo do Cruz, Belém do Brejo do Cruz, Condado, São Bentinho, Cajazeirinhas, Catolé do Rocha, Paulista, Vista Serrana, São Francisco, Souza, Itaporanga, Piancó, São Bento, Malta, São José de Espinharas, and Patos. The geographic distribution of the disease is presented in Figure 1. Forty properties were affected in Ceará and 42 in Paraíba; 165 horses, one pony, one donkey and one mule were affected; 105 horses, the pony and the donkey died, and 60 horses and one mule recovered. The fatality rate was 98.36% in the outbreak of Pernambuco, and 62.18% in the outbreak of Ceará and Paraíba. Horses of all ages were affected.

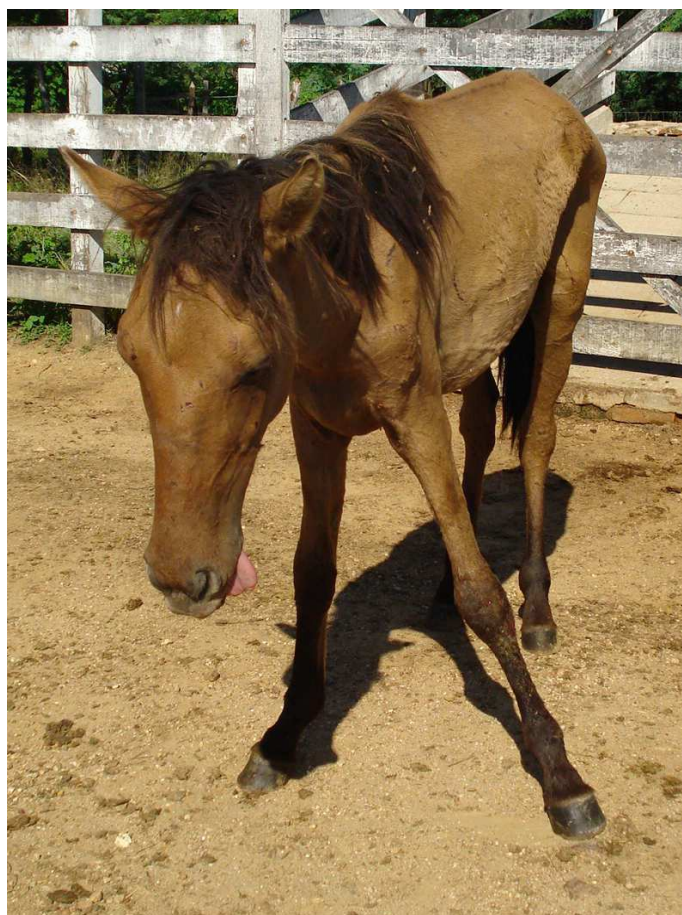
Figure 1. Map of the states of Paraíba, Ceará, and Pernambuco showing the municipalities where EEE occurred.



### 3.2. Clinical signs

The main clinical signs were ataxia, circling, blindness, head pressing, depression or hiperexcitability, lip movements or other involuntary movements, tongue paralysis, ataxia, paresis progressing to paralysis, recumbence, paddling, and coma (Figure 2). Fever, opisthotonos, lip or mandible paralysis, wide base stance, hypermetric gait, stringhalt, falls, salivation, and nasal and eye discharge were less frequently observed. The clinical manifestation period was of 3-15 days.

Figure 2. Horse affected by eastern equine encephalomyelitis from the municipality of Jaguaribe, state of Ceará, showing severe depression, ataxia, and tongue paralysis.



### 3.3. Pathology

At necropsy, traumatic lesions, including corneal opacity, subcutaneous periocular edema, and alopecia and erosions of the skin in different parts of the body were observed in nine horses. Five animals showed congestion of the meningeal vessels. After fixation red or brown areas were observed in the temporal and occipital cortex of one horse (Figure 3).

Figure 3. Cerebrum. Horse with equine encephalomyelitis from the municipality of Jaguaribe, state of Ceará, showing red or brown areas of malacia in the occipital cortex.



Main histologic lesions were a diffuse multifocal non suppurative lymphoplasmocytic encephalomyelitis with perivascular infiltration by lymphocytes, plasma cells, macrophages and some neurophils, vasculitis with



endothelial cells swelling, neuronal death, satellitosis, neuronophagia, hemorrhages, edema, and multifocal lymphocytic infiltration of the neuropil (Figure 4-8). These lesions were more severe in the grey matter of the telencephalon, diencephalon, and mesencephalon. Similar but mild lesions were observed in the cerebellum and spinal cord, mainly in the grey matter. The distribution and severity of the inflammatory lesions in 14 horses are presented in Table II. In five cases, rare eosinophils were observed within the lymphoplasmocytic exudates. Nine cases showed lymphoplasmocytic meningitis with perivascular cuffing in the cerebral meninges and in four of these horses the meningitis affected also the cerebellum. Focal areas of malacia, with vacuolation of the neuropil and presence of macrophages, neutrophils, cellular debris, and occasionally gutter cells were observed mainly in the telencephalon, thalamus, and basal nuclei. Axonal spheroids were occasionally observed. No significant lesions were observed in other organs examined.

Figure 4. Basal nuclei. Horse with equine encephalomyelitis from the Municipality of Exú, Pernambuco showing encephalitis with lymphoplasmocytic parivascular cuffing and gliosis. H-E.

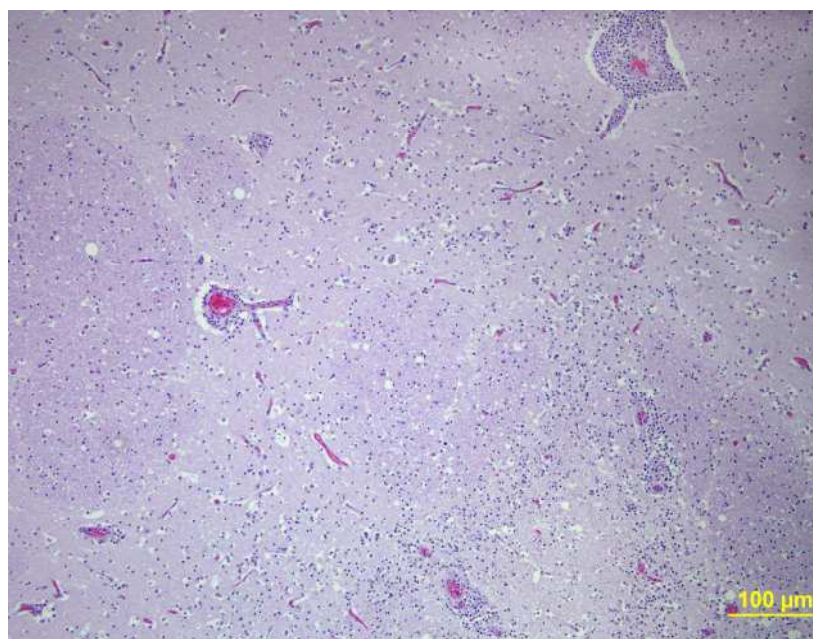


Figure 5. Basal nuclei. Horse with equine encephalomyelitis from the Municipality of Exú, Pernambuco showing perivascular cuffing of lymphocytes, plasma cells and macrophages. H-E.

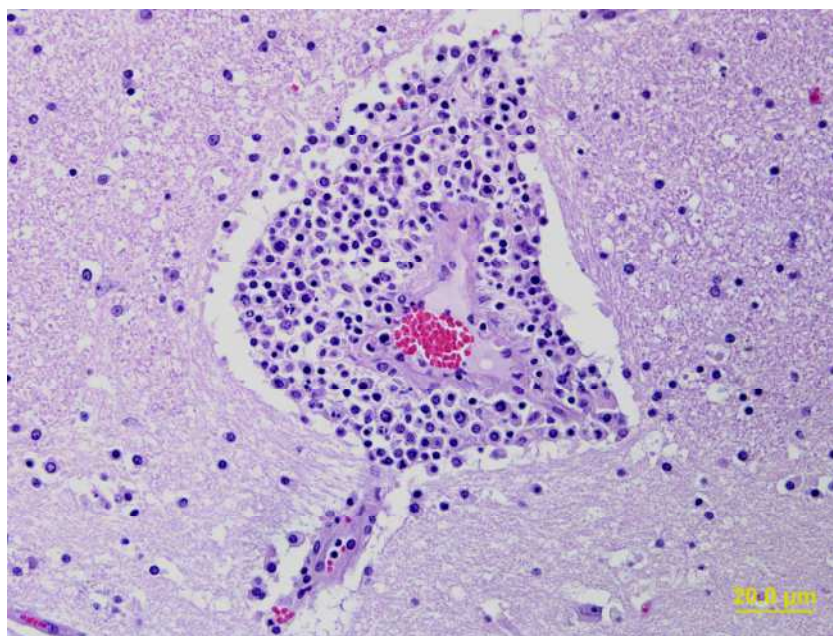


Figure 6. Hippocampus. Horse with equine encephalomyelitis from the Municipality of Exú, Pernambuco showing neuronophagia. H-E.

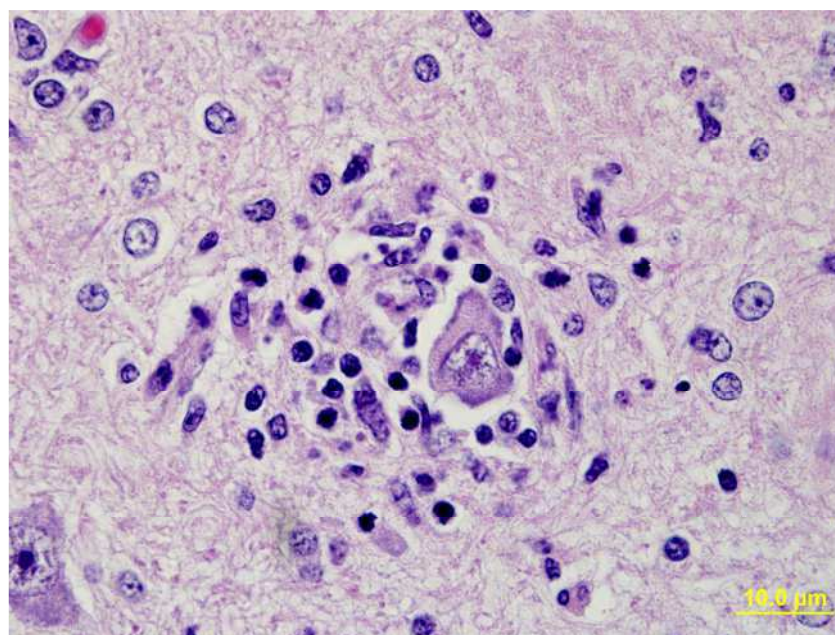




Figure 7. Basal nuclei. Horse with equine encephalomyelitis from the Municipality of Exú, Pernambuco showing neuronal necrosis with infiltration of the neuropil by lymphocytes, plasma cells and neutrophils. H-E.

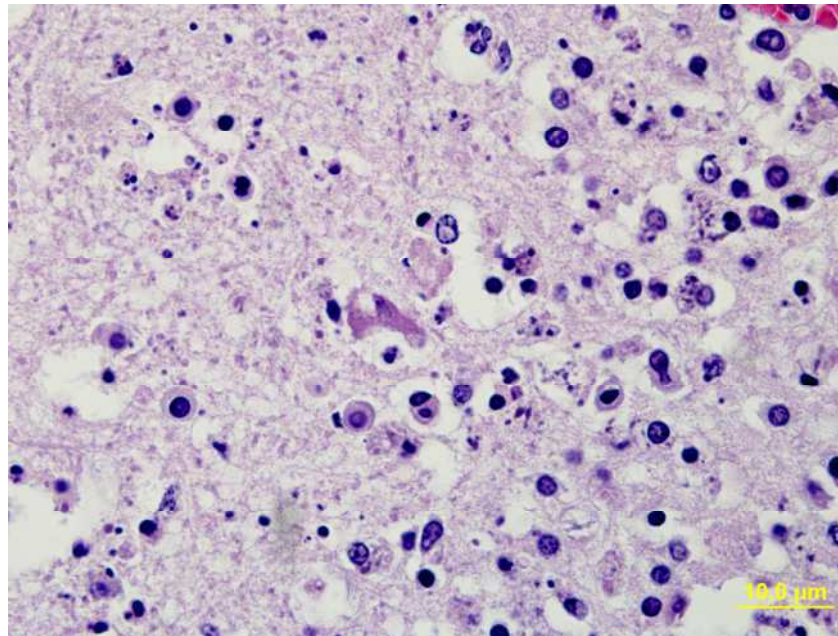


Figure 8. Brain stem. Horse with equine encephalomyelitis from the Municipality of Exú, Pernambuco showing severe hemorrhages. H-E.

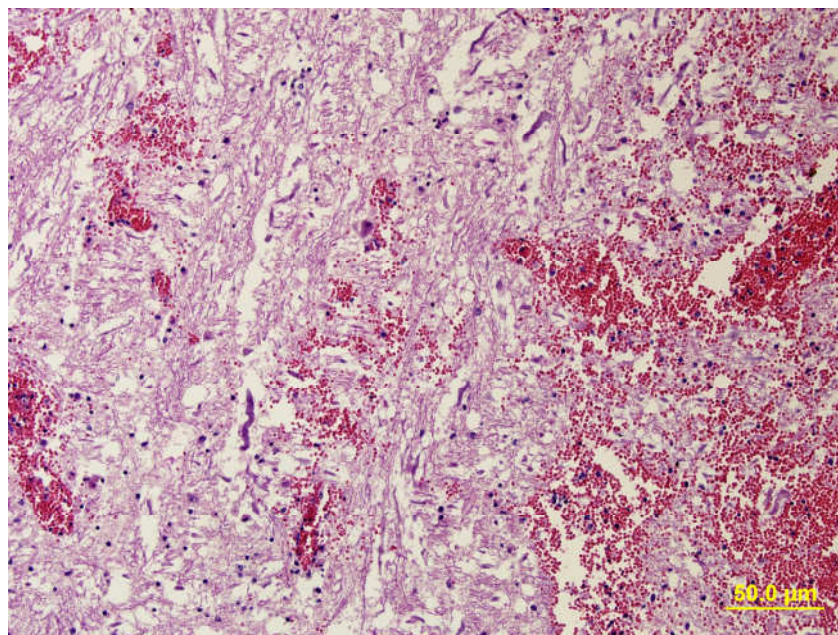


Table II: Distribution and intensity of inflammatory histologic lesions observed in 14 cases of eastern equine encephalitis in northeastern Brazil.

Case	FC <sup>a</sup>	PC	TC	OC	BN	HY	TA	RC	CC	PO	MO	CE	MC	MT	ML
1	++	++	+	+	+++	+	++	++	++	+	+	-	+	-	-
2	+	+	+	+	++	-	++	++	+	+	+	-	+	-	-
3	+++	++	+++	++	+++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-
5	++	+	+	+	+	-	++	++	NE	NE	+	+	+	-	-
6	++	NE	+	+	++	NE	+++	++	++	NE	++	+	NE	NE	-
7	+	+	+	+	++	-	++	++	NE	++	+	+	+	-	NE
8	+++	+	+	+	+++	-	++	++	NE	++	+	+	NE	+	+
9	+	+	++	+	++	NE	+++	+	NE	+	+	NE	++	NE	+
10	+	++	++	+	+	++	++	+	NE	++	+	NE	+	-	-
11	+	+	+	+	+	-	++	++	+	+	+	NE	+	-	+
12	+	+	+	+	+	-	++	++	++	+	+	-	+	+	+
13	++	+	+	+	++	NE	++	++	+	NE	NE	+	-	+	-
14	+	+	+	+	++	-	++	++	++	+	+	+	+	+	-

<sup>a</sup>CF= frontal cortex, CP= parietal cortex, CT= temporal cortex, CO= occipital cortex, BN= basal nuclei, HY= hippocampus, TA= thalamus, RC= rostral colliculi, CC= caudal colliculi, PO= pons, MO= medulla oblongata, CE= cerebellum, MC= cervical spinal cord, MT= thoracic spinal cord, ML= lumbar spinal cord; NE= non examined; - absent, + mild, ++ moderate,+++ severe

### 3.4. Laboratory diagnosis

In the paired serum samples taken from two horses, the antibodies titers against EEE virus were 1:10 and 1:10 in the first sample, increasing to 1:320 and 1:160 in the second.

The 5 day-old mice inoculated with the CNS suspension from one horse began to show signs 24 hours after inoculation. The animals stayed isolated from the other mates of the litter, failed to nurse and had difficulty breathing, and paresis progressing to flaccid paralysis. The death occurred within six hours after the onset of first signs. Forty-eight hours after inoculation of the newborn mice, the mother presented nervous signs including circling movement, head pressing on the box, and paresis of the hind limbs progressing to flaccid paralysis. It died

72 hours after inoculation. The virus isolated from mice was confirmed as EEE by the semi-nested RT-PCR.

Of the 13 SNC samples submitted to semi-nested RT-PCR, all were positive for the genus *Alphavirus*. After DNA sequencing, all positive samples were identified as EEEV through the blastn analysis. The sequencing showed that the samples from Ceará and Paraíba states corresponded to the same cluster, and the sample from Pernambuco to a different cluster. Detailed results of the sequencing of these samples will be published elsewhere.

#### 4. DISCUSSION

In these outbreaks the presumptive diagnosis of EEE was made by the epidemiological, clinical and pathological features of the disease, and confirmed by isolation of virus, by semi-nested RT-PCR, and by the increased antibodies titer in two horses recovered from the disease. The results of the sequencing of the isolates proved that the outbreak in 2008 in Pernambuco was caused by a distinct EEE virus variant from the virus variant causing the outbreak in Ceará and Paraíba states in 2009. The diagnosis of two outbreaks of EEE in the semiarid regions of three Northeastern states represents the first full description of the disease in Brazil, including epidemiology, clinical signs, pathology, and virus identification.

During the visits to the farms, some experienced owners and veterinarians mentioned that this disease is known as *roda* (circling) and occurs periodically in the region. The occurrence of both outbreaks of EEE at the end of the rainy season suggests that the disease is seasonal and epidemic in the Brazilian semiarid region.

The semiarid region is characterized by a warm climate with an average temperature of 26°C and rainfall of about 800 mm per year, and in some regions of only 500-600 mm. The rains are irregular with insignificant to low rainfall occurring for years. The rainy season is short, from January-February to April-May. The humidity is low, ranging from 60% to 75%, and the vegetation is

typical of *caatinga* (means white forest in Tupi-Guarani), being an exclusive Brazilian biome, occupying almost 11% of the country. This vegetation is characteristic of the arid conditions (xerophytic) with a strong presence of bushes with twisted branches and deep roots, and the presence of cacti and bromeliads. Bushes lose almost all of their leaves in times of drought [5].

The seasonal variation of EEE, as well as other arboviral diseases, is associated with a particular temperature range, rainfalls and other environmental factors that determine the density of vectors [22]. The rainfall of Paraíba, in 2009, is among the highest in the last 15 years (Figure 9), suggesting that the increased rainfalls is an important factor for the occurrence of outbreaks, which occur preferentially at the end of the rainy season (Figure 10) when there is an increase in vector population.

Figure 9. Mean annual rainfalls in 16 municipalities (Belém do Brejo do Cruz, Cajazeiras, Catolé do Rocha, Condado, Coremas, Itaporanga, Malta, Patos, Sousa, São Francisco, Vista Serrana, Poço de José de Moura, São Bentinho, São José do Brejo do Cruz, Uiraúna, São João do Rio do Peixe) of Paraíba where EEE occurred. Data from the Executive Agency Water Management of the State of Paraíba. <http://www.aesa.pb.gov.br/2009>.

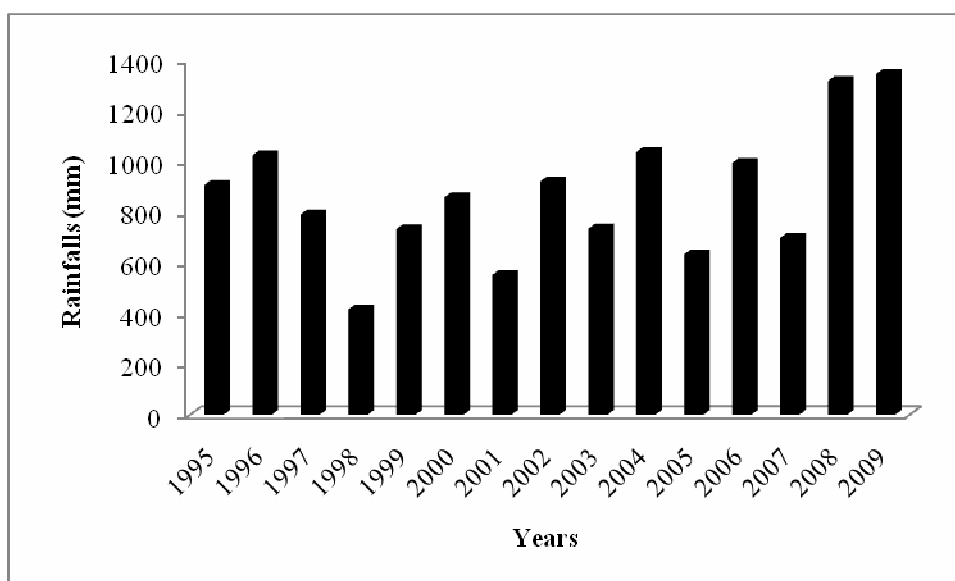
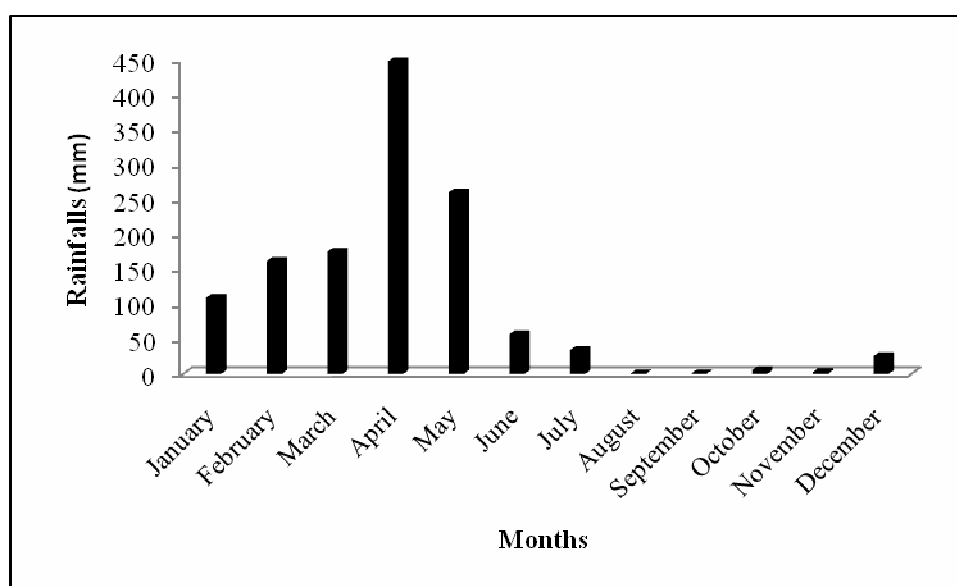


Figure 10. Mean monthly rainfalls, from January to December 2009, in the municipalities (Belém do Brejo do Cruz, Cajazeiras, Catolé do Rocha, Condado, Coremas, Itaporanga, Malta, Patos, Sousa, São Francisco, Vista Serrana, Poço de José de Moura, São Bentinho, São José do Brejo do Cruz, Uiraúna, São João do Rio do Peixe) of Paraíba where eastern equine encephalitis occurred. Data from the Executive Agency Water Management of the State of Paraíba. <http://www.aesa.pb.gov.br/2009>.



The fatality rates suggest that the isolate from the first outbreaks was more pathogenic than the isolate from the second. The EEE virus is considered more pathogenic than the Venezuelan and western equine encephalomyelitis viruses, although considerable variation in pathogenicity may occur [15, 21].

Epidemiologic characteristics (epidemic and seasonal) as well as clinical signs suggesting mainly cerebral and brain stem involvement, and the presence of a diffuse necrotizing and hemorrhagic lymphoplasmocytic encephalitis allowed differentiation of EEE from rabies, *Crotalaria retusa* poisoning, and leukoencephalomalacia, which are common diseases of horses in the Brazilian semiarid [34]. Rabies and *C. retusa* poisoning are endemic diseases in the Brazilian semiarid region, also in rabies the encephalomyelitis is less severe, without necrosis or hemorrhages, and in *C. retusa* poisoning hepatic lesions are

characteristic of pyrrolizidinic alkaloids poisoning. In leukoencephalomalacia the history of corn feeding and the characteristic gross malacia of the white matter allow the differential diagnosis.

Although the epidemiology, clinical signs and pathology allow the presumptive diagnosis of the disease, it is necessary to submit specimens to laboratory diagnosis to determine the etiologic agent of the encephalitis. Such identification is very important for the surveillance of equine arboviruses because of their public health importance, in addition to any economic loss.

## REFERENCES

- [1] Alice F.J., Encefalomyelite eqüina na Bahia, estudo de três amostras isoladas. *Revista Brasileira de Biologia* (1951) 11:125-144.
- [2] Alice F.J., Infecção humana pelo vírus leste da encefalite eqüina. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia* (1956) 3:3-9.
- [3] Acha P.N., Szyfres B., Encefalitis Equina Del Este, In: Acha P.N., Szyfres B. (Eds.) *Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2:81-94, 2003.
- [4] Aguiar D.M., Cavalcante G.T., Lara M.C.C.S.H., Villalobos E.M.C., Cunha E.M.S., Okuda L.H., Stéfano E., Nassar A.F.C., Souza G.O., Vasconcellos S.A., Labruna M.B., Camargo L.M.A., Gennari S.M., Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do município de Monte Negro, Rondonia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* (2008) 45(4):269-276.
- [5] *Atlas do meio ambiente do Brasil/Embrapa*. 2<sup>a</sup> ed., Brasília; EMBRAPA/SPI: Terra Viva. 1996.
- [6] Bauer R.W., Gill M.S., Poston R.P., Kim D.Y., Naturally occurring Eastern Equine Encephalitis in a Hampshire wether. *J. Vet. Diagn. Invest.* (2005) 17:281–285



- [7] Carneiro V., Cunha R., Estudos sobre a encephalomyelite infecciosa dos eqüídeos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.* (1943)14:158-193.
- [8] Causey O.R., Causey C.E., Macedo, D.N.G., Isolamento e identificação do vírus da encefalomyelite eqüina leste no Pará. *Rev Serv Espec. Saud. Pub.* (1958) 10 (1):75-77.
- [9] Causey O.R., Shope RE, Suttmoller P, Laemmert H., Epizootic Eastern Equine Encephalitis in the Bragança Region of Para, Brazil. *Rev Serv. Espec. Saud. Pub.* (1962) 12:40-45.
- [10] Corniou B., Ardoin P., Bartholomew C., Ince W., Massiah V., First isolation of a South American strain of eastern equine virus from a case of encephalitis in Trinidad. *Trop Geogr Med* (1972) 24:162-167.
- [11] Cunha R. Estudos sobre uma amostra de vírus da encefalomyelite eqüina isolada de material proveniente de Recife. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.* (1945) 14:201.
- [12] Dean D.J., Abelseth M.K., Atanasiu P., Fluorescent antibody test. In: Meslin F-X, Kaplan M. M, Koprowski H., editors. *Laboratory techniques in rabies.* Geneva: World Health Organization; (1996) 88-95.
- [13] Dégallier N., Hervé J.P., Travassos da Rosa A.P.A., Vasconcelos P.F.C., Travassos da Rosa J. F. S., Sá Filho G. C. A ecologia dos arbovírus na Amazônia: Pesquisas atuais e perspectiva. *Rev. Fund. SESP.* (1986) 31(2):127-129.
- [14] Farrar M.D., Miller D.L., Baldwin C.A., Stiver S.L., Hall C.L. Eastern equine encephalitis in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* (2005) 17:614–617.
- [15] Fenner F., Bachmann P.A., Gibbs E.P.J., Murphy F.A., Studdert M.J., White D.O. *Virología Veterinaria.* Zaragoza. Acribia (1987) 465-488.
- [16] Fernández Z., Richartz R., Travassos da Rosa A., Soccol V., Identificação do vírus causador de encefalomyelite eqüina, Paraná, Brasil. *Rev Saúde Pública.* (2000) 34:232-235.
- [17] Ferreira I.B., Pereira L.E., Rocco I.M., Marti A.T., Souza L.T.M., Iversson L.B., Surveillance of arbovirus infections in the atlantic forest region, state of São Paulo, Brazil. I detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. *Rev. Inst. Med. Trop São Paulo* (1994) 36 (3):265-274.

- [18] Flores E.F. Togaviridae. In: Flores E.F. *Virologia veterinária*. Ed. da UFSM. (2007) 593-612.
- [19] Goldwasser R.A.; Kissling R.E., Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1958) 98:219-223.
- [20] Heinemann M.B., Souza M.C., Cortez A., Ferreira F., Homem V.S.F., Ferreira-Neto J.S., Soares R.M., Cunha E.M.S., Richtzenhain L.J., Soroprevalência da encefalomielite eqüina do leste e do oeste no município de Uruará, PA, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, (2008) 43:137-139.
- [21] Holbrook M.R., Gowen B.B., Animal models of highly pathogenic RNA viral infections: Encephalitis viruses. *Ant. Res.* (2008) 78:69-78.
- [22] Iversson L.B., Travassos da Rosa A.P.A., Rosa J.T. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. *Rev. Sal. Pub.* (1981) 15:587-602.
- [23] Iversson L.B., Travassos da Rosa A.P.A., Rosa J.T., Costa C.S. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. *Rev. Sau. Pub.* (1982) 16:160-170.
- [24] Iversson L.B., Travassos da Rosa A.P.A., Rosa J.T., Pinto G.H., Macedo O., Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. *Rev. Sau. Pub.* (1983) 17:423-435.
- [25] Iversson L.B., Silva R.A.M.S., Travassos da Rosa A.P.A., Barros V.L.R.S. Circulation of eastern equine encephalitis, western equine encephalitis, ilhéus, maguari and tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, south america. *Rev. Inst. Med. Trop.* (1993) 35(4):355-359.
- [26] Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. Fourth edition. Geneva: World Health Organization; (1996) 80-86.
- [27] Kotait I., Peixoto Z.M.P., Coimbra T.L.M., Cunha E.M.S., Queiroz L.H., Macruz R., Nagamori, A.H., Isolamento e identificação do vírus da Encefalomielite Eqüina, tipo Leste, em eqüinos do estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* (1992) 59:37-41.

- [28] Lennette E., Fox J.P., Anticorpos neutralizantes para a amostra leste do vírus de encefalomielite equine em equídeos no Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. (1943) 38(1):85-92.
- [29] Lopes O.S., Sacchetta. Epidemiological studies on eastern equine encephalitis virus in São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. (1974) 16(5):253-258.
- [30] Nilsson M.R., Sugay W., Ocorrência de encefalomielite eqüina em Itaporanga, Estado de São Paulo. Arq Inst Biol. (1962) 29:63-68.
- [31] Pereira O.A., Moreira L.P., Rojas E. Encefalomielite equine em conchas, São Paulo, Brasil: Incidência de anticorpos inibidores da hemaglutinação no homem e em equídeos. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. (1962) 4(3):149-151.
- [32] Pereira O.A., Nilsson M.R.; Sugay W., Trapp E.E. Ocorrência de encefalomielite eqüina em Itaporanga, estado de São Paulo (Brasil). II Estudos sorológicos. Rev. Inst. Med. Trop. (1964) 6(1):1-4
- [33] Pfeiffer M., Proebster B., Kinney R. M., Kaaden O. R. Genus-specific detection of alphaviruses by a Semi-Nested reverse transcription-polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. (1997) 57:709-718.
- [34] Pimentel L.A., Oliveira D.M., Galiza G.J.N., Rego R.O., Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2009. 29(7):589-597.
- [35] Schmitt S.M., Cooley T.M., Fitzgerald S.D., Bolin S.R., Lim A., Schaefer S.M., Klupel M., Maes R.K., Hogle S.A., O'Brien D.J., An outbreak of eastern equine encephalitis virus in free-ranging White-tailed deer in Michigan. Journal of Wildlife Diseases (2007) 43(4):635-644.
- [36] Silva W.B.P., Pereira O.A.C., Kirchner E., Godoy C.V.F. Ocorrência de arboviroses no estado de São Paulo. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo (1967) 9(2):90-94.
- [37] Tate C.M., Howerth E.W., Stallknecht D.E., Allison A.B., Fischer J.R., Mead D.G., Eastern Equine Encephalitis in a Free-ranging White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). Journal of Wildlife Diseases (2005) 41(1):241-245.

- [38] Vasconcelos P.F.C., Travassos da Rosa J.F.S., Travassos da Rosa A.P.A., Degallier N., Pinheiro F.P., Sá Filho G.C. Epidemiologia das Encefalites por Arbovírus na Amazônia Brasileira. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo.* (1991) 33:465-476.
- [39] Villari P., Spielman A., Komar N., McDowell M., Timperi R.J. The economic burden imposed by a residual case of eastern encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1995) 52: 8–13.
- [40] Weaver S.C., Powers A.M., Brault A.C., Molecular epidemiology studies of veterinary arboviral encephalitides. *Vet J.* (1999) 157:123-138.
- [41] Zacks M.A., Paessler S. Encephalitic alphaviruses. *Veterinary Microbiology* (2010) 140 (3-4):281-286.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que as falhas de diagnóstico de raiva utilizando corretamente os exames histopatológico, imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos, em materiais corretamente enviados, se ocorre, é um evento raro.

A raiva suína, apesar de ser rara, ocorre no semiárido, portanto em suínos com sinais neurológicos, a raiva é um diagnóstico alternativo, e há possibilidades de transmissão ao homem.

Devido à importância da raiva no semiárido é importante reforçar a vacinação de todos os animais, incluindo os porcos, e realizar um programa de controle dos reservatórios.

Em suínos a raiva transmitida por morcego hematófago causa raiva paralítica com lesões localizadas preferentemente na medula.

A encefalite eqüina leste (EEE) é uma doença epidêmica sazonal que ocorre no semiárido nordestino. O isolamento e identificação do vírus de EEE é extremamente importante para a vigilância epidemiológica e profilaxia da doença, assim como para a saúde pública, pois, assim como a raiva, trata-se de uma zoonose.

# ANEXOS

# ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Centro de Saúde e Tecnologia Rural  
Comitê de Ética em Pesquisa – COEP

Bairro do Jatobá – Km 1, Avenida Universitária, Bairro Santa Cecília, S/N, Caixa Postal 64 - Patos – PB  
CEP: 58709-110, TELEFONE: (83) 3423-9713 - FAX: (83) 3423-9537  
E-mail: [coep@cstr.ufcg.edu.br](mailto:coep@cstr.ufcg.edu.br)

Protocolo nº 129/2009

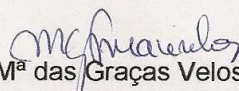
INTERESSADO (a): ALBÉRIO ANTONIO DE BARROS GOMES

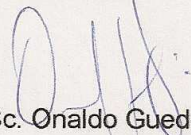
## C E R T I D ã O

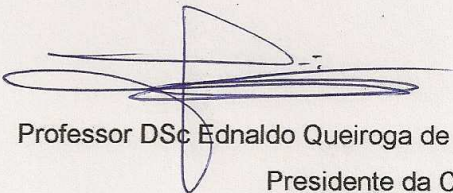
ASSUNTO: Solicita aprovação do projeto de pesquisa "*Distribuição do Virus Rábico em Herbívoros Naturalmente Infectados*".

Cientificamos a Vossa Senhoria que o projeto citado teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno deste comitê e foi aprovado em reunião EXTRAORDINÁRIA nº 7ª, sob nº de Protocolo 129/2009, estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações para a pesquisa científica.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa – COEP da Universidade Federal de Campina Grande, em Patos, 09 de dezembro de 2009.

  
Profª. DSc Mª das Graças Veloso Marinho  
Secretária da COEP

  
Prof. DSc. Onaldo Guedes Rodrigues  
Vice-presidente da COEP

  
Professor DSc Ednaldo Queiroga de Lima  
Presidente da COEP



# ANEXO 2

## RAIVA PARALÍTICA EM SUÍNOS

**Clarice Ricardo de Macedo Pessoa<sup>1</sup>, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva<sup>1</sup>, Albério Antônio de Barros Gomes<sup>1</sup>, Andrea Isabel Estévez Garcia<sup>2</sup>, Fumio Honma Ito<sup>2</sup>, Paulo Eduardo Brandão<sup>2</sup>, Franklin Riet-Correa<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, Bairro Santa Cecília, CEP 58700-970, Caixa Postal 64, Patos, Paraíba, Brazil*

<sup>2</sup>*Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

### RESUMO

O vírus rábico foi diagnosticado em dois suínos no semiárido do Estado da Paraíba, Brasil. Os sinais clínicos foram paresia e paralisia dos membros pélvicos. Lesões histológicas de encefalomielite não supurativa difusa com lesões severa na medula espinhal, lesões de discreta a acentuada no tronco cerebral, e discretas ou ausentes na parte frontal do cérebro. O vírus foi identificado por RT-PCR como uma cepa de *Desmodus rotundus*. Apesar das várias formas de diagnóstico da raiva em animais este é o primeiro relatório de sinais clínicos e patologia da raiva suína transmitida por morcegos hematófagos.

**Palavras-chaves:** morcego vampiro, epidemiologia, isolamento viral, zoonoses

### INTRODUÇÃO

Vírus rábico (VR) apresenta tropismo especial pelo sistema nervosa central (SNC) causando encefalomielite aguda, e provocando doença neurológica letal em mamíferos. O VR pertence ao gênero *Lyssavirus* da família *Rhabdoviridae*, sendo um problema importante de saúde pública no Brasil, a situação epidemiológica é complexa e há dois principais ciclos predominante: cães e morcegos vampiro (9). O país reduziu a raiva

humana através do controle da doença em cães e, casos humanos de raiva transmitida por morcegos são mais comuns do que transmitidos por cães (15). O vírus também é freqüentemente isolado de animais silvestres, principalmente de canídeos silvestres (3), mas a importância desses animais como fonte de raiva em animais domésticos é desconhecida.

A raiva é uma doença rara em suínos e são poucos os relatos sobre a epidemiologia, características clínicas e patológicas da doença nesta espécie. Em um surto da raiva transmitida por um cão na China, os principais sinais clínicos foram agressividade e outros sinais cerebrais (10). Nos E.U.A., em 10 casos de raiva transmitida por animais silvestres, principalmente, guaxinins, mangoose e shunks, os sinais clínicos foram febre, agressividade, agitação, anorexia, prurido, paralisia progressiva, depressão e vocalização(6).

No Brasil existem vários relatórios de identificação do vírus rábico de suínos provenientes dos Estados do Pará (2), Tocantins (19), Goiás (9), Mato Grosso (16) e Rio Grande do Sul (21), mas não há relatos sobre a epidemiologia, sinais clínicos e as características patológicas da doença nesta espécie. Alguns desses vírus são originados de cães (9) e outros de morcego vampiro (2). O objetivo deste trabalho é apresentar, a epidemiologia, as características clínicas e patológicas de um surto de raiva transmitida por morcegos hematófagos em suínos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Em Junho de 2009, a secção de Patologia Animal do Hospital Veterinário pertencente à Universidade Federal de Campina Grande, Estado da Paraíba, recebeu dois animais apresentando sinais neurológicos. Os dois animais foram criados em uma pocilga com outros 28 suínos de diferentes idades, no município de Mãe D'Água, no semiárido da Paraíba. Os animais foram submetidos à eutanásia e necropsiado. Amostras de órgãos das cavidades torácicas e abdominais, todo o encéfalo e a espinal medula de um suíno, e metade do cérebro e da medula espinal de outro suíno foram fixados em formalina 10% tamponada. As amostras de órgãos e as amostras de cortes transversais do SNC, incluindo a medula espinal (cervical, torácica e lombar), cerebelo, córtex, pedúnculos cerebelares, bulbo, ponte, colículo rostral e caudal, hipocampo, tálamo, núcleos da base e cápsula

interna foram embebidos em parafina, seccionados em 4-5 fatias  $\mu\text{m}$  e corados com hematoxilina-eosina para exame histológico.

Fragmentos do cérebro e da medula espinhal do suíno 2, regiões semelhantes do exame histológico foram examinados para a raiva através do teste de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (ICC). Para o ICC, as suspensões foram preparadas a partir materiais do cérebro e da medula espinhal, amostras individuais foram macerados e diluídas para fazer uma suspensão de 20% (peso/volume) com uma solução de água destilada esterilizada contendo 2% (v / v) soro de coelho, penicilina (500 UI / ml) e estreptomicina (1.560 UI / ml). Após a centrifugação a 2.000 G por 10 minutos, um volume de 0,03 mL foram inoculadas em grupos de dez camundongos, de acordo com Koprowski (11). Camundongos foram observados diariamente durante 30 dias para os sinais de raiva, e a confirmação da raiva pela IFD. Os camundongos utilizados para fins de diagnóstico e procedimentos de isolamento do vírus foram camundongos de 21 dias de idade, albino suíço, CH3 linhagem Rockefeller, pesando 11-15 g, e mantida no infectório da UAMV/CSTR/UFCG. A IFD foi feita de acordo com a técnica de Goldwasser & Kissling (7) modificado por Dean et al. (5). Os dados históricos e clínicos foram obtidos através de entrevistas com os proprietários, e as informações epidemiológicas foi concluída após a inspeção da suinocultura.

O vírus rábico isolado do suíno identificado como PN169PB, foi submetido a extração de RNA de suspensão a 10 %, usando Trizol® (Invitrogen®), de acordo com a instrução dos fabricantes. RT-PCR foi realizado conforme descrito por Macedo *et. al.*(13). Para a construção do dendrograma, seqüências de DNA foram recuperadas do Genbank empregadas e alinhadas pelo método CLUSTAL/W, usando o programa BIOEDIT. Para a reconstrução filogenética foi utilizado o algoritmo de Neighbor-Joining utilizando o software MEGA software com 1000 repetições bootstrap (20).

## RESULTADOS

O primeiro animal apresentava sinais clínicos (Suíno 1) com 45 dias de idade, macho, demonstrando paralisia flácida dos membros pélvicos durante dois dias, que presumivelmente foi diagnosticado como trauma. Na necrópsia, as lesões graves não foram

observadas. Ao exame histológico, encefalomielite não-supurativa com manguitos perivasculares composto por linfócitos, células plasmáticas e raros macrófagos, gliose multifocal ou difusa, neuronofagia, hemorragias e vasculite foram observados, na substância cinzenta (Fig. 1). Estas lesões foram leves em todas as regiões do tronco cerebral, grave na medula espinhal e ausente no telencéfalo. As lesões foram semelhantes aos da raiva, uma visita à fazenda foi realizada para obter dados epidemiológicos. Durante a visita, um outro animal (Suíno 2) foi encontrado com sinais nervosos e conduzida ao Hospital Veterinário. Com 30 meses de idade uma porca prenhe, e os sinais iniciados oito dias antes do dia de visita. Mostrando anorexia e paresia seguida de paralisia dos membros pélvicos e cauda (Fig. 2). Durante o exame estava em decúbito lateral, adotando uma posição de cão sentado quando obrigada a ficar em pé. A sensibilidade cutânea e reflexo cutâneo encontravam-se severamente diminuídos. Na necropsia, não foram observadas lesões significativas. As lesões histológicas foram encefalomielite não-supurativa e meningite, com as mesmas características observadas no suíno 1 (Fig. 1). Essas lesões foram leves no telencéfalo e cerebelo e grave no tronco cerebral e medula espinhal. As leptomeninges eram difusamente infiltrada por células mononucleares com a presença de manguitos perivasculares.

Todos os fragmentos examinados foram negativos pela IFD e o tálamo, ponte, bulbo e medula cervical, medula torácica e lombar foram positivas pela ICC. O isolado suíno mostrou identidade máxima com o vírus da raiva bovina transmitida por morcegos *D. rotundus* do Estado de São Paulo (Fig. 3).

Os suínos ficavam localizados (Fig. 4A) próximo da periferia da cidade (Fig. 4B) e os suínos eram alimentados principalmente com resíduos domiciliares. A cidade é cercada por montanhas com grutas, rochas e cobertos por mata nativa (caatinga) típico da região semi-árida (Fig. 4 B-D). Nenhuma vacina ou vermifugação antes do surto de raiva foi realizada. Um dos proprietários lembrou que cerca de 6 meses atrás, ele notou a presença de um morcego dentro da pocilga e de sinal de mordedura em um animal. Após a confirmação do diagnóstico da raiva, ele foi aconselhado a vacinar os animais restantes. Oito dias após a vacinação com uma vacina anti-rábica comercial (raivacel®-Vallée) uma porca de adultos apresentou sinais clínicos semelhantes aos observados nos casos

anteriores, mas se recuperou em 10-12 dias. Não foram observados casos posteriores à vacinação.

## DISCUSSÃO

No Brasil, a raiva é frequentemente diagnosticada em bovinos e eqüinos (12). Ovinos e caprinos são menos afetados (12), a doença é rara em suínos. Na ausência de bovinos e equinos, que são os preferidos dos morcegos hematófagos, outras espécies, incluindo suínos são fonte alternativa de alimento para *D. rotundus* (1, 21). Apesar dos relatos sobre o isolamento do vírus da raiva em suínos há apenas raros relatos sobre os sinais clínicos da doença nesta espécie. Em um surto de raiva transmitida inicialmente por um cão, os principais sinais clínicos foram agressividade, hiperexcitação, e vocalização, dos suínos com raiva furiosa mordendo outros suínos, que posteriormente foram afetados com a forma furiosa da doença (10). Contradizendo, o surto descrito neste artigo os sinais clínicos foram exclusivamente da forma paralítica, semelhante ao observado na maioria dos casos de raiva bovina (12). Esses sinais clínicos são devidos à distribuição das lesões nos animais afetados, que apresentaram lesões graves na medula espinhal, em ambos os animais, leve (suíno 1) ou grave as lesões do tronco cerebral (suíno 2), e na ausência (suíno 1) ou lesões leves no telencéfalo (suíno 2). Ao nosso conhecimento este é o primeiro relatório sobre os sinais clínicos e patologia da raiva transmitida por morcegos hematófagos em suínos.

A sensibilidade da IFD para o diagnóstico da raiva de suínos é questionada. Yates et al. (22) encontraram quatro suínos negativos para IFD, mas positivo para ICC. Prins e Yates (17) analisaram 11 suínos, sendo um negativo na IFD, mas todos positivo na ICC. Também a ausência de corpúsculos de Negri nos casos relatados neste trabalho e em outros relatos (14) indica às dificuldades no diagnóstico da raiva em suínos, a importância do diagnóstico diferencial com outras encefalites virais desta espécie com lesões muito semelhante as da raiva (19). O rápido diagnóstico da raiva transmitida por morcegos em suínos também é muito importante porque, em algumas ocasiões, os casos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos foram precedidos por casos em suínos (15).

A tipagem genética do vírus indicou que o transmissor seria um morcego *D. rotundus*. A existência de cavernas na região favorece a presença de morcegos hematófagos e, conseqüentemente, a transmissão do vírus para outros animais, incluindo animais silvestres, que perpetuam o vírus no semi-árido brasileiro (8). Devido à gravidade da doença, é importante reforçar a vacinação de todos os animais, incluindo os suínos, para prevenir a doença nos animais e no homem. O Instituto Pasteur de São Paulo registrou de 1980 a 1995, um caso de raiva humana transmitida por um suínno, que é considerado um animal que oferece um risco médio (4). Como conseqüência, qualquer suíno com sinais neurológicos, deve ter a raiva como um diagnóstico alternativo, devido a possibilidade de transmissão humana.

### REFERÊNCIAS

1. Baer G. M. (1991). Vampire bat and bovine paralytic rabies, p. 389-404. In: BAER, G. M. The natural history of rabies. 2 ed. CRC, Boca Raton. 620 p.
2. Barbosa, T.F.S.; Medeiros, D.B.A.; Travassos da Rosa, E.S.; Casse, L.M.N.; Medeiros, R.; Pereira, A.S.; Vallinoto, A.C.R.; Vallinoto, M.; Begot, A.L.; Lima, R.J.S.; Vasconcelos, P.F.C.; Nunes, M.R.T. (2008). Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. *Viol.* 370, 228–236.
3. Bernardi, F.; Nadin-Davis, S.A.; Wandeler, A.I.; Armstrong, J.; Gomes A.A.B., Lima, F.S.; Nogueira, F.R.B.; Ito, F.H. (2005). Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *J. Gen. Virol.* 86, 3153-3162.
4. Costa, W.A.; Ávila, C.A.; Valentine, E.J.G.; Reichmann, M.L.A.B.; Cunha, R.S.; Guidolin, R.; Panachão, M.R.I.; Omoto, T.M.; Bolzan, V.L. (1999). Profilaxia da raiva humana. Manual Técnico do Instituto Pasteur - n.4
5. Dean, D.J.; Abelseth, M.K.; Atanasiu, P. (1996). The fluorescent antibody test. In: Meslin, F-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. Laboratory techniques in rabies. 4. ed. Geneva: World Health Organization, pp. 88-95.

6. DuVernoy, T. S.; Mitchell, K. C.; Myers, R. A.; Walinski, L. W.; Tinsley, M. O. 2008. The first laboratory-confirmed rabid pig in Maryland, 2003. *Zoon. Pub. Health.* 55, 431-435.
7. Goldwasser R.A. & Kissling R.E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98, 219-223.
8. Gomes, A. A. B. (2004). *Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil.* São Paulo, Brasil, 107p. (Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo).
9. Ito, M.; Itou, T.; Shoji Y.; Sakai, T.; Ito, F.H.; Arai, Y. T.; Takasaki, T.; Kurane, I. (2003). Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. clin. virol.* 26, 317-330.
10. Jiang, Y.; Yu, X.; Wang, L.; Lu, Z.; Liu, H.; Xuan, H.; Hu, Z.; Tu, C. 2008. Na outbreak of pig rabies in Hunan province, China. *Epidemiol. Infect.* 136, 504-508.
11. Koprowski, H. (1996). The mouse inoculation test. *In: World Health Organization. Laboratory techniques in rabies.* 4 ed. Geneve: WHO, pp. 80-87.
12. 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.
13. Macedo, C.I.; Carnielli, P.Jr.; Brandão, P.E.; Travassos da Rosa, E.; Oliveira, R.N.; Galera, J.; Medeiros, R.; Machado, R.; Oliveira, R.C.; Carrieri, M.L.; Kotait, I. (2006). Diagnosis of Human Rabies Cases by Polymerase Chain Reaction of Neck-Skin Samples. *Braz. J. Infect. Dis.* 10 (5), 341-345.
14. Morehouse, L.G.; Kintner, L. D.; Nelson, S. L. (1968). Rabies in swine. *J Am. Vet Med Assoc.* 153:57-64.
15. Ministério da Saúde. Raiva humana transmitida por morcegos no estado do Pará e Maranhão. Acesso : [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs) 22-02-2010.
16. Nociti, D.L.P.; Caramori Júnior, J.G.; Matta G.C.A.; Aguiar, D.M.. (2009). Raiva em suíno no estado de Mato Grosso - relato de infecção conjunta com bovino da mesma propriedade. *Arq. Inst. Biol.* 76 (2), 269-271.



17. Prins, L.; Yates, W.D.G. (1986). Rabies in Western Canada, 1978-1984. *Can. Vet. J.* 27, 164-169.
18. Silva, R.O.S.; Costa Filho, R.B.; Pessoa, L.C.D.; Pires, P.S.; Salvarani, F.M.; Soares Filho, P.M.; Assis R.A.; Lobato, F.C.F. (2008). Surto de raiva em suínos em Miracema, Tocantins, Brasil. *Ciênc. .Vet. Trop.*, 11 (2/3), 73-75.
19. Summers, B.A; Cummings, J.F.; Lahunta, A. (1994). Inflammatory diseases of the central nervous system. p. 95-188.In:Veterinary Neurophatology. Mosby, St. Louis, MO.
20. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. (2007). S MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24, 1596-1599.
21. Teixeira, T.F.; Holz, C.L.; Caixeta, S.P.M.B.; Dezen, D.; Cibulski, S.P.; Silva, J.R.; Rosa, J.C.A.; Schmidt, E.; Ferreira, J.C.; Batista, H.B.C.R.; Caldas, E.; Franco, A.C.; Roehe, P. M. (2008). Diagnóstico de raiva no Rio Grande do Sul, Brasil, de 1985 a 2007. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10),515-520.
22. Yates, W. D. G.; Rehmtulla, A. J.; McIntosh, D. W. (1983). Porcine rabies in Western Canada. *Can. Vet. J.* 24, 162-163.

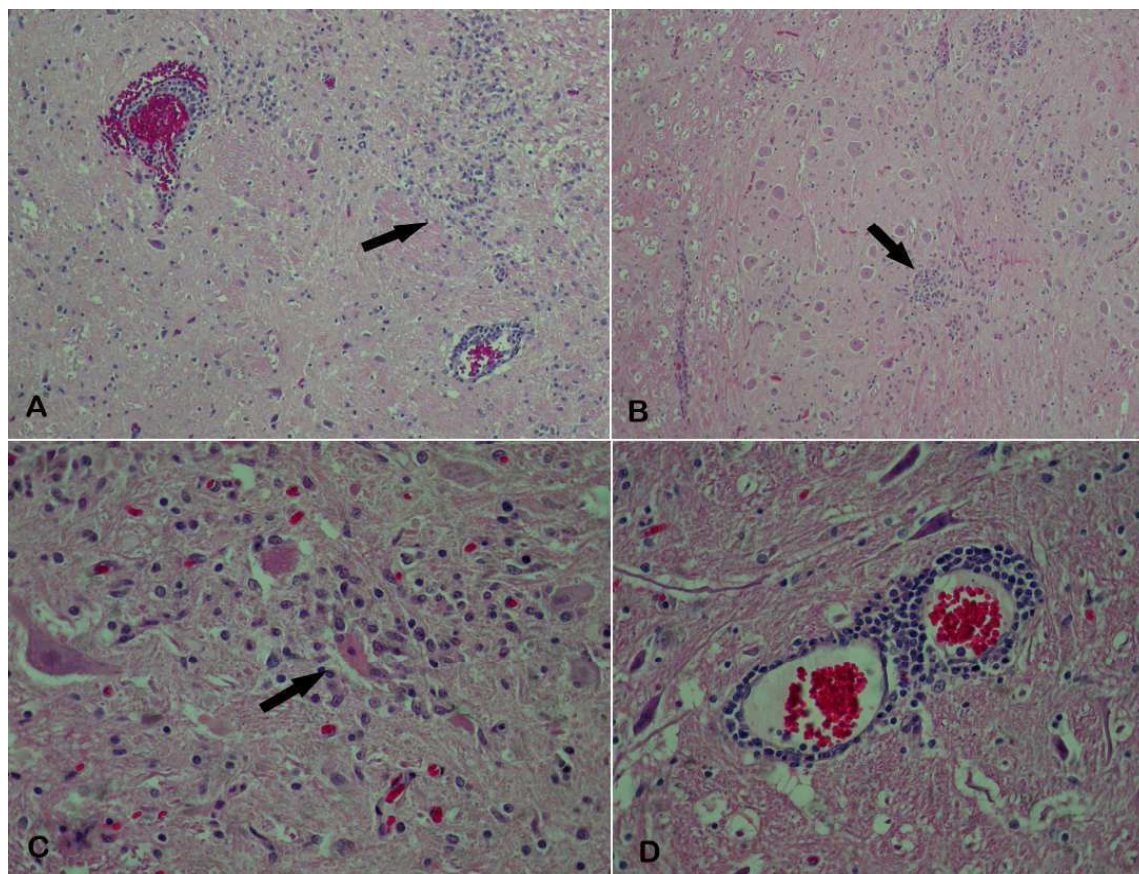


Fig. 1. Suíno 1. A) colículo rostral, Suíno 1. B) Medula oblonga, Suíno 1. C) Medula torácica, Suíno 1.. D) Medula oblonga, Suíno 2. Gliose focal (A e B) (setas), manguito perivascular (A e D), e neuronofagia (C) (setas) observadas. HE, x10 (A e B), e x40 (C e D).



Fig. 2. A porca (Suíno 2) afetadas pela raiva apresenta parálisia dos membros posteriores.

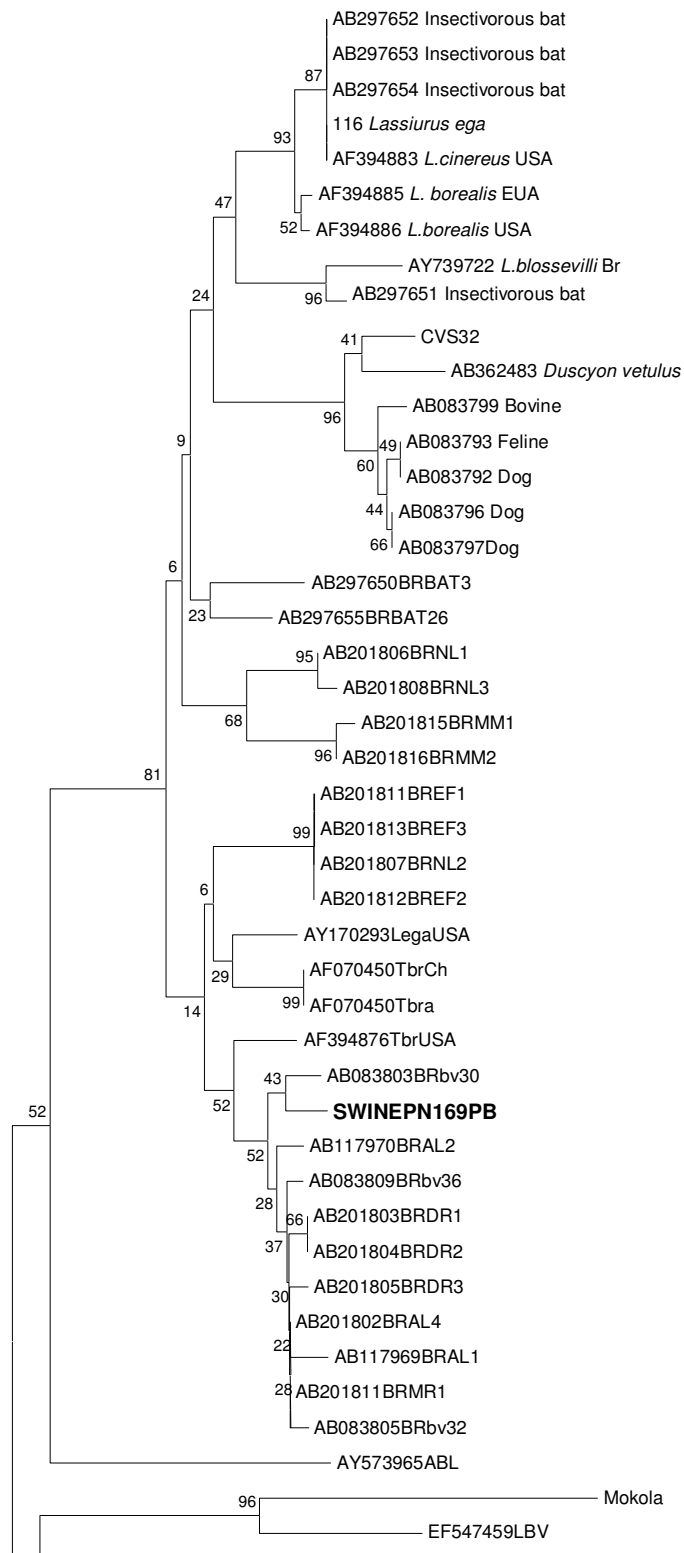


Fig. 3 Árvore filogenética para o gene parcial nucleoproteína RABV da amostra SWINEPNI69PB (em negrito) e seqüências homólogas obtidos a partir do Genbank. Os números em cada ramo são 1000 bootstrap repetições. A amostra foi SWINEPNI69PB situado no cluster de origem bovina, perto do grupo de morcegos hematófagos.



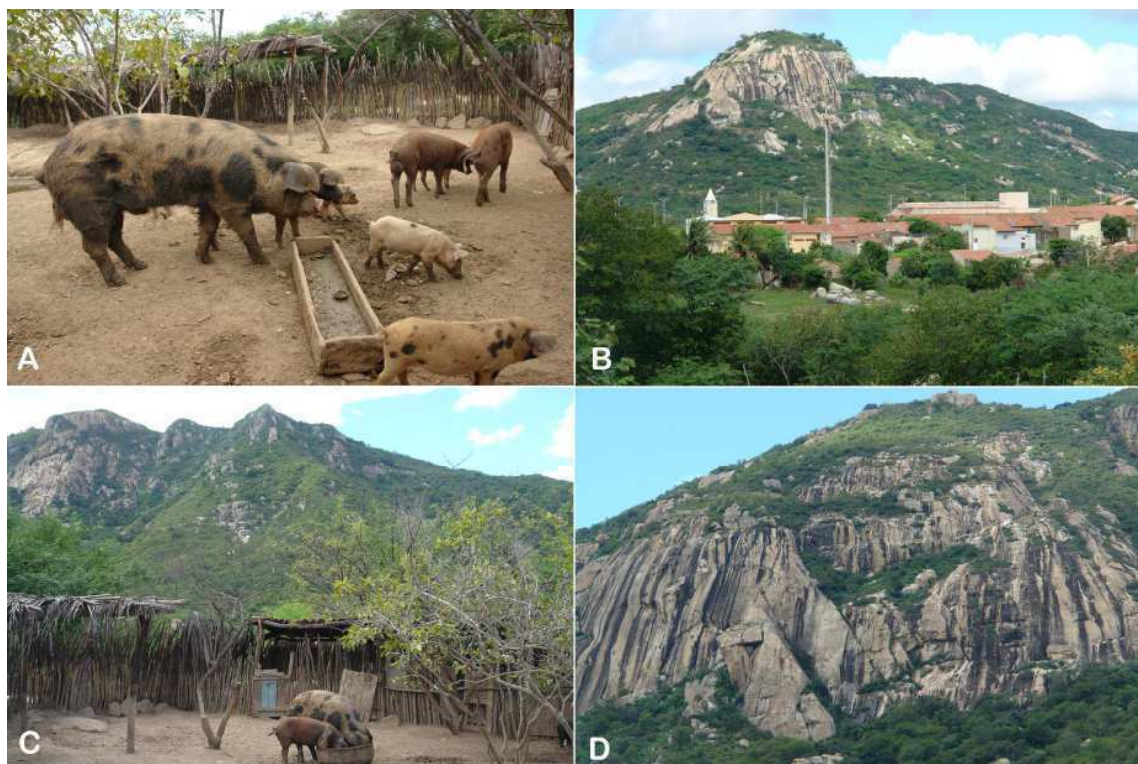


Fig. 4. O aspecto da pocilga (A e C) e da cidade (B), rodeado por montanhas com grutas, rochas e coberta por mata nativa (B, C e D).

# ANEXO 3

## **Encefalite Equina do Leste no Nordeste do Brasil**

Maria Luana Cristiny R. Silva<sup>6</sup>, Glauco J. N. Galiza<sup>1</sup>, Antônio F. M. Dantas<sup>1</sup>,  
Rafael de Novaes Oliveira<sup>2</sup>, Keila Iamamoto<sup>2</sup>, Samira Maria Achkar<sup>2</sup>, Franklin  
Riet-Correa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, 58700-000 Patos, PB.

<sup>2</sup> Instituto Pasteur, São Paulo, Brasil.

**Resumo** - Os surtos de encefalite eqüina leste ocorridos a partir de maio de 2008 a agosto 2009 nos estados brasileiros de Pernambuco, Ceará e Paraíba são relatados. A doença ocorreu em 93 fazendas acometendo 229 equídeos com uma taxa de letalidade de 80.27%. Os principais sinais clínicos foram andar em círculo, depressão ou hiperexcitabilidade, ataxia e paralisia progressiva com um curso clínico de 3-15 dias. As principais lesões histológicas foram encefalomielite difusa linfocítica com a morte neuronal, satelitoses, neuronofagia e hemorragias sendo mais intensa na massa cinzenta cerebral do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo. Alguns animais também apresentavam áreas de malácia no telencéfalo, tálamo e núcleo da base. O vírus foi isolado por inoculação em camundongos de um caso e 13 casos foram identificados como vírus da encefalite equina através do semi-nested RT-PCR. Após o seqüenciamento do genoma viral, todas as amostras foram identificadas como Encefalite eqüina leste através da análise blastn, mas as amostras dos estados do Ceará e Paraíba correspondiam ao mesmo cluster, e a amostra de Pernambuco a um cluster diferente.

**encefalomielite eqüina/ semi-nested RT-PCR/ laboratório de diagnóstico/  
semiárido brasileiro**

---

<sup>6\*</sup> Autor para correspondência: [franklin.riet@pq.cnpq.br](mailto:franklin.riet@pq.cnpq.br)

## 1. INTRODUÇÃO

Encefalite equina do leste (EEL) é uma zoonose, causada por um vírus da família *Togaviridae*, gênero *Alfavirus* [3]. Os vírus deste gênero estão associados, principalmente, com enfermidade do sistema nervoso central (SNC) de equídeos e humanos, que são os hospedeiros terminais, enquanto as aves infectadas normalmente atuam como reservatórios e não desenvolvem a enfermidade [18]. No entanto, aves domésticas e silvestres, incluindo faisões, emas e frangos de corte [18] têm sido frequentemente afetados e há registro da doença em outras espécies, incluindo ovinos [6], cães [14] e veados [35, 37].

Na América do Sul há apenas dois casos fatais de EEL relatados em humanos, um na Bahia, Brasil [2] e outro em Trindade em 1970 [10], enquanto que na América do Norte, existem mais de 100 casos fatais. Essa diferença pode ser atribuída a diferente patogenicidade das amostras e hábitos dos vetores. Weaver et al. [40], frisam que as variantes norte-americanas são mais virulentas para humanos e equinos do que as sul-americanas, sendo que a taxa de letalidade para humanos com a variante norte-americana varia de 50 a 75 % [41].

Mosquitos das espécies *Culiseta melanura*, *Coquilletidia perturbans*, *Ochlerotatus sollicitans*, *Aedes vexans* e *Culex erraticus* são os principais mosquitos transmissores do agente nos USA [39]. No Brasil existem relatos de isolamento do vírus em *Aedes (Ochlerotatus) fulvus*, *Aedes (Och.) taeniorhynchus*, *Culex (Culex) sp.*, *Culex (Melanoconion) sp.*, *Culex (Mel.) spissipes*, *Culex (Mel.) pedroi*, *Mansonia sp.* [38]. A transmissão do vírus aos equinos ocorre exclusivamente pela picada de mosquitos que previamente tenham realizado repasto sanguíneo em aves virêmicas [18].

No estado de São Paulo, Brasil, durante o período de 1978 a 1990, várias espécies de aves foram diagnosticadas positivas para EEL no teste de inibição da hemaglutinina incluindo *Porzana albicollis*, *Guira guira*, *Synallaxis spixi*, *Anabacerthia amaurotis*, *Troglodytes aedon*, *Passer domesticus*, *Geothlypis aequinoctialis*, *Thraupis sayaca*, *Tachyphocelus coronatus*, *Zonotrichia capensis* entre as aves residentes. Anticorpos foram detectados também em algumas aves



migratórias, como a *Columbina talpacoti*, *Thraupis palmarum*, *Sporophila caerulescens* *Machetornis rixosus* [17]. Nos estados do Amapá e Pará anticorpos foram encontrados em *Ramphocelus carbo*, *Thamnophilus aethiops* e *Phlegopsis nigromaculata* [38].

No Brasil, existem poucos relatos sobre o isolamento de EEL em cavalos [1, 7, 11, 27], e a maioria dos estudos da doença são baseados na presença de anticorpos que têm sido detectadas em cavalos, seres humanos e animais silvestres ou isolamento do vírus a partir de vetores, nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins, Ceará, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo [4, 8, 9, 13, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 36, 39]. Não há relatos detalhados sobre epidemiologia, sinais clínicos e patologia da doença. O objetivo deste trabalho é descrever a epidemiologia, sinais clínicos e patologia dos surtos de EEL que ocorreram em 2008 e 2009 nos estados de Pernambuco, Paraíba e Ceará, Nordeste do Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Dados epidemiológicos foram obtidos em visitas realizadas, de maio de 2008 a agosto de 2009, em 11 fazendas em Pernambuco, 40 no Ceará e 80 na Paraíba. Durante as visitas os animais acometidos foram clinicamente examinados e 14 necropsias foram realizadas. Durante as necropsias amostras de órgãos das cavidades abdominal, torácicas e de sistema nervoso central foram coletadas para exame histológico. Estas amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%. Depois de fixados as amostras de cérebro e medula espinhal foram cortados transversalmente em fatias de 3 a 5 mm de espessura, e amostras de córtex frontal, parietal, temporal e occipital, hipocampo, núcleos da base, tálamo, colículos rostrais e caudais, ponte, cerebelo, medula oblonga, cerebelo e medula cervical, torácica e lombar, foram embebidas em parafina cortadas com 4-5  $\mu\text{m}$  de espessura e coradas com hematoxilina e eosina.

Amostras de soro durante a doença clínica e depois de 15 dias, foram coletadas de dois cavalos não vacinados contra encefalite eqüina e foram enviadas

ao Instituto Biológico de São Paulo para determinar os títulos de anticorpos para encefalite eqüina, por meio de teste de neutralização em cultura celular.

Teste de imunofluorescência direta (IFD) foram realizadas em esfregaços de cérebro para raiva, de acordo com a técnica de Goldwasser & Kissling [19], com ligeira modificação descrita por Dean et al. [12]. A inoculação em camundongos (ICC) foi realizado em camundongos albinos recém-nascido, CH3-Rockefeller. Os camundongos foram inoculados com 0,03 mL de suspensão a 10% das amostras preparadas SNC de eqüinos necropsiados, de acordo com Koprowski [26]. Os camundongos foram observados diariamente durante 30 dias.

A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol® segundo orientações do fabricante, a partir do SNC dos eqüinos. Em 10 casos a extração foi realizada de um pool de tronco de encefálico e cerebelo e em três de medula cervical, hipocampo e córtex frontal. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de vírus fixo de encefalite eqüina do oeste (WEEV), cedido pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) e mantido em camundongos albinos suíços. Como controle negativo foi utilizada água ultra pura livre de DNase e RNase. Os controles positivo e negativo, juntamente com as 13 amostras de SNC foram submetidas à técnica de Semi-Nested RT-PCR dirigida para a amplificação de um fragmento de 310 pares de base (nucleotídeos 283 à 592) da proteína não estrutural 1 (NSP1) do gênero Alphavirus, segundo protocolo descrito por Pfeffer (1997).

Na reação de Semi-Nested PCR, foi utilizado um controle negativo para cada três amostras testadas, visando um maior controle sobre possíveis contaminações da reação. Os *primers* utilizados na Semi-Nested RT-PCR encontram-se descritos na Tabela I. O fragmento de 310 pb resultante da Semi-Nested RT-PCR foi purificado à partir de géis de agarose a 1%, com o Kit QIAquick® Gel Extraction Kit, de acordo com instruções do fabricante e quantificados com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) em gel de agarose a 2%, segundo instruções do fabricante.

Tabela I: Descrição dos primers usados no Semi-Nested RT-PCR

Primer	Sentido	usado	Seqüência	Posição no Genoma
A1	Sense	RT-PCR	5'AGAGCDTTTTTCGCAYSTRGCHW 3'	nucleotide 159-180
A2	Antisense	RT-PCR/Semi-Nested PCR	5'ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC 3'	nucleotide 563-592
A3	Sense	Semi-Nested PCR	5'TGYCCNVTGMDNWSYVCNGARGAYCC 3'	nucleotide 283-308

Para cada reação de seqüenciamento de DNA foram utilizados entre 2,5 a 10 ng de DNA. Os fragmentos de DNA foram submetidos ao seqüenciamento bidirecional de DNA, com os *primers* A2 e A3 em reações separadas, utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

A purificação da reação de seqüenciamento foi realizada por Sephadex™ G-50 (GE healthcare Bio-sciences), em placas com filtro Multiscreen HV com 96 orifícios. Após a purificação, as seqüências foram geradas em analisador genético automático ABI-3130 (Applied Biosystems™).

A confirmação do seqüenciamento e determinação da espécie viral foi realizada através do aplicativo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

A identificação do vírus realizada pelo Semi-Nested RT-PCR realizada em 13 equinos sendo um proveniente de Exú, estado do Pernambuco, um de Jaguaribe, dois de Várzea Alegre, estado do Ceará, dois de São João do Rio do Peixe, dois de Coremas, dois de Poço de José de Moura, um de Uiraúna, um Paulista e um de Patos, Paraíba.

### 3. RESULTADOS

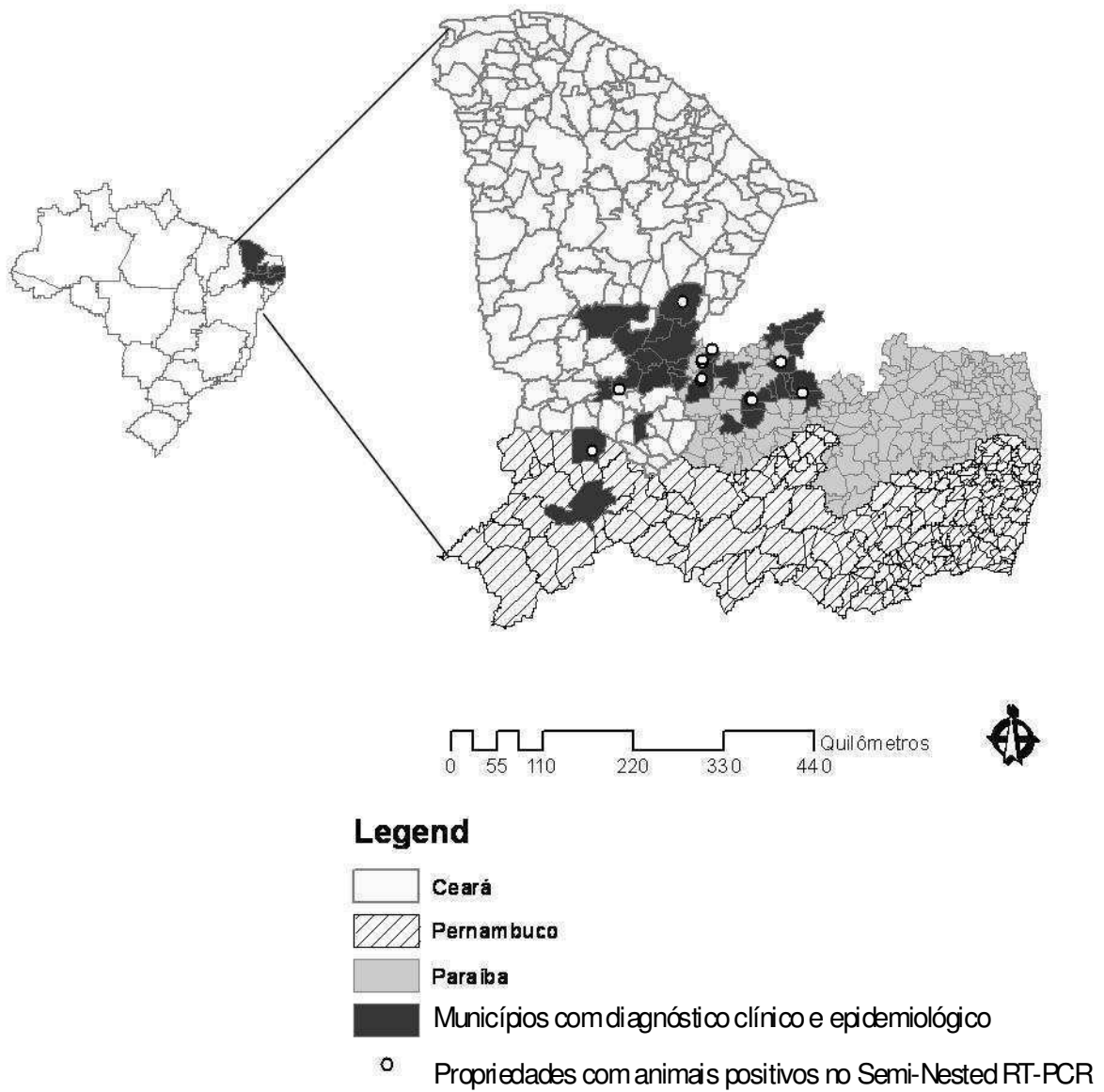
#### 3.1. Epidemiologia

O seqüenciamento dos isolados mostraram que a amostra de Pernambuco se agrupou em um cluster diferente do que das amostras isoladas do Ceará e da

Paraíba pertenciam a outro, indicando a ocorrência de dois surtos: um no Pernambuco em 2008 e outra na Paraíba e no Ceará em 2009. O primeiro surto ocorreu no estado de Pernambuco, de abril a agosto de 2008, foi notificado no município de Parnamirim, estendendo-se posteriormente para o município de Exu. 11 fazendas foram envolvidas no total, 60 cavalos morreram e apenas um recuperou-se.

Outro surto ocorreu no Ceará e Paraíba no período de março a julho de 2009. No Ceará a doença ocorreu nos municípios de Jaguaribe, Iguatu, Missão Velha, Faria Brito, Baixio, Acopiara, Cedro, Umari, Icó, Ipaumirim, Óros, Lavras da Manguabeira e Várzea Alegre, e na Paraíba, nos municípios de Cajazeiras, São João do Rio do Peixe, Coremas, Poço de José de Moura, Uiraúna, Brejo do Cruz, São José do Brejo do Cruz, Belém do Brejo do Cruz, Condado, São Bentinho, Cajazeirinhas, Catolé do Rocha, Paulista, Vista Serrana, São Francisco, Souza, Itaporanga, Piancó, São Bento, Malta, São José de Espinharas e Patos. A distribuição geográfica da doença encontra-se na Figura 1. Foram afetadas 40 propriedades no Ceará e 42 na Paraíba onde morreram 105 cavalos, um pônei e um asinino e se recuperaram 60 equinos e um muar. As taxas de letalidade observadas foram de 98,36% no foco de Pernambuco e 62,18% no surto do Ceará e Paraíba. Equídeos de todas as idades foram acometidos.

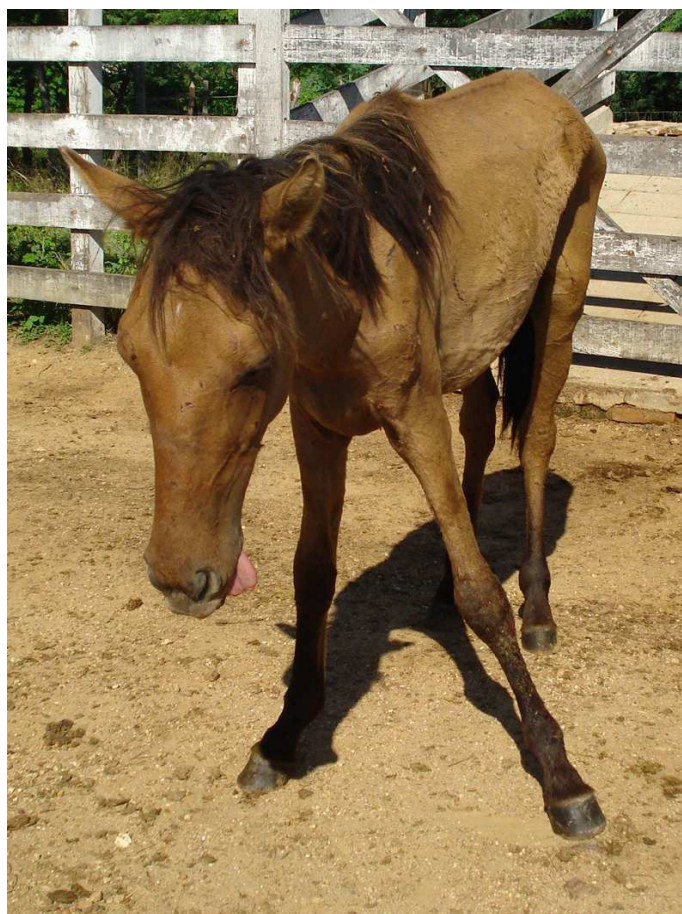
Figura 1. Mapa dos estados da Paraíba, Ceará, e Pernambuco mostrando os municípios que ocorreram os casos de encefalite equina leste.



### 3.2. Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos foram ataxia, andar em círculos, cegueira, pressionar a cabeça contra objetos, depressão ou hiperexcitabilidade, movimentos de lábio ou outros movimentos involuntários, paresia progredindo para paralisia, decúbito e coma (Figura 2). Febre, opistótono, paralisia da mandíbula ou lábio, aumento da base de sustentação, marcha hipermetrica, arpejamento, quedas, salivação e descarga nasal e ocular foram menos frequentemente observados. O período de manifestação clínica foi de 3-15 dias.

Figura 2. Cavalo acometido por encefalomielite equina leste no município de Jaguaribe, estado do Ceará, mostrando severa depressão, ataxia e paralisia da língua.



### 3.3. Patologia

Na necropsia, lesões traumáticas, incluindo opacidade de córnea, edema periocular subcutâneo, alopecia e erosões da pele em diferentes partes do corpo foram observadas em nove cavalos. Cinco animais apresentaram congestão dos vasos nas meninges. Após a fixação áreas vermelhas ou marrons foram observadas no córtex temporal e occipital de um cavalo (Figura 3).

Figura 3. Cérebro. Cavalo acometido por encefalomielite equina no município de Jaguaribe, estado do Ceará, mostrando áreas de malácia vermelhas ou marrom no córtex occipital.



Principais lesões histológicas foram uma encefalomielite linfocítica multifocal difusa com infiltrado perivascular com linfócitos, plasmócitos, macrófagos e alguns neutrófilos, vasculite com células endoteliais, morte

neuronal, satelitose, neuronofagia, hemorragias, edema e infiltração linfocítica multifocal no neurópilo (Figura 4-8). Essas lesões foram mais severas na massa cinzenta do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo. Lesões similares leves foram observadas no cerebelo e medula, principalmente na massa cinzenta. A distribuição e a gravidade das lesões inflamatórias em 14 cavalos são apresentadas na Tabela II. Em cinco casos raros eosinófilos foram observados nos exsudatos linfoplasmocitário. Nove casos mostraram meningite linfoplasmocítica com infiltrados perivascularares nas meninges cerebrais e, em quatro destes cavalos a meningite afetaram também o cerebelo. Áreas focais de malácia, com vacuolização do neurópilo e presença de macrófagos, neutrófilos, restos celulares e, ocasionalmente, células gutter foram observadas principalmente no telencéfalo, tálamo e núcleos da base. Esferóides axonais foram ocasionalmente observados. Outros órgãos examinados não apresentaram lesões significativas.

Figura 4. Núcleo da base. Cavalo acometido por encefalomielite equina do município de Exú, Pernambuco mostrando encefalite com manguitos perivascular linfoplasmocítico e gliose. H-E.





Figura 5. Núcleo da base. Cavalo acometido por encefalomielite eqüina do município de Exú, Pernambuco mostrando encefalite com manguitos perivascular com linfócitos, plasmócitos e macrófagos. H-E.

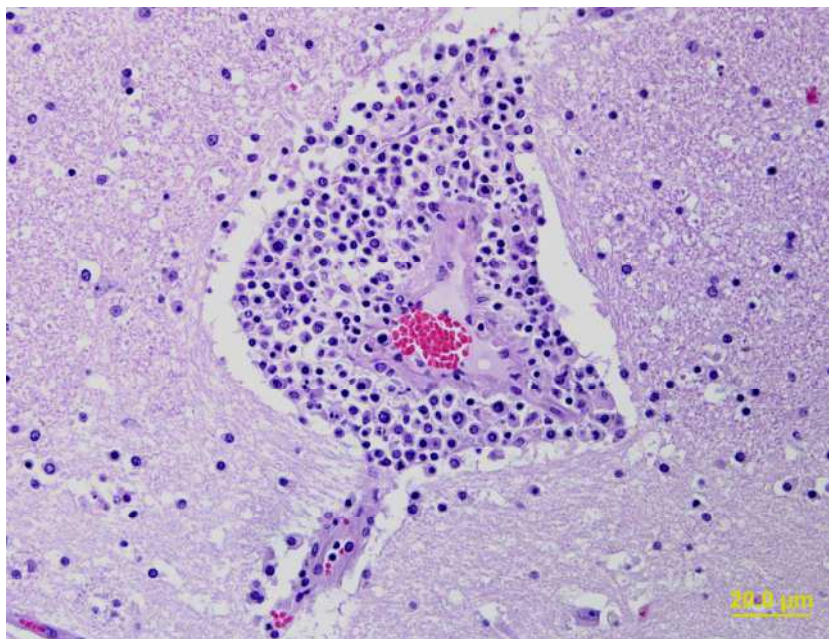


Figura 6. Hipocampo. Cavalo acometido por encefalomielite eqüina do município de Exú, Pernambuco mostrando neuronofagia. H-E.

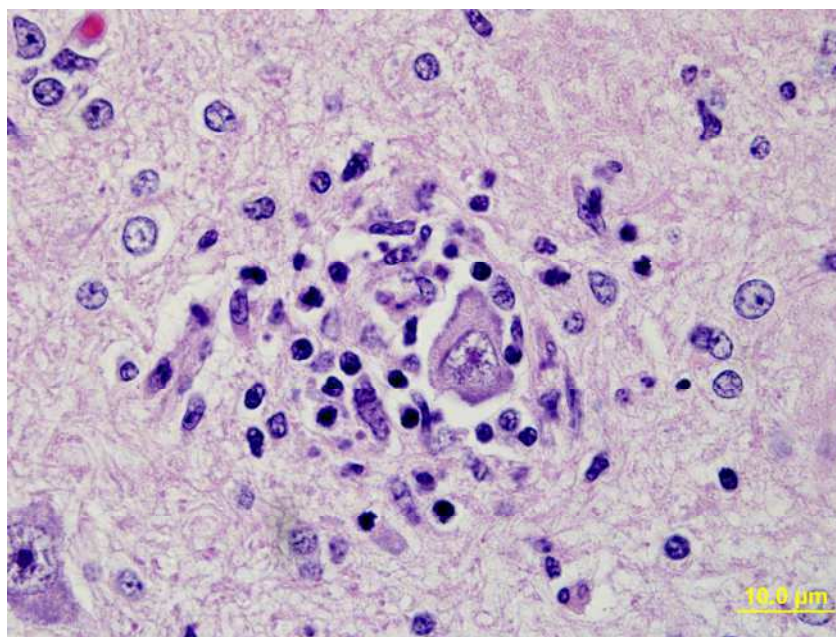


Figura 7. Núcleo da base. Cavalo acometido por encefalomielite eqüina do município de Exú, Pernambuco mostrando necrose neuronal com infiltrado inflamatório no neurópilo por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. H-E.

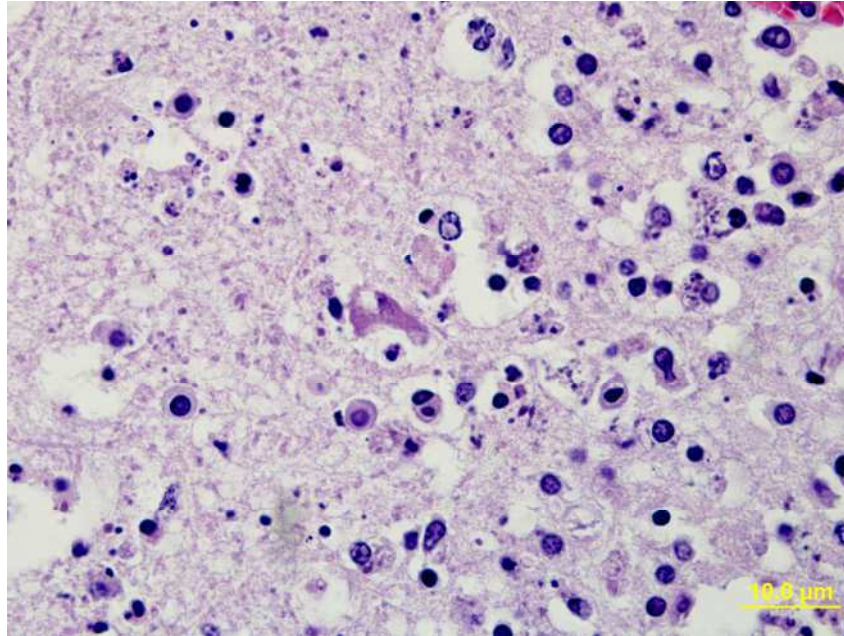


Figura 8. Tronco cerebral. Cavalo com encefalomielite eqüina do município de Exú, Pernambuco mostrando graves hemorragias. H-E.

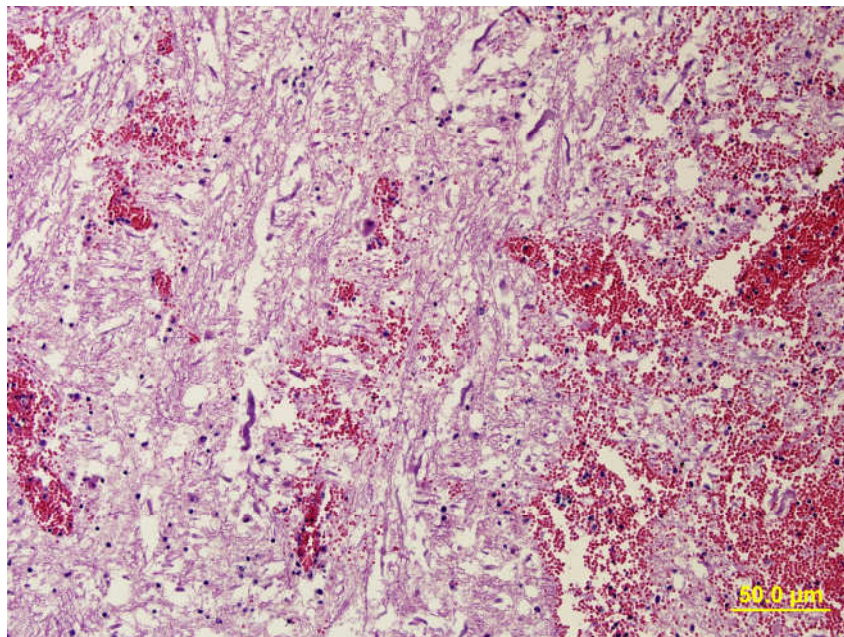




Tabela II: Distribuição e intensidade das lesões inflamatória histológica observada em 14 casos de encefalite equina leste no Nordeste do Brasil.

Caso	FC <sup>a</sup>	PC	TC	OC	BN	HY	TA	RC	CC	PO	MO	CE	MC	MT	ML
1	++	++	+	+	+++	+	++	++	++	+	+	-	+	-	-
2	+	+	+	+	++	-	++	++	+	+	+	-	+	-	-
3	+++	++	+++	++	+++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-
5	++	+	+	+	+	-	++	++	NE	NE	+	+	+	-	-
6	++	NE	+	+	++	NE	+++	++	++	NE	++	+	NE	NE	-
7	+	+	+	+	++	-	++	++	NE	++	+	+	+	-	NE
8	+++	+	+	+	+++	-	++	++	NE	++	+	+	NE	+	+
9	+	+	++	+	++	NE	+++	+	NE	+	+	NE	++	NE	+
10	+	++	++	+	+	++	++	+	NE	++	+	NE	+	-	-
11	+	+	+	+	+	-	++	+	+	+	+	NE	+	-	+
12	+	+	+	+	+	-	++	++	++	+	+	-	+	+	+
13	++	+	+	+	++	NE	++	++	+	NE	NE	+	-	+	-
14	+	+	+	+	++	-	++	++	++	+	+	+	+	+	-

<sup>a</sup>CF= córtex frontal, CP= córtex parietal, CT= córtex temporal, CO= córtex occipital, BN= núcleo basal, HY= hipocampo, TA= tálamo, RC= colículo rostral, CC= colículo caudal, PO= ponte, MO= medula oblonga, CE= cerebelo, MC= medula cervical, MT= medula torácica, ML= medula lombar; NE= não examinado; - ausente, + discreta, ++ moderada,+++ acentuada

### 3.4. Diagnóstico laboratorial

As amostras de soro pareadas provenientes de dois cavalos, os títulos de anticorpos contra EEL foram 1:10 e 1:10 na primeira amostra, aumentando para 1:320 e 1:160 na segunda.

Os camundongos inoculados aos cinco dias de idade começaram apresentar sinais a partir de 24 horas após inoculação. Os animais se isolavam da ninhada, deixavam de mamar e apresentavam dificuldade respiratória e paresia evoluindo para paralisia flácida. A morte ocorreu dentro de um período de seis horas após os primeiros sinais. Após 48 horas de inoculação dos camundongos neonatos, a mãe apresentou sintomatologia nervosa incluindo andar em círculo, pressão da cabeça na caixa e paresia dos membros pélvicos evoluindo para paralisia flácida e morte 72 horas após a inoculação dos camundongos, não ocorreu canibalismo. O vírus isolado dos camundongos foi confirmado como da EEL por Semi-nester RT-PCR.

Todas as amostras de SNC submetidas à Semi-Nested RT-PCR, foram positivas para o gênero *Alphavirus*. Após o seqüenciamento do genoma viral, todas as amostras positivas foram classificadas como EEL através do aplicativo BLASTn. Dados publicados separadamente do seqüenciamento mostram que as amostras provenientes do Ceará e Paraíba corresponderam a um mesmo cluster, e a amostra de Pernambuco a outro cluster.

#### 4. DISCUSSÃO

Nesses surtos o diagnóstico presuntivo de EEL foram realizados pela epidemiologia, clínica e patologia da doença, e confirmado pelo isolamento do vírus e semi-nested RT-PCR, e pelo título de anticorpos que aumentou em dois cavalos recuperados da doença. Os resultados do seqüenciamento dos isolados revelou que o surto, em 2008, em Pernambuco, foi causado por uma variante diferente da variante que ocorreu no Ceará e na Paraíba em 2009. O diagnóstico dos dois surtos de EEL no semiárido dos três estados do Nordeste representa a primeira descrição completa da doença no Brasil, incluindo a epidemiologia, sinais clínicos, patologia e identificação do vírus.

Durante as visitas às fazendas, alguns proprietários e veterinários experientes comentavam que essa doença era conhecida como "roda" (circulando) e ocorre periodicamente na região. A ocorrência de dois surtos de EEL no final da estação chuvosa, sugere que a doença é sazonal e epidemia na região semiárida.

A região do semiárido é caracterizada por um clima quente com uma temperatura média de 26°C e precipitação de aproximadamente 800 mm anuais, e em algumas regiões apenas de 500-600 mm. As chuvas são caracterizadas pela irregularidade, ocorrendo anos sem chuvas significativas ou de baixa pluviosidade. O período chuvoso é curto, iniciado em janeiro-fevereiro a abril maio. A umidade é baixa, variando de 60% para 75%, e a vegetação, típica da *caatinga* (do Tupi-Guarani: *caa* (mata) + *tinga* (branca) = mata branca) é o único bioma exclusivamente brasileiro e ocupa quase 11% do território nacional. A vegetação tem características de adaptação às condições de aridez (xerófila) com

forte presença de arbustos com galhos retorcidos e com raízes profundas e a presença de cactos e bromélias. Os arbustos perdem, quase que totalmente, as folhas em épocas de seca [5].

A variação sazonal da EEL, bem como de outras arboviroses, está associada à temperatura e pluviosidade adequada e outros fatores ambientais que determinam a densidade de vetores [22]. Os índices pluviométricos na Paraíba, no ano de 2009, ficaram entre os mais altos nos últimos 15 anos (Figura 9), sugerindo que o aumento das chuvas é um fator importante para a ocorrência de surtos, que ocorrem preferencialmente no final da estação chuvosa (Fig. 10), quando há um aumento na população de vetores.

Figura 09. A média anual de 16 municípios (Belém do Brejo do Cruz, Cajazeiras, Catolé do Rocha, Condado, Coremas, Itaporanga, Malta, Patos, Sousa, São Francisco, Vista Serrana, Poço de José de Moura, São Bentinho, São José do Brejo do Cruz, Uiraúna, São João do Rio do Peixe) da Paraíba onde ocorreram EEL. Dados da Agência Executiva das águas do Estado da Paraíba. <http://www.aesa.pb.gov.br/2009>.

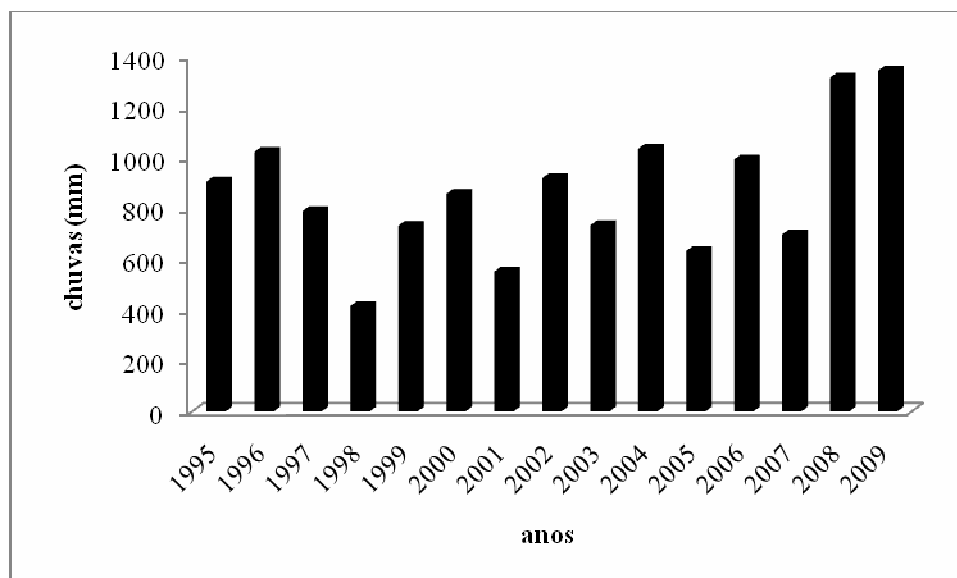
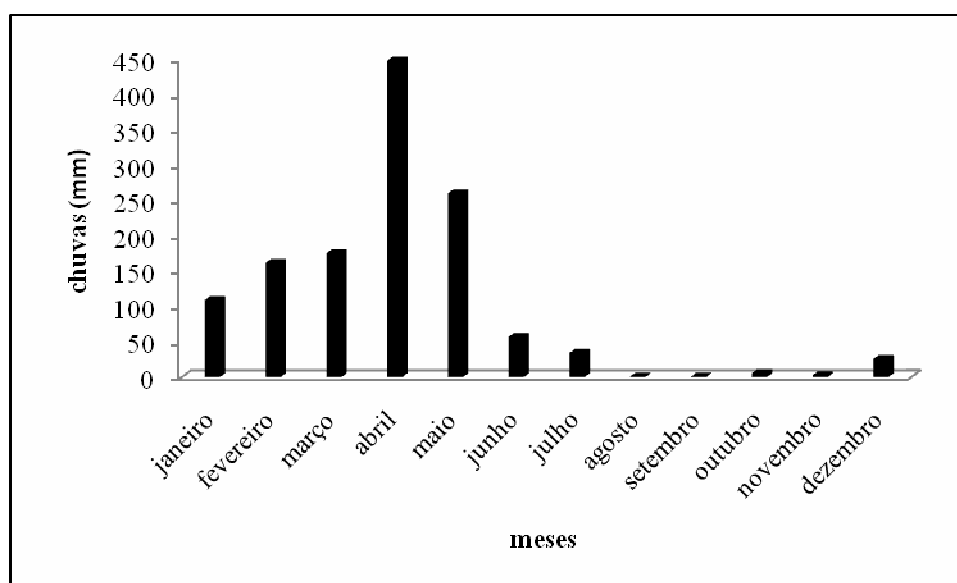


Figura 10. Meses do ano de janeiro a dezembro de 2009, nos municípios (Belém do Brejo do Cruz, Cajazeiras, Catolé do Rocha, Condado, Coremas, Itaporanga, Malta, Patos, Sousa, São Francisco, Vista Serrana, Poço de José de Moura, São Bentinho, São José do Brejo do Cruz, Uiraúna, São João do Rio do Peixe) da Paraíba onde ocorreram EEL. Dados da Agência Executiva das águas do Estado da Paraíba. <http://www.aesa.pb.gov.br/2009>.



A observação da taxa de mortalidade sugere que o isolado do primeiro surto mostrou-se ser mais patogênico que o isolado do segundo surto. O vírus da EEL é considerado mais patogênico do que o vírus da encefalomielite eqüina venezuela e oeste, embora ocorra considerável variação na patogenicidade [15, 21].

Características epidemiológicas (epidemia e sazonal), bem como sinais clínicos, principalmente cerebral, e a presença de uma encefalite linfocítica hemorrágica e necrosante difusa pode diferenciar EEL de raiva, intoxicação por *Crotalaria retusa*, e leucoencefalomalácia que são doenças comuns de cavalos no semiárido brasileiro [34]. Raiva e intoxicação por *C. retusa* são doenças endêmicas no semi-árido brasileiro, a encefalomielite da raiva é menos grave, sem necrose ou hemorragia, e na intoxicação por *C. retusa* apresenta lesões hepáticas

características de alcalóides pirolizidínicos. Em leucoencefalomalácia a história da alimentação com milho e a malácia da substância branca é uma característica que permitem o diagnóstico diferencial.

Apesar da epidemiologia, sinais clínicos e patologia permitirem o diagnóstico presuntivo da doença, é necessária a apresentação de amostras para diagnóstico laboratorial, a fim de determinar o agente etiológico da encefalite. Essa identificação é muito importante para a vigilância de arboviroses eqüinas devido à sua natureza, origem e importância em saúde pública, além de perdas econômicas.

## REFERÊNCIAS

- [1] Alice F.J., Encefalomielite eqüina na Bahia, estudo de três amostras isoladas. *Revista Brasileira de Biologia* (1951) 11:125-144.
- [2] Alice F.J., Infecção humana pelo vírus leste da encefalite eqüina. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia* (1956) 3:3-9.
- [3] Acha P.N., Szyfres B., Encefalitis Equina Del Este, In: Acha P.N., Szyfres B. (Eds.) *Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2:81-94, 2003.
- [4] Aguiar D.M., Cavalcante G.T., Lara M.C.C.S.H., Villalobos E.M.C., Cunha E.M.S., Okuda L.H., Stéfano E., Nassar A.F.C., Souza G.O., Vasconcellos S.A., Labruna M.B., Camargo L.M.A., Gennari S.M., Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do município de Monte Negro, Rondonia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* (2008) 45(4):269-276.
- [5] Atlas do meio ambiente do Brasil/Embrapa. 2ª ed., Brasília; EMBRAPA/SPI: Terra Viva. 1996.

- [6] Bauer R.W., Gill M.S., Poston R.P., Kim D.Y., Naturally occurring Eastern Equine Encephalitis in a Hampshire wether. *J. Vet. Diagn. Invest.* (2005) 17:281–285
- [7] Carneiro V., Cunha R., Estudos sobre a encephalomyelite infecciosa dos eqüídeos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.* (1943)14:158-193.
- [8] Causey O.R., Causey C.E., Macedo, D.N.G., Isolamento e identificação do vírus da encefalomielite eqüina leste no Pará. *Rev Serv Espec. Saud. Pub.* (1958) 10 (1):75-77.
- [9] Causey O.R., Shope RE, Suttmoller P, Laemmert H., Epizootic Eastern Equine Encephalitis in the Bragança Region of Para, Brazil. *Rev Serv. Espec. Saud. Pub.* (1962) 12:40-45.
- [10] Corniou B., Ardoin P., Bartholomew C., Ince W., Massiah V., First isolation of a South American strain of eastern equine virus from a case of encephalitis in Trinidad. *Trop Geogr Med* (1972) 24:162-167.
- [11] Cunha R. Estudos sobre uma amostra de vírus da encefalomielite eqüina isolada de material proveniente de Recife. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.* (1945) 14:201.
- [12] Dean D.J., Abelseth M.K., Atanasiu P., Fluorescent antibody test. In: Meslin F-X, Kaplan M. M, Koprowski H., editors. *Laboratory techniques in rabies.* Geneva: World Health Organization; (1996) 88-95.
- [13] Dégallier N., Hervé J.P., Travassos da Rosa A.P.A., Vasconcelos P.F.C., Travassos da Rosa J. F. S., Sá Filho G. C. A ecologia dos arbovírus na Amazônia: Pesquisas atuais e perspectiva. *Rev. Fund. SESP.* (1986) 31(2):127-129.
- [14] Farrar M.D., Miller D.L., Baldwin C.A., Stiver S.L., Hall C.L. Eastern equine encephalitis in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* (2005) 17:614–617.
- [15] Fenner F., Bachmann P.A., Gibbs E.P.J., Murphy F.A., Studdert M.J., White D.O. *Virología Veterinaria.* Zaragoza. Acribia (1987) 465-488.
- [16] Fernández Z., Richartz R., Travassos da Rosa A., Soccol V., Identificação do vírus causador de encefalomielite eqüina, Paraná, Brasil. *Rev Saúde Pública.* (2000) 34:232-235.



- [17] Ferreira I.B., Pereira L.E., Rocco I.M., Marti A.T., Souza L.T.M., Iversson L.B., Surveillance of arbovirus infections in the atlantic forest region, state of São Paulo, Brazil. I detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. *Rev. Inst. Med. Trop São Paulo* (1994) 36 (3):265-274.
- [18] Flores E.F. *Togaviridae*. In: Flores E.F. *Virologia veterinária*. Ed. da UFSM. (2007) 593-612.
- [19] Goldwasser R.A.; Kissling R.E., Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1958) 98:219-223.
- [20] Heinemann M.B., Souza M.C., Cortez A., Ferreira F., Homem V.S.F., Ferreira-Neto J.S., Soares R.M., Cunha E.M.S., Richtzenhain L.J., Soroprevalência da encefalomielite eqüina do leste e do oeste no município de Uruará, PA, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, (2008) 43:137-139.
- [21] Holbrook M.R., Gowen B.B., Animal models of highly pathogenic RNA viral infections: Encephalitis viruses. *Ant. Res.* (2008) 78:69-78.
- [22] Iversson L.B., Travassos da Rosa A.P.A., Rosa J.T. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. *Rev. Sal. Pub.* (1981) 15:587-602.
- [23] Iversson L.B., Travassos da Rosa A.P.A., Rosa J.T., Costa C.S. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. *Rev. Sau. Pub.* (1982) 16:160-170.
- [24] Iversson L.B., Travassos da Rosa A.P.A., Rosa J.T., Pinto G.H., Macedo O., Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. *Rev. Sau. Pub.* (1983) 17:423-435.
- [25] Iversson L.B., Silva R.A.M.S., Travassos da Rosa A.P.A., Barros V.L.R.S. Circulation of eastern equine encephalitis, western equine encephalitis, ilhéus, maguari and tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, south america. *Rev. Inst. Med. Trop.* (1993) 35(4):355-359.
- [26] Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. Fourth edition. Geneva: World Health Organization; (1996) 80-86.

- [27] Kotait I., Peixoto Z.M.P., Coimbra T.L.M., Cunha E.M.S., Queiroz L.H., Macruz R., Nagamori, A.H., Isolamento e identificação do vírus da Encefalomielite Equina, tipo Leste, em equinos do estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* (1992) 59:37-41.
- [28] Lennette E., Fox J.P., Anticorpos neutralizantes para a amostra leste do vírus de encefalomielite equine em equídeos no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* (1943) 38(1):85-92.
- [29] Lopes O.S., Sacchetta. Epidemiological studies on eastern equine encephalitis virus in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* (1974) 16(5):253-258.
- [30] Nilsson M.R., Sugay W., Ocorrência de encefalomielite equina em Itaporanga, Estado de São Paulo. *Arq Inst Biol.* (1962) 29:63-68.
- [31] Pereira O.A., Moreira L.P., Rojas E. Encefalomielite equine em conchas, São Paulo, Brasil: Incidência de anticorpos inibidores da hemaglutinação no homem e em equídeos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* (1962) 4(3):149-151.
- [32] Pereira O.A., Nilsson M.R.; Sugay W., Trapp E.E. Ocorrência de encefalomielite equina em Itaporanga, estado de São Paulo (Brasil). II Estudos sorológicos. *Rev. Inst. Med. Trop.* (1964) 6(1):1-4
- [33] Pfeiffer M., Proebster B., Kinney R. M., Kaaden O. R. Genus-specific detection of alphaviruses by a Semi-Nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1997) 57:709-718.
- [34] Pimentel L.A., Oliveira D.M., Galiza G.J.N., Rego R.O., Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2009. 29(7):589-597.
- [35] Schmitt S.M., Cooley T.M., Fitzgerald S.D., Bolin S.R., Lim A., Schaefer S.M., Klupel M., Maes R.K., Hogle S.A., O'Brien D.J., An outbreak of eastern equine encephalitis virus in free-ranging White-tailed deer in Michigan. *Journal of Wildlife Diseases* (2007) 43(4):635-644.
- [36] Silva W.B.P., Pereira O.A.C., Kirchner E., Godoy C.V.F. Ocorrência de arboviroses no estado de São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* (1967) 9(2):90-94.

- [37] Tate C.M., Howerth E.W., Stallknecht D.E., Allison A.B., Fischer J.R., Mead D.G., Eastern Equine Encephalitis in a Free-ranging White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Wildlife Diseases* (2005) 41(1):241–245.
- [38] Vasconcelos P.F.C., Travassos da Rosa J.F.S., Travassos da Rosa A.P.A., Degallier N., Pinheiro F.P., Sá Filho G.C. Epidemiologia das Encefalites por Arbovírus na Amazônia Brasileira. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo.* (1991) 33:465-476.
- [39] Villari P., Spielman A., Komar N., McDowell M., Timperi R.J. The economic burden imposed by a residual case of eastern encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1995) 52: 8–13.
- [40] Weaver S.C., Powers A.M., Brault A.C., Molecular epidemiology studies of veterinary arboviral encephalitides. *Vet J.* (1999) 157:123-138.
- [41] Zacks M.A., Paessler S. Encephalitic alphaviruses. *Veterinary Microbiology* (2010) 140 (3-4):281-286.

# ANEXO 4

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através dos e-mails [jurgen@ufrrj.br](mailto:jurgen@ufrrj.br), ou [pyb@pyb.com.br](mailto:pyb@pyb.com.br), com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras "pesadas"), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

**NOTE:** Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista ([www.pyb.com.br](http://www.pyb.com.br)) e o modelo em Word (PDF anexo). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short Communications) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações acionáveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS.

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) suplementarmente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes.

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P. V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores.

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMINOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente.

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO.

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho.

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local.

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos.

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los.

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho.

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé.

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que se incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pyb.com.br](http://www.pyb.com.br)).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" ([www.pyb.com.br](http://www.pyb.com.br)). O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Insert" do Word, pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade.

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas referências serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriqueiramente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano": trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados e feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971; Priester & Hayes 1974; Lemos et al. 2004; Kramerer-Froetzer et al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como objetos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser enviadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor, havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto auto-explicativas com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

# ANEXO 5



- [Escopo da revista](#)
- [Submissão de manuscrito](#)
- [Publicação de manuscrito](#)
- [Preparação de manuscrito](#)

ISSN 1517-8382 *versão  
impressa*

ISSN 1678-4405 *versão  
online*

### **Escopo da revista**

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, notas prévias e trabalhos de revisão que cobrem todos os aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;
- **Notas Prévias:** são textos concisos, relativos a novas metodologias e resultados parciais, cuja originalidade justifique a publicação rápida;
- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

### **SEÇÕES**

#### **Microbiologia Industrial: Fermentação Bacteriana**

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por bactérias.
- Aspectos moleculares de biotecnologia bacteriana.

#### **Microbiologia Industrial: Fermentação Fúngica**

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por fungos.
- Aspectos moleculares de biotecnologia fúngica.

#### **Microbiologia de Alimentos: Tecnologia de Alimentos**

- Aplicações de microrganismos (bactérias e fungos) na produção de alimentos.

#### **Microbiologia de Alimentos: Segurança e Qualidade dos alimentos**

- Doenças de origem alimentar.
- Deterioração de alimentos.
- Ecologia microbiana em alimentos.

#### **Microbiologia Médica: Patogênese Bacteriana**

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese bacteriana.

#### **Microbiologia Médica: Bacteriologia Clínica**

- Estudos sobre bactérias de importância médica.

#### **Microbiologia Médica: Patogenicidade de Fungos**

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese fúngica.

#### **Microbiologia Médica: Micologia Clínica**

- Estudos sobre fungos de importância médica.

#### **Microbiologia Ambiental: Ecologia Microbiana**

- Ecologia de grupos microbianos naturais; diversidade microbiana de ambientes naturais, como água, solo, sedimentos e organismos superiores.
- Interações microbianas.

#### **Microbiologia Ambiental: Biotecnologia**

- Aspectos ambientais de saúde pública.
- Biodegradação.
- Biorremediação.
- Considerações ambientais para microrganismos geneticamente modificados.

#### **Fisiologia de Fungos**

- Bioquímica de fungos, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

#### **Fisiologia de Bactérias**

- Bioquímica de bactérias, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

#### **Genética e Biologia Molecular de Fungos**

- Genética de fungos, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

#### **Genética e Biologia Molecular de Bactérias**

- Genética de bactérias, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

#### **Genética e Biologia Molecular de Vírus**

- Genética de vírus, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

#### **Microbiologia Veterinária**

- Doenças de animais
- Controle e/ou tratamento de animais
- Diagnóstico de patógenos de animais
- Patógenos veterinários ou zoonóticos

### **Submissão de manuscrito**

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.



## Publicação de manuscrito

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

### ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996), e os "Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>) devem ser respeitados.

## Preparação de manuscrito

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em PDF. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.**

Para **artigos originais**, o arquivo em PDF deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **notas prévias**, o arquivo em PDF deve conter:

- Título
- Resumo (até 50 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave

- Texto não dividido em tópicos
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em PDF deve conter:

- Título
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

*Artigos Originais e Artigos de revisão* deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

*Notas prévias* devem conter 10 páginas. Figuras e tabelas devem estar restritas a, no máximo, duas figuras ou duas tabelas ou uma figura e uma tabela.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

As referências no texto devem ser citadas pelos seus números. As citações de autores no texto devem ser feitas de acordo com o seguinte exemplo: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that... Não use caixa alta para redigir o nome completo dos autores.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: [joroberts@uol.com.br](mailto:joroberts@uol.com.br)
- ATO Traduções: [www.atotraining.com.br](http://www.atotraining.com.br)
- Evanir Brunelli: [ive.brunelli@gmail.com](mailto:ive.brunelli@gmail.com)

## **ORGANIZAÇÃO**

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como “Effects of”, “Influence of”, “Study on”, etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do

texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado. O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser numeradas seqüencialmente em ordem alfabética, pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As referências devem ser citadas no texto por seus números com um espaço entre o número das referências (3, 7, 22). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo do *BIOSIS*. Todas as referências listadas devem ser citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem ser incluídas na lista final.

Exemplos:

**a. Artigos de Periódicos**

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S.; Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

**b. Artigos ou Capítulos de Livro**

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

**c. Livros**

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

**d. Patentes**

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

**e. Teses e Dissertações**

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

**f. Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

**g. Publicações na Web**

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

**h. Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection.

Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

Referências como “personal communication” ou “unpublished data” devem ser evitadas, embora se reconheça que às vezes elas devam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências. Referências consistem de artigos que são “aceitos para publicação” ou “no prelo”. No entanto, referências de artigos que são “submetidos” ou “em preparo” não são aceitas.

**AGRADECIMENTOS:** Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

**TABELAS:** cada tabela deve ser apresentada em folha separada e numerada seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas.

**FIGURAS:** cada figura deve ser apresentada em folha separada e numerada seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras.

**FOTOGRAFIAS:** as fotos devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução (no mínimo de 150dpi).

**Conflitos de Interesses**

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos

como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

### **DIREITOS AUTORAIS**

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; [bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

#### **Transferência de “Direitos Autorais”**

“O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores.”

Artigo n.º \_\_\_\_\_

Título \_\_\_\_\_ do Artigo:  
" \_\_\_\_\_

—  
"

Nome(s) do(s) Autor(es) \_\_\_\_\_ Assinatura(s) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

**Departamento de Microbiologia - ICB II - USP**

**Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Sala 214**

**Cidade Universitária**

**05508-900 São Paulo SP - Brasil**

**Tel. / Fax: +55 11 3813-9647**



# ANEXO 6

# *Veterinary Research*

## **Instructions for authors**

1. [Aims and scope](#)
2. [Types of papers](#)
3. [Submission of manuscripts](#)
4. [Peer review process](#)
5. [Style guide](#)
  - 5.1. [General presentation](#)
  - 5.2. [Title page](#)
  - 5.3. [Abstract and keywords](#)
  - 5.4. [References](#)
    - [Works listed in References](#)
    - [Works cited in the text](#)
  - 5.5. [Illustrations \(tables and figures\)](#)
  - 5.6. [Electronic-only material](#)
6. [Open Access Option](#)
7. [Ethical policy](#)
8. [The galley proofs and reprints](#)
9. [Copyright](#)

**Veterinary Research** publishes high quality and novelty papers focussing on **Animal Infection**. The fields of study are bacteriology, parasitology, virology, immunology, prion diseases and epidemiology. Food animals, companion animals, equines, wild animals (if the infections are of zoonotic interest and/or in relation with domestic animals), laboratory animals and animal models of human infections are considered. Studies on zoonotic and emerging infections are highly appreciated. The journal publishes original and review articles on:

- **New knowledge on pathogens** (viruses, bacteria, protozoa, helminths, fungi and prions) and on **host-pathogen interactions**. Papers elucidating molecular mechanisms of interactions between hosts and microbes are highly appreciated.

- **Immunity to pathogenic micro-organisms:** systemic and mucosal immunology of infected organisms. This encompasses fundamental studies on immune system of animals. The development and evaluation of new vaccines against pathogens will be considered.
- **Epidemiology related to infections.** Papers dealing with spread and/or transmission dynamics of infectious diseases will be favoured. Studies using mathematical modelling and developing or applying new epidemiological methods will be welcome if based on a biological application. Papers must be of general interest and have a general applicability. **Descriptive epidemiological studies, meta-analyses and studies providing information of geographically limited interest will not be considered.**

Specific aspects of treatment of diseases, pathological and clinical studies (including case reports), diagnosis tests and technical reports do not fall within the scope of the journal. Studies that are preliminary, of weak originality as well as negative results are not appropriate to the journal. Merely descriptive and correlative studies are not a priority. Papers must make an original and significant contribution to the field. Studies that are technically sound but do not make a significant advance in the knowledge of animal infections will not be accepted.

**Review articles are highly appreciated.** They should focus either on a pathogen or on analyses of the mechanisms of host-microbe interactions including epidemiological studies. The articles should present comprehensive, critical summaries of current knowledge in the field and should not be limited to a discussion of the author's work. Thematic issues composed of solicited review articles are also published.

## 2. Types of papers

Manuscripts should be written preferably in English (American or English usage is accepted, but not a mixture of these). Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by someone proficient in the English language.

**Original papers** should report the results of original research. The material should not have been previously published or submitted for publication elsewhere. Short notes are not published. Papers should be completely documented both by references to the literature and description of the experimental procedures employed. The article should be divided into 4 sections: 1. Introduction, 2. Materials and methods, 3. Results, 4. Discussion (2 separate sections for the Results and Discussion).

**Review articles** should cover subjects falling within the Aims and scope of the journal.

## 3. Submission of manuscripts

Veterinary Research accepts only [online submission](#). Please use the [Author's checklist](#) to be sure your manuscript fits the Instructions to authors.

The manuscript must be accompanied with a cover letter containing the following items:



1. The e-mail address of all authors.
2. The objectives and originality of the work as well as the main results. In addition, you must justify that your study has a general interest and, more specifically for epidemiological studies, that the information is not limited to the country in which the work has been performed.

#### 4. Peer review process

Before being sent to reviewers, manuscripts are pre-screened by the editorial office to check the main basic criteria that make the paper potentially suitable for Veterinary Research: accordance with the [Aims and scope](#) of the journal, nature of the study, originality of the results, quantity and quality of data, general conclusions, presentation of the work including the quality of the English language. If the paper does not fulfil these criteria, it may be rejected at this stage without review. Manuscripts that pass the pre-screening stage are normally sent to a minimum of two experts chosen by the Editors-in-chief. The identity of peer reviewers is kept confidential.

Only papers of high quality and novelty and of general significance are published. Manuscripts that, in the reviewers' opinions, require major revisions may be rejected, in particular if they are poorly written (style or language). If minor revisions are recommended by the reviewers, authors are expected to make the appropriate revisions within one month. For manuscripts requiring major revisions, the revised version must be sent to the Editorial Office within 2 months (4 months if additional data are needed). Revised manuscripts may be reviewed a second time. Revised manuscripts that are received after the deadline will not be considered.

#### 5. Style guide

##### 5.1. General presentation

The manuscript should be typed double-spaced (Times New Roman 12 pts) with margins of at least 3.5 cm at the top, bottom and sides, and sent in only one single RTF or Word file (use [Veterinary Research template](#)). Lines and pages should be numbered. Section headings should be numbered following the international numbering system (1., 1.1., 1.1.1., etc.).

Original articles should not exceed 30 double-spaced typed pages including figures, tables and references. The manuscript should be presented as follows: title page, abstract and keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references.

Review articles should not exceed 50 pages.

Tables and figures, with their captions, should not appear in the text, but be placed in separate files outside of the manuscript.

##### 5.2. Title page

The title page should include the following: the title of the article, which should be concise but explicit, the surname and forenames (in full) of each author, the department and institution

where the study was carried out, e-mail address of the corresponding author (this author being identified by an asterisk), a short title (running head) of no more than 45 characters, including spaces.

### 5.3. Abstract and keywords

The abstract (less than 250 words) should be in a form suitable for abstracting services. It should contain no paragraphs, footnotes, references, cross-references to figures and tables or undefined abbreviations.

Up to five keywords should be supplied, to assist the reader and facilitate information retrieval. Keywords may be taken from the title, abstract or text. The plural form and uppercase letters should be avoided.

### 5.4. References

In the reference list, the references should appear in alphabetical order, preceded by an Arabic numeral enclosed in square brackets. The authors' names are listed in alphabetical order and in chronological order for each author. The references are cited in the text by the corresponding number enclosed in square brackets.

All entries in the reference list must correspond to references in the text and vice versa. The titles of journals should be abbreviated according to the rules of the Biosciences Information Service (Biosis) or those of the International Organization for Standardization (ISO). Words for which no abbreviation is given should be written in full.

A style file that conforms to Veterinary Research is [available for EndNote](#).

#### – Works listed in References

The reference list must include articles published in print or online-only journals (as well as in press articles), books and book chapters. Examples are given below of the layout and punctuation to be used in the references.

**Article** (all authors must be mentioned)

[1] Zhang P., Chomel B.B., Schau M.K., Goo J.S., Droz S., Kelminson K.L., George S.S., Lerche N.W., Koehler J.E., A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella Quintana*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101:13630–13635.

#### **Article published in Veterinary Research**

In order to take advantage of the electronic version, articles now have a unique article number: **Vet. Res. (2010) 41:02** which refers to article **02** from volume **41**. Each volume corresponds to a calendar year.

### ***Article in press***

[2] Goudsmit J., Bogaards J.A., Jurriaans S., de Wolf F., Schuitemaker H., Miedema F., Lange J.M.A., Coutinho R.A., Weverling G.J., Loss of control of viremia in HIV-1 seroconverters with best prognosis and lowest viral load at setpoint, *Vaccine* (2004) doi:10.1016/S0264-410X(02)00075-0.

### ***Book***

[3] Dunn A., *Veterinary Helminthology*, William Heinemann Medical Books, London, 1978.

### ***Chapter in a book***

[4] Delatour P., Parish R., Benzimidazole anthelmintics and related compounds: toxicity and evaluation of residues, in: Rico A. (Ed.), *Drug Residues in Animals*, Academic Press, London, 1986, pp. 175–204.

### **– Works cited in the text**

Proceedings of meetings, abstracts, articles submitted for publication, unpublished data, personal communications, theses, letters, electronic material and websites should not appear in the reference list but should be cited in the text as footnotes as follows. However these reports must not appear in the Materials and methods section of an original article.

### ***Proceedings***

1 Mauget R., Legendre X., Comizzoli P., et al., Assisted reproductive technology in sika deer: a program to preserve endangered deer subspecies, in: Zomborsky Z. (Ed.), *Advances in deer biology*, Proc. 4th Int. Deer Biology Congress, Kaspovar, 1998, pp. 185–186.

### ***Thesis***

2 Mahamod A.M., A survey of blood copper levels in cattle in northern California, Master of Preventive Veterinary Medicine thesis, Davis, CA, USA, 1982.

### ***Electronic material***

3 Reeves J.R.T., Maibach H., *CDI, Clinical dermatology illustrated* (monograph on CD-ROM), 2nd ed., Version 2.0, CMEA Multimedia Group Producers, San Diego, 1995.

### ***Websites***

4 OIE, Surveillance and monitoring systems for bovine spongiform encephalopathy, in: International animal health code, APPENDIX 3.8.4. [on line] (2002) [http://www.oie.int/eng/normes/MCode/A\\_00157.htm](http://www.oie.int/eng/normes/MCode/A_00157.htm) [consulted 9 December 2002].

## 5.5. Illustrations (tables and figures)

Illustrations should be numbered in Arabic numerals for figures and Roman numerals for tables, and should be referred to in the text by their number: Figure 1, Table I. Lettering (symbols, numbers, etc.) should not differ from figure to figure and should be of sufficient size to remain legible after reduction. Title and legends should be written above the corresponding table or figure.

Figures should be original (i.e. not already reproduced). Photographs should be presented in the form of plates to be reproduced without reduction (maximum size 12.5 × 19 cm). The figure captions should be explicit so that the illustrations are comprehensible without reference to the text. Colour figures appear in black and white in the paper version but are in colour in the electronic version.

Figures and tables published elsewhere cannot be accepted without the prior consent of the publisher and the author(s).

## 5.6. Electronic-only material

If the material submitted by the authors is not essential to the content of the article or only of supplementary interest to the reader, it can be included as electronic-only material, i.e. accessible only electronically.

Electronic-only material may include but is not restricted to the following: tables; Appendices; Programmes; Images; Videos.

They should be registered as „Supplementary data” when submitting the manuscript. The file name should be the following: [article]\_olm.[extension]. Please give a brief description of the data in the cover letter.

File format should be viewable using free or widely available tools. Suitable formats are Word file, SWF, MOV, AVI, MPEG.

You should refer to this material in the manuscript, e.g. “Supplementary data Figure S1” or “Supplementary data Table S1”.

For more information on the submission of this material (file requirements, etc.), please contact the [Editorial Office](#).

## 6. Open Access Option

To favour a broad and easy access to all published scientific information, Veterinary Research is now offering the possibility for the authors to make their papers **freely available to all interested readers** (subscribers or non subscribers) as soon as the articles are published online (**authors should make a contribution**). Your article will also be available on Pubmed Central when published on the journal website.

## 7. Ethical policy

All studies involving animals must have been performed in compliance with guidelines outlined in the [International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences](#). Papers may be rejected on ethical grounds if standards of care or procedures performed on animals are not met.

## 8. The galley proofs and reprints

Proofs will be sent by electronic mail to the corresponding author indicated on the title page. They should be carefully corrected and returned to the publisher within 48 hours of reception. If this period is exceeded, the galleys will be proofed only by the editorial staff and printed without the authors' corrections.

The PDF file of the article will be provided free of charge to the corresponding author.

Note that the aim of proofreading is to correct errors that may have occurred during the production process. Only essential corrections are accepted (grammar or spelling mistakes for example). Any substantial modification of the text altering the content of the accepted version of the paper will re-open the revision process.

## 9. Copyright

As soon as the article has been published, the author is considered to have [transferred his rights](#) to the publisher. Requests for reproduction should be sent to the publisher.