

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

RAIVA EM MORCEGOS INSETIVOROS E RAPOSAS NO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA

JEANN LEAL DE ARAÚJO

PATOS-PB

2013



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

RAIVA EM MORCEGOS INSETIVOROS E RAPOSAS NO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA

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

Mestrando: Jeann Leal de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Antônio Flávio M. Dantas

Patos-PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

A663r Araújo, Jeann Leal de
Raiva em morcegos insetívoros e raposas no semiárido da Paraíba /
Jeann Leal de Araújo. – Patos, 2013.
47f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação em Medicina
Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e
Tecnologia Rural, 2013.

"Orientação: Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas"

Referências.

1. Patologia animal. 2. Animais silvestres. 3. Quirópteros. 4. Canídeos
I. Título.

CDU 616:619

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

RAIVA EM MORCEGOS INSETIVOROS E RAPOSAS NO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA

Dissertação elaborada por

JEANN LEAL DE ARAÚJO

Aprovado em

Banca examinadora

Prof. Dr. Antônio Flávio M. Dantas
UAMV da UFCG/CSTR/HV - PATOS/PB
(Orientador)

Prof. Dr. Albério Antônio de Barros Gomes
1º membro -UFCG/CSTR/Patos, PB

Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena
2º membro - UFPB/Centro de Ciências Agrárias/Areia - PB

Patos-PB
2013

"Pensar Alto, Sentir Hondo, Hablar Claro"

Andreas Madsen

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Joan e Lindaci, pelo dom da vida e por todo o apoio dado durante esses anos. A distância sempre dificultou nossa proximidade, mas eles sempre acreditaram em mim.

A todos os meus amigos que conquistei durante esses anos em Patos. A todos meus colegas de turma da graduação e do mestrado.

Aos queridos amigos da Mansão, Jefferson, Arthur, Olawo, Orestes, Mylton, Éfren e Emanuel. Mansão é mansão.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Animal, Talita, Lisanka, Luiza, Eduardo, Fabrício e Robério, que sempre contribuíram para meu crescimento como profissional.

A todos os amigos do GEAS, por quem tenho muito apreço. Espero poder continuar contribuindo com todos.

Ao Professor Flávio, que desde o início me estendeu a mão e se dispôs a me orientar. Aprendi muito nesse período e a Patologia Animal se mostrou uma nova paixão. Ande certo e conte comigo, Professor.

A todos os demais professores que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação, especialmente aos professores Riet, Almir e Sérgio.

A Nevinha por toda a colaboração profissional e pessoal. Obrigado pelos conselhos sinceros e palavras de conforto.

A Professora Aline Hoffman, pelo apoio e colaboração imensurável. Obrigado por nunca ter desistido de mim.

A toda equipe CIVET, que sempre acreditaram nas minhas ideias e me apoiou sempre que precisei. Sentirei muita falta da clínica. Um grande abraço a Segundo, Luciana, Luedja e Mariana.

A todos os animais que passaram por mim desde criança e fomentaram a vontade de trabalhar por eles. Em especial a Natasha.

A todos meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO I	14
ABSTRACT	15
RESUMO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
CAPÍTULO II	24
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	376
ANEXOS	377

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Pág.

FIGURA 1 - Raiva em morcegos insetívoros *M. molossus*. A. Cerebelo mostrando imunomarcção positiva para o antígeno da raiva no citoplasma de células de Purkinje (setas). B. Cerebelo sem imunomarcção (controle negativo). IHQ pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase, contra-corada com hematoxilina de Harris. Obj. 400x. Barra = 30µm..... 18

CAPÍTULO II

FIGURA 1 - Lesões histológicas de raposas com raiva. (A) Córtex occipital mostrando manguitos mononucleares perivasculares e corpúsculos de Negri (seta). (B) Hipocampo com múltiplos corpúsculos de Negri (setas). (C) Gânglio trigêmeo com infiltrado inflamatório mononuclear. (D) Glândula salivar com inflamação não supurativa..... 30

FIGURA 2 - Seções do encéfalo de raposas com raiva, submetidas à técnica de imuno-histoquímica. (A) Córtex e (B) Tronco encefálico (ponte) mostrando múltiplos agregados de grânulos amarronzados distribuídos no pericário e prolongamentos citoplasmáticos de neurônios, caracterizando imunomarcção positiva para raiva. (C) Córtex. Controle negativo (sem anticorpo). Barra = 20 µm..... 31

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Pág

TABELA 1 - Distribuição das lesões no SNC de raposas (<i>Cerdocyonthous</i>) com raiva de acordo com a intensidade da resposta inflamatória e presença de corpúsculos de Negri.....	32
---	----

RESUMO

A raiva é uma zoonose de etiologia viral de grande importância para a saúde pública, transmitida geralmente por animais domésticos e silvestres infectados. Essa dissertação é formada por dois artigos originais. O primeiro foi submetido ao *Journal of Wildlife diseases*, que relata 5 casos de raiva em morcegos insetívoros *Molossus molossus* no Laboratório de Patologia Animal (LPA) da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba. Todos os morcegos foram encontrados em diversas regiões da cidade de Patos, durante o dia prostrados e sem conseguir voar, submetidos a eutanásia e necropsiados para análises histopatológica e imuno-histoquímica (IHq) do sistema nervoso central (SNC). Nenhuma lesão foi evidenciada macro ou microscopicamente, porém houve forte marcação positiva para anticorpos monoclonais anti-raiva através da IHq. Em três casos encaminhados para a realização de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (ICC), também foram positivos para raiva. Morcegos *M. molossus* podem estar infectados com o vírus da raiva e desenvolver a doença, mesmo sem lesões histológicas do SNC, podendo ser uma fonte de infecção para o homem e para os animais domésticos na região. O segundo artigo, enviado para publicação na *Acta Scientiae Veterinariae*, relata 2 casos de raiva em raposas *Cerdocyon thous* no semiárido do Estado da Paraíba, caracterizando os aspectos histopatológicos da doença. As raposas foram encontradas com sinais neurológicos, submetidas a eutanásia e encaminhadas ao LPA para necropsia. Histologicamente, no SNC havia meningoencefalite não-supurativa aguda, difusa, com presença de infiltrado inflamatório constituído principalmente por linfócitos e plasmócitos, formando manguitos perivasculares mononucleares, associada a discreta gliose e corpúsculos de Negri em neurônios de diversas regiões do SNC. Inflamação semelhante também foi observada em gânglios nervosos periféricos, adrenais e glândulas salivares. Pela imuno-histoquímica, IFD e ICC foi confirmado o diagnóstico de raiva. O diagnóstico da raiva em raposas pode ser realizado pelas lesões microscópicas características observadas no SNC, auxiliado pela avaliação dos gânglios nervosos periféricos, glândulas salivares e adrenais que também podem apresentar lesões semelhantes. Os morcegos insetívoros e as raposas são reservatórios do vírus da raiva, podendo transmitir a doença para outros animais e para o homem na região semiárida da Paraíba.

Palavras-chave: Lyssavirus, animais silvestres, quirópteros, canídeos.

ABSTRACT

Rabies is a viral zoonosis of great importance to public health, usually transmitted by infected domestic and wild animals . This dissertation consists of two original papers. The first one was submitted to the Journal of Wildlife diseases, which reports 5 cases of rabies in insectivorous bats *Molossu smolossus* in Animal Pathology Laboratory (APL) of the Federal University of Campina Grande , Patos , Paraíba . All bats were found in different regions of the city of Patos, during the day prostrate and unable to fly, then euthanized and necropsied for histopathological analysis and immunohistochemistry (IHC) of the central nervous system (CNS). No macro or microscopically lesions were observed, but there was strong positive labeling for anti-rabies monoclonal antibodies by IHC. Three out of 5 cases were referred to performing direct fluorescent antibody test (FAT) and mouse inoculation test (MIT) also positive for rabies. Bats *M. molossus* may be infected with the rabies virus and develop the disease, even without lesions in the CNS and may be a source of infection to humans and domestic animals in the region. The second paper, submitted to publication in *Acta Scientiae Veterinariae*, reports two cases of rabies in foxes *Cerdocyon thous* in the semiarid of Paraíba state, characterizing the histopathological aspects of the disease. The foxes were found with neurological signs, euthanized and sent to the LPA for necropsy. Histologically, in the CNS was an acute non-suppurative meningoencephalomyelitis, diffuse, with inflammatory infiltrate composed primarily by lymphocytes and plasma cells, forming mononuclear perivascular cuffs associated with mild gliosis and inclusion bodies in neurons from various regions of the CNS. Similar Inflammation was also observed in peripheral ganglia, adrenal glands and salivary glands. The diagnosis of rabies was confirmed by IHC, FAT and MIT. The diagnosis of rabies in foxes can be accomplished by microscopic characteristic lesions observed in the CNS, supported by evaluation of peripheral nerve ganglia, salivary glands and adrenals that may also have similar lesions. Insectivorous bats and foxes are reservoirs of rabies virus and can transmit the disease to other animals and to humans in the semiarid region of Paraíba.

Key words: Lyssavirus, Wild animals, Chiropterans, canids.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença viral que acomete várias espécies de animais domésticos, selvagens e o homem, causando uma encefalomielite aguda, progressiva e fatal (Jackson & Wunner, 2007)

Nos últimos anos, a raiva em animais silvestres tem se mostrado cada vez mais importante na manutenção dessa doença não somente no ambiente selvagem, mas também no ciclo urbano. Variantes de raiva de morcegos, primatas e raposas tem sido associadas com quadros da doença em animais domésticos e no homem (Batista et al. 2009, Favi et al. 2002).

No Brasil os principais reservatórios silvestres da raiva são as raposas (*Cerdocyon thous* e *Pseudalopex vetulus*), o sagui (*Callithrix jacchus*), o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) e diversas outras espécies de quirópteros, incluindo morcegos insetívoros e frugívoros (Kotait et al, 2007).

Particularmente no Nordeste Brasileiro o hábito de criação de animais silvestres como animais de estimação, principalmente canídeos e primatas, é um fator de risco importante para a transmissão da raiva para animais domésticos e para o homem (Gomes et al. 2012).

O diagnóstico dessa patologia tem sido geralmente realizado através de IFD e ICC, enquanto que aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos tem sido raramente investigados nessas espécies animais (Sodré et al., 2010).

Este trabalho objetivou realizar a descrição histopatológica e imuno-histoquímica da raiva em morcegos e raposas encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande no semiárido da Paraíba, Brasil, no período de 2010 a 2013.

REFERÊNCIAS

Batista, H.B.C.R; Caldas,E; Junqueira, D.M; Teixeira, T.F; Ferreira, J.C; Silva, J.R; Julio; Rosa, C.A; &Roehle, P.M. 2009. **Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant**. Acta Scientiae Veterinariae.37(4):371-374.

Favi,M, Mattos,A.,Yung, V., Chala, E., López,R.,Mattos, C. 2002. **First Case of Human Rabies in Chile Caused by an Insectivorous Bat Virus Variant**. Emerging Infectious Diseases .Vol. 8, No. 1.

Gomes, A.A.B.; Silva, M.L.C.R.; Bernardi, F.; Sakai, T.; Itou, T.; Ito. F.H. **Molecular epidemiology of animal rabies in the semiarid region of Paraíba, Northeastern Brazil**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.79, n.4, p.611-615. 2012.

Jackson, A. C. &Wunner, W. H. **Rabies**. Academic Press, New York, 2007

Kotait I, Carrieri ML, Carnieli-Junior P, Castilho JG, Oliveira RN, Macedo CI, et al. **Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública** [Internet]. São Paulo: Secretaria Estadual de Saúde. Publicação Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. Abril 2007. [Acesso em Abril de 2012].Disponívelem http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40_raiva.htm/

Sodré MM, Gama AR, Almeida MF. **Updated list of bat species positive for rabies in Brazil**.RevInst Med Trop São Paulo; 52:75-81.2010.

CAPÍTULO I

Raiva em morcegos insetívoros na região semiárida da Paraíba, Brasil

Trabalho enviado à revista Journal of Wildlife Diseases
Short communications

Raiva em morcegos insetívoros na região semiárida da Paraíba, Brasil

Jeann Leal de Araújo¹, Eduardo Melo Nascimento¹, Antônio Flávio M. Dantas¹, Glauco José N. Galiza², Pedro Miguel Ocampos Pedrosa³, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva¹, Franklin Riet-Correa^{1,4}

¹Laboratório de Patologia Animal. Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Jatobá, Patos, PB, Brazil. CEP: 58700-970. ² Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM. Camobi. Santa Maria , RS, Brazil. CEP 97105-900 ³ Laboratório de Patologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA, Brazil.CEP: 44380-000.⁴ Corresponding author: franklin.riet@pq.cnpq.br

Abstract - Five cases of rabies in the insectivorous bat *Molossus molossus* between 2006 and 2013, are reported in the city of Patos, state of Paraíba, northeastern Brazil. All cases were referred to the Laboratory after being found prostrate and unable to fly during the day, in different neighborhoods of the city. At necropsy and histologic examination no significant lesions were observed. On immunohistochemistry, the brain of the five cases showed strong positive labeling for rabies, in the form of large corpuscles or multiple clusters of granules within the perikaria of neurons in different areas of the brain, mainly in neurons of cerebral cortex and cerebellar Purkinje cells. Three cases tested by direct immunofluorescence and mice inoculation were also positive for rabies. These data demonstrate that bats *M. molossus* may be infected with the rabies virus and develop the disease, even without histologic lesions of the Central Nervous System, and can be a source of infection by for humans and domestic animals in the region.

Keywords: Chiropteran, Immunohistochemistry, lyssavirus, Wildlife

RESUMO - Cinco casos de raiva em morcegos insetívoros *Molossus molossus*, no período de 2006 a 2013, são relatados na cidade de Patos, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Todos os animais foram encaminhados para o laboratório depois de ter sido encontrados prostrados e incapazes de voar durante o dia, em diferentes bairros da cidade. Na necropsia e exame histológico não foram observadas lesões significativas. Através da imuno-histoquímica, o cérebro dos cinco morcegos mostraram forte marcação positiva para a raiva, sob a forma de grandes corpúsculos ou múltiplos agregados de grânulos dentro do pericário de neurónios em diferentes áreas do encéfalo, principalmente em neurónios do córtex cerebral e células de Purkinje do cerebelo. Três casos testados por imunofluorescência direta e inoculação em camundongos também foram positivos para a raiva. Estes dados demonstram que os morcegos *M. molossus* podem ser infectados com o vírus da raiva e desenvolver a doença, mesmo sem lesões histológicas do sistema nervoso central, podendo ser uma fonte de infecção para os seres humanos e para animais domésticos na região.

Termos de indexação: Quirópteros, imuno-histoquímica animais selvagens, lyssavirus.

A raiva é uma doença viral que pode afetar diferentes espécies de animais e seres humanos, causando encefalomielite aguda e fatal transmitida por mordidas ou arranhões de animais infectados, principalmentecarnívorosdomésticos, morcegos e outros animais silvestres (Kotait et al, 2007; Jackson & Wunner,2007). Os principais reservatórios silvestres brasileiros do vírus são os canídeos selvagens (*Cerdocyon thous* e *Pseudalopex vetulus*), sagüis (*Callithrix jacchus*), morcegos hematófagos(*Desmodus rotundus*), e diversas outras espécies de morcegos, incluindo morcegos insetívoros e frugívoros (Kotait et al. 2007).

Os morcegos têm um papel relevante na cadeia de transmissão da raiva (FAO, 2011). O interesse das autoridades de saúde em raiva em morcegos não-hematófagos começou na década de 1950, quando um menino foi atacado por um morcego insetívoro *Lasiurus intermedius*. A partir daí, morcegos insetívoros, frugívoros, onívoros, polinívoros e piscívoros foram diagnosticados positivos para a raiva (Jackson & Wunner, 2007).

Nos EUA, entre 1986 e 2011, 44 dos 67 casos de raiva estavam associados com morcegos não-hematófagos e um com uma variante de *D. rotundus* (CDC, 2012). Em alguns casos, que a transmissão está associada com morcegos não-hematófagos, a mordida não é percebida pelo paciente em um estágio inicial e a assistência médica adequada é comprometida (Kotait et al., 2007).

Na Colômbia, as variantes do vírus da raiva de morcegos insetívoros *Molossus molossus* e *Eptesicus brasiliensis* foram detectados em seres humanos e cães (Páez et al., 2003). No Brasil, *E. brasiliensis* e *M. molossus* são amplamente distribuídas e há relatos de positividade para raiva nessas espécies (Sodré et al., 2010). A notificação de casos de raiva em morcegos não hematófagos no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos, acompanhada por um aumento no número de casos relatados em outros animais selvagens (Uieda et al., 1995).

No Brasil, a raiva foi diagnosticada pelo teste de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (ICC) em 42 espécies de morcegos não-hematófagos e hematófagos (Sodré et al., 2010), no entanto, não existem estudos detalhados de raiva nesta espécie, caracterizando seus aspectos histológicos e imuno-histoquímicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever os achados patológicos e imuno-histoquímicos de raiva em morcegos insetívoros diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, na região semi-árida da Paraíba, Brasil.

Os morcegos foram identificados de acordo com a chave proposta por Gregorin & Taddei (2002), eutanasiados e necropsiados. Fragmentos de órgãos da cavidade torácica e abdominal e do sistema nervoso central (SNC) foram coletados e fixados em formol tamponado a 10%. Posteriormente, foram incluídos em parafina, cortados em seções de 5µm, e corados com hematoxilina e eosina para análise histopatológica.

Fragmentos do cérebro, cerebelo, tronco cerebral e da medula espinhal de três casos foram analisados pelo teste de imunofluorescência direta (Dean et al., 1996) e inoculação intracerebral em camundongos (Koprowski, 1996).

Blocos de parafina com fragmentos do SNC foram selecionados e submetidos à técnica de IHQ para a detecção do vírus da raiva conforme protocolo descrito a seguir. Após desparafinização e reidratação dos tecidos, foi realizada recuperação antigênica com solução de citrato (pH 6,0) em forno micro-ondas, em potência máxima, por dez minutos. Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo policlonal anti-raiva produzido em cabras marcado com FITC (anticorpo conjugado de isotiocianato de fluorescência [Chemicon #5199]), diluído 1:1000 em PBS+Tween, e incubado por 60 minutos a 37 C°. O anticorpo secundário biotililado e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB+System HRP, Dako) foram utilizados consecutivamente, incubados à temperatura ambiente por 30 minutos e marcados através da adição do Liquid DAB + Substrate – Chromogen System (Dako) e contra corados com Hematoxilina de Harris. Como controle positivo foi utilizado seções histológicas de casos confirmados de raiva em bovinos. Como

controle negativo, as mesmas secções foram utilizadas, com substituição do anticorpo primário por PBS+Tween.

Os cinco morcegos foram identificados como *M. molossus*. Todos foram encontrados na parte da manhã ou final da tarde, prostrados e incapazes de voar, em diferentes bairros da cidade de Patos. Na necropsia não foram observadas lesões macroscópicas para justificar os sinais clínicos. Microscopicamente, não haviam alterações nos órgãos das cavidades torácica, abdominal e no SNC. Na imuno-histoquímica, o cérebro dos cinco casos mostraram forte marcação positiva para a raiva, sob a forma de grandes cospúsculos ou múltiplos agregados de grânulos no pericário de neurónios em diferentes áreas do encéfalo, principalmente no córtex cerebral e células de Purkinje do cerebelo (Fig. 1A). Os três casos submetidos à imunofluorescência direta e inoculação em camundongos também foram positivos para a raiva.

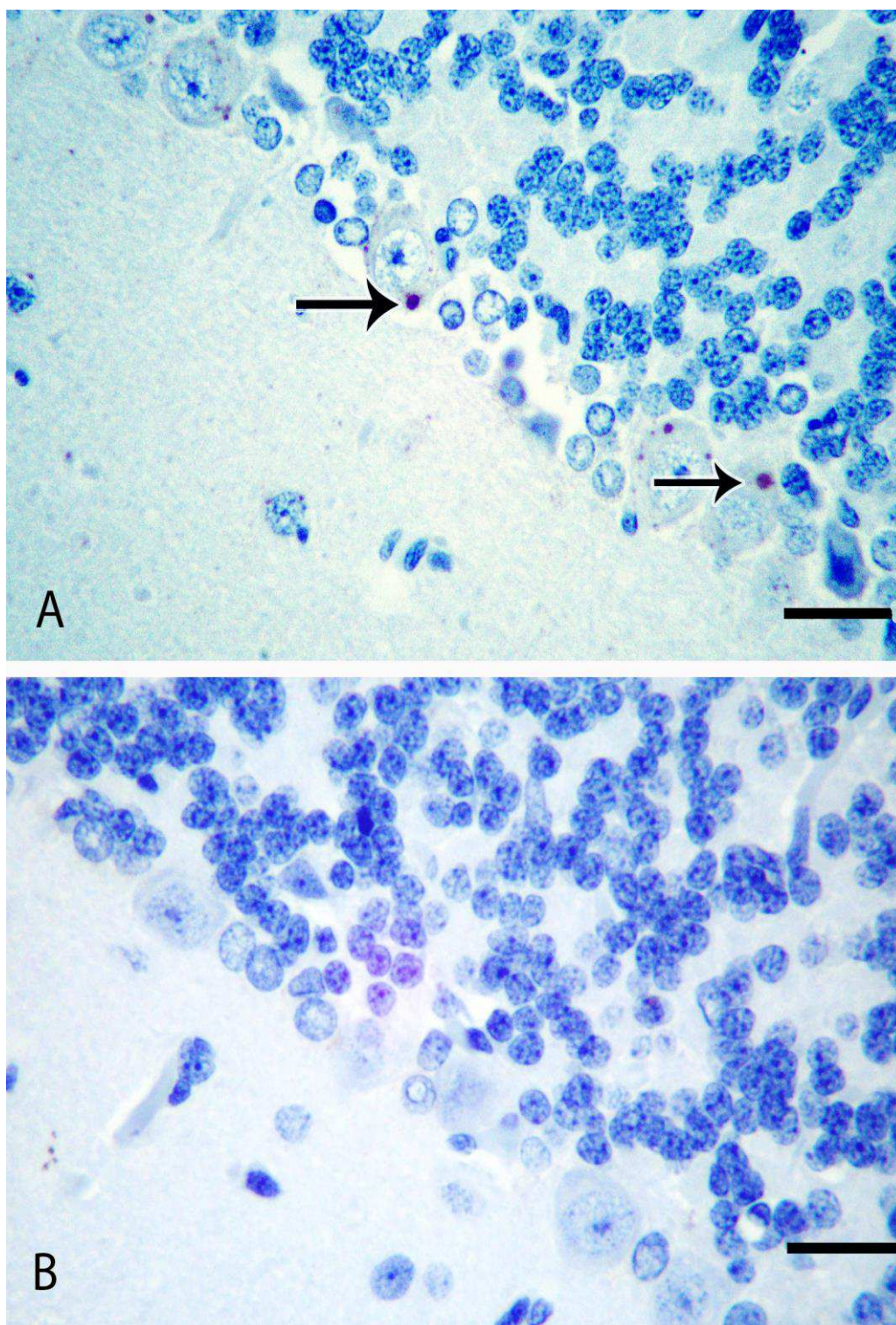


Figura 1 - Raiva em morcegos insetívoros *M. molossus*. A. Cerebelo mostrando imunomarcção positiva para o antígeno da raiva no citoplasma de células de Purkinje (setas). B. Cerebelo sem imunomarcção (controle negativo). IHQ pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase, contra-corada com hematoxilina de Harris. Obj. 400x. Barra = 30 μ m.

Os resultados deste estudo demonstram que os morcegos insetívoros identificadas como *M. molossus* estavam infectados pelo vírus da raiva, que foi demonstrado por imuno-histoquímica em cinco casos. Também todos os três casos submetidos à IFD e ICC foram positivos. Embora a histopatologia seja uma ferramenta importante no diagnóstico da raiva, em morcegos é raramente usada e os diagnósticos são geralmente feitos pela IFD e ICC (FAO, 2011; CDC, 2012). Em outras espécies, a imuno-histoquímica é um método auxiliar importante para o diagnóstico da raiva, especialmente nos casos em que encefalite não supurativa e inclusões virais não são observadas (Maxie & Youssef, 2007) e, quando não é possível a realização de imunofluorescência e inoculação em camundongos. De acordo com Tao et al. (2008), a sensibilidade e especificidade do imunohistoquímica são equivalentes a IFD e RT-PCR.

Uma observação importante nesses morcegos foi a ausência de meningoencefalite não-supurativa e corpúsculos de inclusões em cinco casos, sugerindo que a ausência de lesões histológicas, um evento raro em outras espécies (Maxie & Youssef, 2007), é comum em *M. molossus*. Em contraste, aos morcegos frugívoros australianos (*Pteropus* spp.) onde a raiva pode causar meningoencefalite e ganglioneurite associadas a corpúsculos de inclusões raros ou ausentes (Hooper et al. 1999). Em algumas espécies, como bovinos, a falta de lesões histológicas em casos de raiva tem sido relatadas, mas com positividade para imuno-histoquímica.

Na maioria dos casos, os sinais clínicos em morcegos estão associados com paresia ou paralisia, mas em alguns casos, morcegos com raiva também podem apresentar agressividade (FAO, 2011). A prostração e incapacidade de voo observada nos morcegos *M. molossus* estão provavelmente relacionadas com paralisia muscular envolvendo o sistema nervoso central. De acordo com Uieda et al. (1995), paralisia muscular é um achado comum em morcegos infectados com o vírus da raiva, o que explica a incapacidade de voar. Os sinais clínicos em morcegos geralmente refletem as mudanças no comportamento e função motora progredindo rapidamente à morte em poucas horas ou dias. Ambas as ordens, Microchiroptera e Megachiroptera, têm sinais clínicos, incluindo agressividade incomum, tolerância a humanos, brigas com outros morcegos, aumento da atividade e permanência longe do abrigo durante o dia, mordeduras e vocalizações, sendo muitas vezes encontrados no chão e incapazes de voar (Kotait et al. 2007).

Todos os morcegos examinados neste estudo foram provenientes de casas na região o que reflete o risco de transmissão da raiva para os seres humanos. Ao longo dos últimos anos, os morcegos não hematófagos têm demonstrado a sua importância na manutenção

da raiva no meio urbano, sendo responsáveis pela infecção acidental de cães e gatos (Kotait et al., 2007).

A transmissão da raiva aos seres humanos por morcegos frugívoros e insetívoros é rara, mas tornou-se uma importante fonte em áreas onde a raiva em carnívoros domésticos foi controlada (FAO , 2011) e a raiva transmitida por morcegos hematófagos não ocorre. No Sul do Brasil foi relatada a ocorrência de raiva em um cão doméstico, causada por uma variante do vírus associada com o morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* (Batista et al., 2009). No Chile um caso de raiva humana foi provocada pela mesma variante (Favi et ai. 2002). A capacidade do vírus da raiva de atravessar barreiras entre espécies e infectar outras espécies, chamada spillover, está intimamente ligado com a eficiência de sobrevivência do vírus na natureza (Kotait et al., 2007).

Conclui-se que a raiva ocorre entre morcegos *M. molossus* na cidade de Patos no Nordeste do Brasil e que servem como fonte de infecção para os seres humanos e animais domésticos. Esses morcegos podem desenvolver a doença, mesmo sem lesões microscópicas no sistema nervoso central. Também conclui -se que a imunohistoquímica é uma ferramenta eficaz no diagnóstico da raiva em morcegos insetívoros .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Batista, H.B.C.R; Caldas,E; Junqueira, D.M; Teixeira, T.F; Ferreira, J.C; Silva, J.R; Julio; Rosa, C.A; &Roehle, P.M. 2009. **Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant**. Acta Scientiae Veterinariae.37(4):371-374.

Centers for disease control and prevention. **National Center for infectious diseases**. Atlanta, USA. 2011, <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/>. Accessed December 2012.

Dean D.J., Ableseth M.K. &Atanasiu P. 1996.The fluorescent antibody test, In: Meslin F.X., Kaplan M.M. &Koprowski H. (Ed.), **Laboratory Techniques in Rabies**.4th ed. World Health Organization, Geneva. p.88-93.

Favi,M, Mattos,A.,Yung, V., Chala, E., López,R.,Mattos, C. 2002. **First Case of Human Rabies in Chile Caused by an Insectivorous Bat Virus Variant**. Emerging Infectious Diseases .Vol. 8, No. 1.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011.**Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests**. Edited by S.H. Newman, H.E. Field, C.E. de Jong and J.H. Epstein. FAO Animal Production and Health Manual No. 12. Rome.

Gregorin,R. & Taddei, V.A. 2002. **Chave artificial para identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia,Chiroptera)**. J.Neotrop. Mammal..p.13-22.

Hooper, P.T., Fraser, G.C., Foster, R.A., Storie, G.J. 1999.**Histopathology and immunohistochemistry of bats infected by Australian bat lyssavirus**.Aust Vet J. Vol 77, No 9.

Jackson, A. C. &Wunner, W. H. 2007. **Rabies**. Academic Press, New York.

Koprowski H. The mouse inoculation test.1996. In: Meslin F.X., Kaplan M.M. &Koprowski H. (Ed.), **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. World Health Organization, Geneva. p.80-86.

Kotait I, Carrieri ML, Carnieli-Junior P, Castilho JG, Oliveira RN, Macedo CI, et al. **Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública**. São Paulo: Secretaria Estadual de Saúde. Publicação Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. 2007. http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40_raiva.htm/. Accessed April 2012.

Maxie M.G. & Youssef S. 2007. Nervous system, p.281-456. In: MaxieM.G. (Ed.), **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Vol.1. Elsevier, Oxford.

Páez, A.; Nunez, C.; Garcia, C.; Boshell, J. 2003. **Molecular Epidemiology Of Rabies Epizootics In Colômbia: Evidence For Human And Dog Rabies Associates With Bats**. J EnVirol. 84 (Pt4): 798-802.

Sodré MM, Gama AR, Almeida MF. 2010. **Updated list of bat species positive for rabies in Brazil**. RevInst Med Trop São Paulo; 52:75-81.

Tao X.Y., Niezgodá M., Du J.L. & Li H. 2008. **The primary application of direct rapid immunohistochemical test to rabies diagnosis in China**. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du XueZaZhi 22(3):168-170.

Uieda W., Harmani N.M. & Silva M.M. 1995. **Rabies in insectivorous (Molossidae) bats of southeastern Brazil**. Revista de Saúde Pública. 29: 393-397.

CAPÍTULO II

Aspectos histopatológicos da raiva em raposas *Cerdocyon thous*

Trabalho enviado à revista Acta Scientiae Veterinariae

Aspectos histopatológicos da raiva em raposas *Cerdocyon thous*

Jeann Leal de Araújo¹, Antônio Flavio M. Dantas^{1,5}, Glauco José N. Galiza², Pedro Miguel O. Pedroso³, Maria Luana Cristiny R. Silva¹, Luciano da Anunciação Pimentel⁴, Franklin Riet-Correa¹

Resumo - São descritos dois casos de raiva em raposas (*Cerdocyon thous*) provenientes do município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. Os animais foram encontrados apresentando sinais neurológicos como andar incoordenado, perda de equilíbrio, acentuado balançar compulsivo da cabeça e aparente fraqueza muscular. Na necropsia, áreas hemorrágicas foram observadas na região do encéfalo, porém os demais órgãos não tinham alterações macroscópicas. Histologicamente, no SNC havia encefalite não supurativa difusa, com presença de infiltrado inflamatório constituído principalmente por linfócitos e plasmócitos, formando manguitos perivasculares mononucleares, associada a discreta gliose e corpúsculos de inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas principalmente em neurônios dos córtices, núcleos da base, hipocampo, tálamo, colículos, ponte, quarto ventrículo, óbex e cerebelo. Meningite e mielite discreta também foram observadas nos dois casos com raras inclusões virais em neurônios da medula espinhal. Inflamação semelhante também foi observada no gânglio de Gasser e outros nos gânglios nervosos periféricos. A adrenal e as glândulas salivares demonstraram áreas multifocais de discreto infiltrado inflamatório mononuclear, composto principalmente por macrófagos e plasmócitos. Na imuno-histoquímica foi observada forte marcação positiva para raiva no pericariode neurônios de diferentes regiões do encéfalo, principalmente do córtex cerebral e em células de Purkinje do cerebelo. Nos dois casos o diagnóstico de raiva foi confirmado pela imunofluorescência e pela inoculação em camundongos. Estes resultados demonstram que as raposas apresentam lesões histológicas difusas e severas do sistema nervoso central e periférico com presença de corpúsculos de inclusão em diversas áreas e que a imuno-histoquímica pode ser utilizada no diagnóstico da doença.

Palavras-chave: Canideos, Lyssavirus, animais selvagens, histopatologia

¹Hospital Veterinário, Laboratório de Patologia Animal, CSTR, UFCG, Campus de Patos, Av. Universitária, S/N, Santa Cecília, 58708-110, Patos, PB.

²Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, CCS, UFSM. Camobi. Santa Maria, RS. CEP 97105-900.

³Laboratório de Patologia Veterinária, CCA, UFRB, Cruz das Almas, BA. CEP: 44380-000.

⁴Universidade de Cuiabá. Avenida Beira Rio, 3100. Jardim Europa00, Cuiabá, MT. CEP 78065-900.

⁵Autor para correspondência: dantas.af@uol.com.br

Abstract - Two cases of rabies in foxes (*Cerdocyon thous*) from the city of São José de Espinharas , Paraíba , Brazil, are described. The animals were found showing neurological signs such as uncoordinated walking, loss of equilibrium , severe compulsive shaking head and apparent weakness . At necropsy , hemorrhagic areas were observed in the region of the brain, but other organs had no gross lesion . Histologically, the CNS had diffuse non-suppurative encephalitis , with inflammatory infiltrate composed primarily by lymphocytes and plasma cells , forming mononuclear perivascular cuffs associated with mild gliosis and eosinophilic intracytoplasmic inclusions corpuscles mainly in neurons of the cortex , basal ganglia , hippocampus, thalamus , colliculus , bridge, fourth ventricle, obex and cerebellum . Meningitis and myelitis discrete were also observed in both cases with rare viral inclusions in neurons of the spinal cord. Similar Inflammation was also observed in Gasser ganglion and in other peripheral nerve ganglia , the adrenal and salivary glands showed multifocal areas of mild mononuclear inflammatory infiltrate composed mainly by macrophages and plasma cells . On Immunohistochemistry, strong positive labeling for rabies in perikaryon of neurons in different brain regions was observed, especially in the cerebral cortex and in the Purkinje cells of the cerebellum. In both cases the diagnosis of rabies was confirmed by immunofluorescence and by mouse inoculation test . These results demonstrate that foxes have diffuse and severe histological lesions in the central and peripheral nervous system with the presence of inclusion bodies in different areas and immunohistochemistry can be used in the diagnosis of disease.

Keywords: Canids, Lyssavirus, wild animals, histopathology

Introdução

Vários canídeos silvestres são considerados reservatórios do vírus rábico, como por exemplo a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), distribuída mundialmente na Europa, América do Norte, norte da África e na Austrália. Estudos epidemiológicos mostram que a ocorrência dos surtos de raiva em raposas podem variar dependendoda população de animais por Km² (Childs & Real, 2007).

No Nordeste do Brasil dois canídeos silvestres já foram relatados como reservatórios do vírus rábico *Cerdocyon thous* (crab-eating fox, cachorro-do-mato) e *Pseudalopex vetulus* (hoary fox, raposa cinzenta) (previamente denominada *Dusicyon vetulus*) (Carnieli Jr., 2008). Os canídeos selvagens estão amplamente distribuídos no País, especialmente na região Nordeste, essa relação de proximidade entre o homem e animais selvagens aumenta o risco de transmissão para o homem e animais domésticos (Gomes, 2004).

Existem relatos de casos de raposas com raiva e transmissão para humanos nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (Araújo, 2002).

No ciclo silvestre terrestre, o vírus pode utilizar como reservatórios naturais diferentes espécies, as quais podem variar em função da fauna da região geográfica. Variantes diferentes do vírus podem infectar uma mesma espécie em nichos geograficamente distintos. Desta forma, na Europa, o reservatório natural do vírus é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*). Já na América do Norte, além de espécies de raposas (*V. vulpes*, *Urocyon cinereoargenteus*), gambás (*Mephitis mephitis*) e guaxinins (*Procyon lotor*) são considerados hospedeiros naturais do vírus. No Brasil, este ciclo é representado principalmente por raposas (*Cerdocyon thous*) ou saguis (*Callithrix jacchus*). Dos 329 casos de raiva notificados no período de 2002 a 2009, cerca de 88% eram de canídeos silvestres, todos ocorridos na região Nordeste, onde muitos desseseram mantidos como animais de estimação. No Brasil, os canídeos silvestres foram responsáveis por 7,9% dos 165 óbitos de humanos com raiva, no período de 1986-2006. No Estado da Paraíba entre os anos de 2007 e 2010, foram notificados sete casos de raiva em cães e gatos, e cinco casos em canídeos silvestres (SVS/MS, 2012).

O diagnóstico da raiva em raposas geralmente é realizado através das técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camudongos (ICC). Entretanto, até o momento, não existem estudos detalhados de descrição histopatológica e imuno-histoquímica em raposas acometidas por essa doença. Portanto, o objetivo do presente trabalho é a caracterização dos achados patológicos e imuno-histoquímicos de

raposas com raiva encaminhadas ao Laboratório de Patologia Animal(LPA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) em Patos, semiárido da Paraíba, Brasil.

Material e Métodos

As raposas utilizadas foram encaminhadas mortas para o LPA da UFCG, realizada a identificação fenotípica da espécie através da análise de aspectos morfológicos do animal com base no Guia de Identificação de Canídeos brasileiros proposto por Ramos Jr. et al (2003) e posteriormente necropsiadas. Foram coletados fragmentos de órgãos das cavidades torácica e abdominal, glândulas salivares, globo ocular e gânglio de Gasser, além do sistema nervoso central (SNC) que foi coletado inteiro e fixado em formol tamponado a 10%. Posteriormente foram realizados cortes seriados do encéfalo, medindo cerca de 0,5 cm de espessura e clivados 16 fragmentos do SNC identificados: 1) córtex frontal, 2) córtex parietal, 3) córtex temporal, 4) córtex occipital, 5) núcleos da base, 6) hipocampo, 7) tálamo, 8) colículo rostral, 9) colículo caudal, 10) ponte, 11) quarto ventrículo, 12) óbex, 13) cerebelo, 14) medula cervical, 15) medula torácica e 16) medula lombar. Para a confecção das lâminas histológicas, os fragmentos foram clivados e processados rotineiramente, sendo por último coradas pela hematoxilina e eosina (HE).

Seguindo as técnicas estabelecidas por Dean et al.(1996) e Koprowski (1996), para a realização de IFD e ICC, respectivamente, fragmentos do cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula espinhal e glândulas salivares das raposas foram enviados para a execução dessas técnicas. O material foi encaminhado para o Laboratório de Virologia da UFCG.

Blocos de parafina com fragmentos do hipocampo foram selecionados e submetidos à técnica de IHQ para a detecção do vírus da raiva. Após desparafinização e reidratação dos tecidos, foi realizada recuperação antigênica com solução de citrato (pH 6,0) em forno micro-ondas, em potência máxima, por dez minutos. Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo policlonal para raiva produzido em cabras marcado com FITC (anticorpo conjugado de isotiocianato de fluorescência [Chemicon #5199]), diluído 1:1000 em PBS+Tween, e incubado por 60 minutos a 37 C°. O anticorpo secundário biotilnilado e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB+System HRP, Dako) foram utilizados consecutivamente, incubados à temperatura ambiente por 30 minutos e marcados através da adição do Liquid DAB + Substrate – Chromogen System (Dako) e contracorados com Hematoxilina de Harris. Como controle positivo foi utilizado secções histológicas de casos

confirmados de raiva em bovinos. Como controle negativo, as mesmas secções foram utilizadas, com substituição do anticorpo primário por PBS+Tween.

Resultados

O diagnóstico da raiva em raposas foi realizado através dos achados histopatológicos característicos da doença, observados no SNC e confirmados pela IFD, ICC e IHq.

Esses casos ocorreram em anos distintos, sendo o primeiro em maio de 2010 e o segundo em abril de 2013. As duas raposas enviadas foram identificadas como pertencentes a espécie *Cerdocyon thous*. Segundo informações obtidas dos moradores da zona rural do Município de São José de Espinharas - PB, local onde os animais foram encontrados, as raposas foram submetidas a eutanásia após terem sido vistas com sinais nervosos caracterizados por incoordenação, perda de equilíbrio, acentuado balançar compulsivo da cabeça e aparente debilidade muscular.

Macroscopicamente as duas raposas apresentavam múltiplas lacerações cutâneas, fraturas ósseas e rupturas de órgãos abdominais provenientes de traumatismos. Os vasos das leptomeninges estavam levemente congestos.

Histologicamente verificou-se reação inflamatória mononuclear aguda, principalmente no SNC, variando o grau de intensidade e sua localização (Tabela 1). Havia encefalite não supurativa, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório constituído principalmente por linfócitos e plasmócitos, formando manguitos perivasculares mononucleares (Figura 1A), associada a discreta gliose e corpúsculos de inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas principalmente em neurônios dos córtices, núcleos da base, hipocampo (Figura 1B), tálamo, colículos, ponte, quarto ventrículo, óbex e cerebelo. Meningite e mielite discreta também foram observadas nos dois casos com raras inclusões virais em neurônios da medula espinhal.

Inflamação semelhante também foi observada nos gânglios nervosos periféricos, glândulas salivares e adrenal dos dois casos. Havia infiltrado inflamatório principalmente de linfócitos e plasmócitos entre os feixes nervosos do gânglio de Gasser, caracterizando ganglioneurite não supurativa (Figura 1C), associada a raras inclusões virais intracitoplasmáticas em neurônios. Ganglioneurite não supurativa também foi observada no gânglio ciliar do primeiro caso. Infiltrado linfo-plasmocitário também foi encontrado nas glândulas salivares (Figura 1D) e nas adrenais dos dois casos, característicos de adenite e adrenalite não

supurativa. Corpúsculos de inclusões raramente foram verificados em agregados de neurônios distribuídos periféricamente a essas estruturas glandulares.

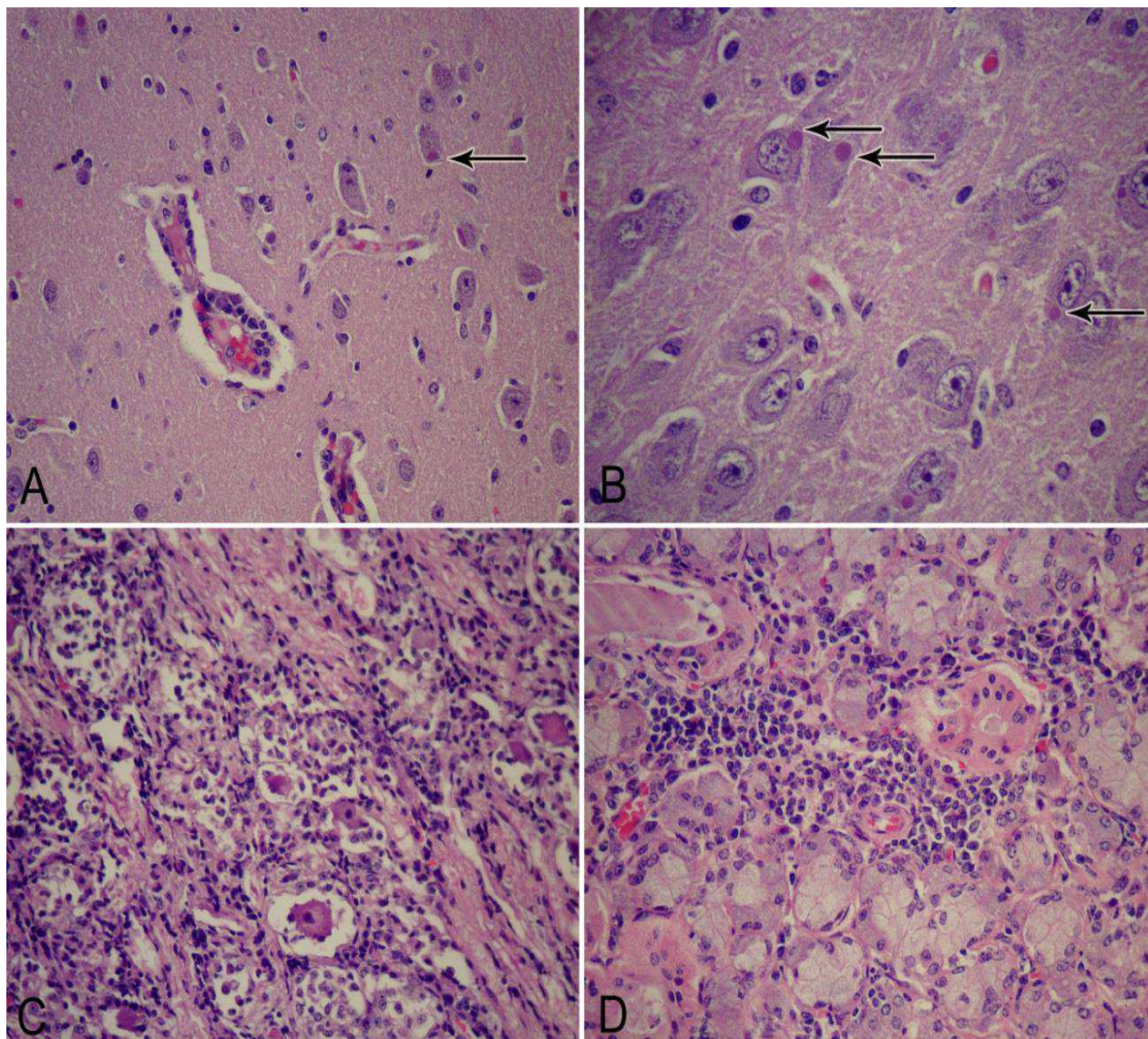


Figura 1 - Lesões histológicas de raposas com raiva. (A) Córtex occipital mostrando manguitos mononucleares perivasculares e corpúsculos de Negri (seta). (B) Hipocampo com múltiplos corpúsculos de Negri (setas). (C) Gânglio de Gasser com infiltrado inflamatório mononuclear. (D) Glândula salivar com inflamação não supurativa.

No exame de IFD e na ICC o resultado foi positivo em todos os fragmentos para o vírus da raiva.

Pela imuno-histoquímica os dois casos marcaram fortemente com anticorpos para raiva, demonstrando múltiplos agregados de grânulos distribuídos no pericário, como também na forma de corpúsculos grandes, únicos ou múltiplos no citoplasma de neurônios.

de córtex (Figura 2A) e ponte (Figura 2B). No controle negativo não foram observadas nenhum tipo de imunomarcacão (Figura 2C).

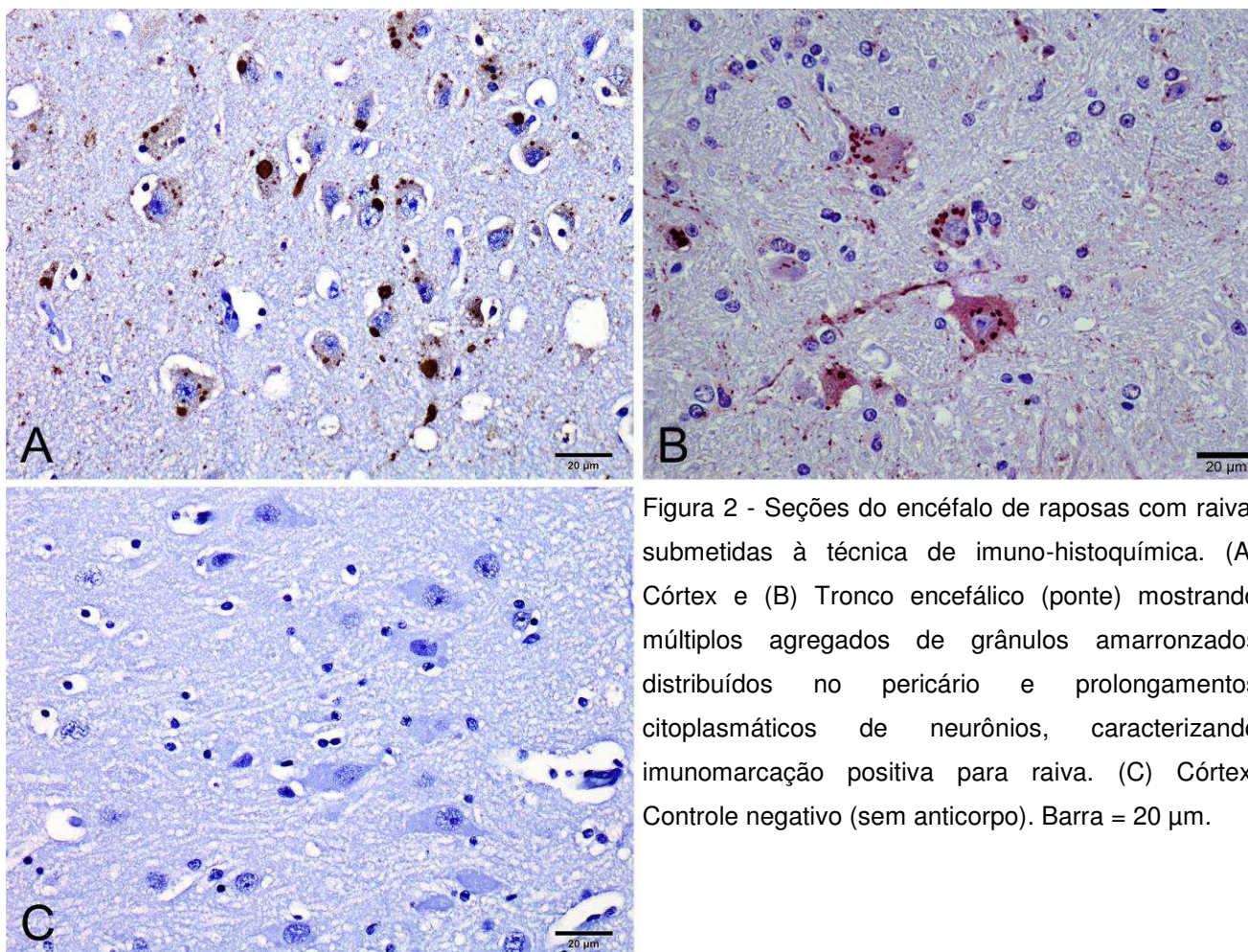


Figura 2 - Seções do encéfalo de raposas com raiva, submetidas à técnica de imuno-histoquímica. (A) Córtex e (B) Tronco encefálico (ponte) mostrando múltiplos agregados de grânulos amarronzados distribuídos no pericário e prolongamentos citoplasmáticos de neurônios, caracterizando imunomarcacão positiva para raiva. (C) Córtex. Controle negativo (sem anticorpo). Barra = 20 µm.

Tabela 1 - Distribuição das lesões no SNC de raposas (*Cerdocyon thous*) com raiva de acordo com a intensidade da resposta inflamatória e presença de corpúsculos de Negri.

CORTE	REGIÃO DO SNC	MENINGITE A1*/A2**	MANGUITOS A1*/A2**	INCLUSÕES A1*/A2**
1	Córtex Frontal	+/+	+/+	+++/>++
2	Córtex Parietal	+/+	+/-	++/>+
3	Córtex Temporal	+/+	++/>+	+++/>+++
4	Córtex Occipital	+/+	+/-	+/+
5	Núcleos da base	+/-	+/-	+++/>++
6	Hipocampo	+/-	++/>-	+++/>+++
7	Tálamo	+/+	++/>+	+++/>+
8	Colíclorostral	+/-	++/>+	+/+
9	Colíclulo caudal	+/-	+/+	+/>+++
10	Ponte	+/-	++/>+	+/+
11	Quarto Ventrículo	-/-	+/+	++/>+
12	Óbex	+/-	+/+	+/+
13	Cerebelo	++/>-	+/-	++/>-
14	Medula cervical	-/-	+/-	-/-
15	Medula torácica	-/-	+/-	-/>+
16	Medula lombar	-/-	++/>-	+/+

*Animal 1. **Animal 2. -: Sem lesão. +: Lesão discreta. ++: Lesão moderada. +++: acentuada.

DISCUSSÃO

Apesar dos achados histopatológicos encontrados nas raposas serem semelhantes ao que são observados em outras espécies, a severidade das lesões inflamatórias e a grande quantidade de corpúsculos de inclusão no tecido nervoso é uma característica marcante, independente da resposta inflamatória. A inflamação não supurativa e a presença de inclusões observadas nos gânglios nervosos periféricos encontrados ao redor ou dentro do tecido das glândulas salivares e das adrenais, semelhantemente a reação inflamatória observada no SNC, podem auxiliar no diagnóstico dessa patologia, principalmente nos casos em que não são observadas inclusões no SNC. As glândulas salivares também tem sido um importante órgão para a realização do isolamento viral do Lyssavirus, como o proposto por Silva et al.(2009) que encontrou positividade para as glândulas salivares parótidas das 12 raposas testadas em seu trabalho.

Diferentemente dos herbívoros, onde geralmente as principais lesões são cerebelares, os carnívoros tendem a apresentar lesões mais intensas na região de hipocampo, entretanto, de forma semelhante aos bovinos, pode haver áreas com pouca ou ausente reação inflamatória (McGavin & Zachary, 2009). Um aspecto importante da análise histopatológica é a realização de cortes seriados do sistema nervoso central, uma vez que a localização e intensidade das lesões pode variar entre as regiões do SNC, não havendo uma uniformidade.

A forte marcação nos neurônios do hipocampo no presente trabalho através da imuno-histoquímica, difere dos achados de Stein et al. (2010) que encontraram uma marcação moderada no hipocampo de raposas da espécie *Urocyon cinereoargenteus* e *Vulpes vulpes*.

Apesar das implicações legais, muitas pessoas tem o hábito de criar raposas e outros animais silvestres no Nordeste brasileiro. Essa tradição aumenta significativamente o risco de transmissão da raiva para humanos e outros animais. No ano de 2012, duas pessoas morreram no Nordeste vítimas de raiva transmitidas por animais silvestres (SVS,MS 2012). No Estado da Paraíba, a raposa tem sido o animal silvestre com mais números de agressões contra humanos, havendo no período de 2000 a 2003, cerca de 24 casos de agressões de humanos por raposas (Gomes, 2004).

Mochizuki et al. (2012) propõem que a ocorrência de raiva em herbívoros nos Estados da Paraíba e Pernambuco é causada principalmente por uma variante do vírus chamada de RABV, relacionada a morcegos hematófagos e que ela está circulante nessa área do Nordeste por pelo menos 7 anos, isolada por barreiras geográficas. Gomes et al. (2012) sugerem a presença de duas ramificações de Lyssavirus na região da Paraíba: Uma

associada com quirópteros e outra com carnívoros. Entretanto, existe uma variabilidade genética nessas ramificações, subdividindo o grupo de quirópteros em “morcegos insetívoros” e “morcegos hematófagos”, e o grupo do carnívoros em “cão”, “raposa 1” e “raposa 2” (está mais próxima do grupo “cão”). Essa existência de variabilidade entre as ramificações das variantes do vírus rábico sugere que pelo menos dois grupos de vírus coexistem na mesma região e apesar de somente a variante de morcegos hematófagos ter sido incriminada como causadora da raiva em herbívoros, a criação de animais silvestres como animais de estimação no Nordeste favorece o risco de transmissão da doença para os animais de produção, sugerindo um papel importante das raposas nesse cenário. Segundo Bernardi et al. (2005), a presença da variabilidade genética das variantes de raposas, sugerem que estes animais tem um papel muito mais importante na manutenção e disseminação da raiva no Brasil do que antes se pensava, tendo uma implicação de Saúde Pública significativa já que nessa região o monitoramento desses animais é muitas vezes ineficiente ou ausente, e a prática da vacinação de animais silvestres não tem sido empregada no país.

O diagnóstico da raiva em raposas pode ser realizado pelos achados histopatológicos característicos do SNC, auxiliado pela avaliação dos gânglios nervosos periféricos, glândulas salivares e adrenal que também podem apresentar lesões microscópicas semelhantes. E que exames laboratoriais devem ser realizados, como IFD, ICC e IHq para a confirmação da doença.

REFERÊNCIAS

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

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. **Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir**. *Journal of General Virology*, v.86, p.3153-3162, 2005

Carnieli P Jr, FahlWde O, Castilho JG, Oliveira Rde N, MacedoCI, Durymanova E, Jorge RS, Morato RG, Spindola RO, Machado LM, **Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil**. *Virus Res*, 131(1):33-46. 2008.

Childs JE, Real LA. *Epidemiology*. In: **Jackson AC, Wunner WH. Ed. Rabies**. San Diego: Academic Press; 123-199. 2007.

Dean D.J., Abelseth M.K. & Atanasiu P. The fluorescent antibody test, In: Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Ed.), **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. World Health Organization, Geneva. p.88-93. 1996.

Gomes, A.A.B. **Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil**. São Paulo, Brasil, 107p. (Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo) 2004.

Gomes, A.A.B.; Silva, M.L.C.R.; Bernardi, F.; Sakai, T.; Itou, T.; Ito. F.H. **Molecular epidemiology of animal rabies in the semiarid region of Paraíba, Northeastern Brazil**. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.79, n.4, p.611-615. 2012.

Koprowski H. The mouse inoculation test,. In: Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Ed.), **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. World Health Organization, Geneva. p.80-86. 1996.

McGavin, M. Donald.; Zachary, James F. **Bases da Patologia em Veterinária**. Elsevier, 4ª edição, 2009.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Mapas da Raiva no Brasil, 2012**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; Organização Mundial da Saúde; Ministério da Saúde; 2012.

Mochizuki, N., Kawasaki, H., Silva, MLCR., Afonso, JAB., Itou, T. Fumio H, Sakai, T. **Molecular epidemiology of livestock rabies viruses isolated in the northeastern Brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003 -2009**. BMC Research Notes. 5:32. 2012.

Ramos Jr . VA., Pessutti, C., Chieregatto, CAFS. **Guia de Identificação dos Canídeos Silvestres Brasileiros**. Sorocaba, JoyJoy Studio Ltda. - Comunicação Ambiental, 35 pag. 2003.

Silva, MLCR, Lima, F.S., Gomes, AAB., Azevedo, SS., Alves, CJ., Bernardi, F., Ito, FH. **Isolation of Rabies virus from the parotid salivary glands of foxes (Pseudalopex vetulus) from Paraíba State, Northeastern Brazil**. Brazilian Journal of Microbiology. 40: 446-449. 2009.

Stein, L. T., Rech, R. R., Harrison, L., Brown, C. C. **Immunohistochemical Study of Rabies Virus Within the Central Nervous System of Domestic and Wildlife Species**. Veterinary Pathology. 47(4). 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização dos dois trabalhos permitiu um melhor entendimento do papel dos morcegos insetívoros (*Molossus molossus*) e raposas (*Cerdocyon thous*) como reservatórios do vírus da raiva e importante fonte de transmissão da doença para outros animais e para o homem na região do semiárido paraibano.

Os morcegos insetívoros podem desenvolver a raiva, mas não serem observadas alterações histopatológicas características no encéfalo, sendo, portanto, necessário a realização de IFD, ICC e IHq para a confirmação da doença.

As raposas apresentam lesões histopatológicas características da raiva no SNC, semelhantes aos achados encontrados em outros animais infectados com o vírus da raiva, mas também com alterações inflamatórias importantes nas glândulas salivares, gânglios nervosos periféricos e nas adrenais que podem auxiliar no diagnóstico da doença.

ANEXOS

JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES

GENERAL INSTRUCTIONS FOR MANUSCRIPT PREPARATION

In order to minimize delays, authors are urged to carefully read these instructions. Manuscripts will be returned if authors do not follow instructions for manuscript preparation. Only original papers written JWD Instructions to Authors and Reviewers in English will be accepted. All manuscripts must be free of plagiarism. The Journal of Wildlife Diseases is a member of CrossCheck and may screen manuscripts for potential plagiarism.

Manuscript Components

Manuscripts should be composed of the following elements in the below order. Figures or images should be submitted as separate files.

Title Page

The first page should be a title page containing a Running Head. See description above in Categories of Papers Published for a detailed description of title pages by manuscript type (see a recent issue for format). To avoid delays, authors should ensure that the word count is within the limits specified for the manuscript type.

Abstract

Abstracts are unstructured. References are not cited and figure or table callouts not allowed. Provide inclusive dates of the study in the Abstract and main body of the text. The abstract and body of the text should provide a clear statement of the objective(s), such as the hypothesis tested or the question addressed. Abstracts should highlight new information made available as a result of the work being described. Provide the genus and species of each organism the first time it is given in the Abstract, and again in the text.

Keywords

Key words are included in Review, Full-length, and Short Communication articles. Four to eight keywords should appear in alphabetical order, separated by commas.

Headers

Headers for Full-length articles include: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, Literature Cited. There are no textual heads in Short Communications or Letters except for Literature Cited.

Acknowledgments

For Reviews, Full-length manuscripts, and Short communications, acknowledgments are placed at the end of the text before the Literature Cited in one indented paragraph. For Short Communications there

is no "Acknowledgments" header. Grant and funding information appears in acknowledgments, omitting the number sign and abbreviation ("No."). Honorific titles such as Dr or Ms, and degree (MD, PhD, etc.) are not included.

Literature Cited

The Literature Cited section of the manuscript should be prepared in appropriate Journal style. References in the body of the text follow the author–year style, with parenthetical entries in chronological, then alphabetical, order. Use BIOSIS journal abbreviations. Many university libraries provide online lists by discipline. In addition, authors may check the Serials Source List for Biological Sciences from Cambridge Scientific Abstracts.

- The authors should carefully check that all literature cited appears in the text, and vice versa.
- As a rule, use only one literature citation to make each point in the text; omit redundant citations; if multiple citations are required in the text, list them in chronological order, from oldest to most recent separated by semicolons.
- Meeting abstracts, unpublished materials, and non-peer reviewed materials generally are not acceptable as citable materials; exceptions must be justified by the authors.
- Theses and dissertations, state and federal documents intended for professional distribution, and peer-reviewed proceedings of meetings generally are acceptable citations.

Article in a journal:

Smith AB, Jones CD. 1994. Hepatitis of viral origin in Canidae: An etiologic hypotheses. *J Wildl Dis* 76:371–380

Smith AB, Jones CD, Garwin EF. 1995. An outbreak of cowpox in captive cheetahs: Virologic and epidemiologic studies. *J Hygiene* 89:72–79.

Chapter in a book or an edited book:

Smith AB. 1998. *The insects of Australia*, 2nd Ed. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Entomology, Melbourne University Press, Melbourne, Victoria, Australia, 542 pp.

Jones CD. 1997. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 153 pp.

Jordan FT. 1996. Avian mycoplasmosis. In: *Poultry diseases*, Jordan FT, Pattison M, editors. W. B.

Saunders Company Ltd., Philadelphia, Pennsylvania, pp. 81–93.

Cheville NF, editor. 1994. *An introduction to interpretation*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 502 pp.

Proceedings:

Dickinson VM, Jarchow JL, Trueblood MH. 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range value for free-ranging desert tortoises in Arizona. In: *Proceedings of the 54th annual meeting on pathology and medicine of reptiles and amphibians*, American Veterinary Association, Phoenix, Arizona, 17–21 January, pp. 129–134. (if published: ... 17–21 January; W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 129–134.)

Dissertation/Thesis:

Hathaway SC. 1978. Leptospirosis in free living animals in New Zealand, with particular reference to the possum (*Trichosurus vulpecula*). Ph.D. Thesis, Veterinary Pathology and Public Health, Massey University, Palmerston North, New Zealand, 434 pp.

URLs:

United States Department of Agriculture. 2001. The Federal Agriculture Improvement and Reform Act of 1996, www.usda.gov/farbill/title0.htm. Accessed April 2002.

Tables

Tables should be prepared using the Table function in MS Word. Omit all vertical lines. Do not enclose tables with borders. Footnotes in the table should be identified by superscript lower-case letters. The table caption should appear above the table and should be complete enough to “stand alone” without reference to the text.

Figure captions

Figure captions are included on a separate page following the Tables. Figure captions must “standalone.” Include “what, when, and where.” Provide scientific names for all species mentioned and explain all abbreviations.

Figures and Images

Figures are submitted as separate files (not included in the text file). Most figures will be reproduced at single-column (7-cm) width. Large or complex figures may be full-page (14-cm) width. All text and symbols must be easily legible at the dimensions to be published. Embed or Outline fonts to ensure accurate representation of the figure; use common fonts such as Helvetica or Arial. Avoid using unusual symbols or Greek characters. Figures must be in sharp focus. Mount a scale bar directly on all photomicrographs; the metric equivalent of the scale bar may be given directly on the figure or defined in the figure legend. Provide a scale bar and a north directional arrow if North is not toward the top of the figure.

Figures should be submitted in tagged image file format (.tiff), JPEG, portable document format (pdf), or Adobe Photoshop document (psd). Files in CorelDraw and PowerPoint are

usually NOT acceptable the quality is not adequate for acceptable reproduction). Resolution (at the dimensions to be published) should be at an absolute minimum of 300 dpi. Color figures are acceptable, but the additional printing costs will be borne by the authors. Submit figures in color only if the authors want the final figure to appear in color and are willing to assume the additional costs (see Author Charges). Authors may designate that one or more images appear in black and white in the paper copy of the Journal and color in the online version. Online-only images will be billed at \$100 per image. Compound images (e.g., Fig. 1a and b) count as a single image. Authors must ensure that the same figure caption is appropriate for both the black and white and the color versions. Crop figures to remove extraneous material and to emphasize significant features. To minimize delays, authors are encouraged to check quality and correctness of digital images using the Allen Press online figure verification tool Allen veriFig™ 1.5. Navigate to <http://verifig.allenpress.com/login> and log in with an email address. The password is “figcheck.”

Authors can submit multiple files online and receive a report that provides details about the resolution, figure size, fonts, and color mode of the files.

ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE INSTRUÇÕES PARA AUTORES

ARTIGO ORIGINAL DE PESQUISA:

composto de dados inéditos com apresentação clara da hipótese (delineamento experimental apropriado, quando for o caso). A redação deve ser concisa, mas que permita a reprodução da metodologia descrita, perfeito entendimento da discussão no contexto geral do assunto, gerando conclusões alicerçadas nos dados obtidos ou observados normalmente não deve ultrapassar 15 páginas e uma base de no máximo 60 referências. ABSTRACT (limites: 3400-3900 cce). Texto com Introdução (Máximo de 1700 cce); Materiais e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Sources and Manufacturers; Acknowledgements; Funding, Ethical Approval; Declaration of interest e References. Não citar autores no texto e/ou apresentar referências INCOMPLETAS. Nunca utilizar notas de rodapé

ESTRUTURA BÁSICA DOS TRABALHOS

1. Página-título:

a) Título não deve exceder 60 palavras. b) Nomes dos aa por extenso seguidos de números sobrescritos para identificar suas filiações. No rodapé constará os nomes das Instituições e siglas, cidade, estado e país de TODOS autores, com respectivas instituições (com siglas). Fornecer e-mail e o endereço postal completo do autor indicado para correspondência, incluindo CEP. Fornecer DOIS e-mails (autores diferentes) para contato durante avaliação do trabalho. d) Para trabalhos extraídos de dissertações ou teses citar na página título os detalhes pertinentes (Instituição, local).

2. ABSTRACT [3400-3900]: Na forma direta e no passado destacando a importância do assunto, o objetivo do trabalho, como foi realizado (M&M), os resultados alcançados com dados específicos e seu significado estatístico (se possível) e as principais conclusões, isto é, apresenta todas as seções do artigo sob forma condensada. Texto deve ser preparado por tradutor / serviço reconhecidamente qualificado.

3. INTRODUÇÃO: Deve ser CURTA, clara e objetiva, contendo informações que justifiquem a importância do trabalho e restringindo as citações ao assunto específico. Sempre finalizar com o (s) objetivo (s) do trabalho. É obrigatório considerar o limite MÁXIMO de 1700 cc espaços

4. MATERIAIS E MÉTODOS: Todas as informações necessárias para que o trabalho possa ser facilmente repetido, devem ser fornecidas. Métodos e técnicas já bem conhecidos devem ser apenas citados, enquanto novas tecnologias devem ser detalhadas. Quando pertinente indicar, com números sobrescritos, insumos e aparelhos cujos fabricantes deverão ser citados em Sources and Manufacturers. Ao utilizar animais nos experimentos observar os princípios éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) ou pelo International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals de acordo com o Council for International Organizations of Medical Sciences [C.I.O.M.S. - W.H.O.]. Apresentar o número do processo aprovado no Comitê de Ética local.

5. RESULTADOS [separados da Discussão]: informação clara e concisa somente das observações relevantes que, conforme a natureza do trabalho, deverão apresentar a análise estatística. O conteúdo deve ser informativo (não interpretativo) e, se necessário, acompanhado por tabelas, figuras ou outras ilustrações auto-explicativas. As legendas das tabelas / figuras devem ser suficientemente detalhadas, para que o leitor não precise retornar ao texto para obter informações complementares necessárias à compreensão das ilustrações. Somente as legendas deverão ser colocadas após as referências. É indicado expressar em gráficos resultados complexos condensados em tabelas com excesso de

detalhes supérfluos. Apresentar os resultados em uma sequência lógica no texto, tabelas e figuras (o texto e a documentação devem ser complementares). Não repetir no texto todos os dados das tabelas ou ilustrações.

5.1 Tabelas: numeradas em algarismos arábicos e enviadas em arquivos separados (não incluir dentro do texto). Todas as tabelas devem ser citadas no texto em ordem numérica e a posição aproximada indicada na margem. Impressas em espaço duplo e em folhas separadas. As legendas (colocadas após as referências) devem ser auto-explicativas com o título descritivo [incluir local e o período quando necessário, além de outros detalhes para que o leitor não precise consultar o texto]. Os sinais de chamada são indicados por letras ou símbolos e ordenados no rodapé da Tabela. Recomenda-se incluir apenas os dados imprescindíveis, para evitar tabelas longas, com dados dispersos e de valor não representativo. Identificar as medidas estatísticas (intervalo de confiança, desvio-padrão, etc.).

5.2 Figuras:

As imagens devem ser digitalizadas em 300 dpi em CMYK (coloridas) e Gray Scale (tons de cinza), ao serem salvas deve ser selecionada a extensão TIFF e enviadas em CD. Para a digitalização pode ser usado qualquer programa de imagem, mas nunca enviar dentro do documento Word. As fotografias feitas através de microscópio devem conter indicadores internos de escala. Os símbolos, flechas ou letras usados em fotomicrografias devem contrastar claramente com o fundo, com a escala (bar) inserida e a magnitude descrita na legenda. Para as fotos em câmera digital, a máquina deve ter resolução superior a 5 Megapixel (observar no momento de bater a foto se a câmera está configurada em resolução máxima). Nunca enviar as imagens com extensão jpg ou gif.

6. DISCUSSÃO: O conteúdo deve ser interpretativo e as hipóteses e especulações formuladas embasadas nos dados obtidos pelos autores e, relacionadas ao conhecimento atual sobre o tema, fornecido por outros estudos. Nesta seção referenciar somente a documentação essencial. Discutir as implicações dos achados e suas limitações mencionando envolvimento com futura pesquisa.

7. CONCLUSÃO:

Vincular as mesmas aos objetivos do estudo. Devem estar baseadas exclusivamente nos resultados oriundos do trabalho e em fatos plenamente respaldados pelos mesmos. Os autores devem evitar, em particular, fazer declarações sobre os benefícios econômicos e gastos, a menos que seu manuscrito inclua informações e análises econômicas.

13. REFERENCES:

Atenção para todos os detalhes (dois exemplos bem detalhados são apresentados no final das instruções). Os trabalhos não serão analisados enquanto as mesmas estiverem incompletas ou fora das normas. Relacionar somente em ordem alfabética e numerada, os trabalhos publicados e seguir as especificações da Revista conforme os vários exemplos abaixo. Sequência: Número / Referenciar sobrenome (letra maiúscula só a inicial) sem vírgulas e iniciais de todos os autores seguidas de ponto e separados por vírgula entre cada autor (usar "&" para separar os últimos autores). / Ano da publicação. / Título do artigo. / Nome completo da revista em itálico(s/abreviação). / número volume (no fascículo): pp-pp

TRABALHOS

→COM DOIS AUTORES: Spilki F.R. & Arns C.V. 2008. Vírus respiratório sincicial bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(3): 197-214.

→COM VÁRIOS AUTORES:Pereira S.A., Schubach T.M.P., Gremião I.D.F., Silva D.T., Figueiredo F.B., Assis N.V. & Passos S.R.L. 2009.Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(4): 311-321.

→EM VOLUME COM SUPLEMENTO: Pier A.C., Cabañes F.J., Chermette R., Ferreiro L., Guillot J., Jensen H.E. & Santurio J.M. 2000. Prominent animal mycoses from various regions of the world. *Medical Mycology*. 38(Suppl 1): 47-58.

→EM FASCÍCULO SEM VOLUME: Turan L., Wredmark T. & Fellander-Tsai I. 1995.Arthroscopicankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clinical of Orthopedic*.(320): 110-114.

→SEM VOLUME E SEM FASCÍCULO: Schulman R.L. 2003.Insulin and other therapies for diabetes mellitus. *Veterinarydicine*. April: 334-347.

→EM FORMATO ELETRÔNICO:Morse S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*.1: 7-15. [Fonte: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>>].

→IN PRESS/ Publicação ahead of print [mencionar as data]:Teifke J.P., Driemeier D. & Kaden V. 2002.Arrest of metaphyseal ossification with classical swine fever. *Veterinary Record*[in press].

→COMPLETO EM EVENTO:Sempre com o N.º do evento (Cidade e País) Bortolozzo F.P., Uemoto D.A., Wentz I. & Pozzobon M.C.1999. Reproductive performance of gilts submitted to artificial insemination in different intervals before ovulation. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Board Semen Preservation (Beltsville, U.S.A.)*. pp.239-240.

→EM COLEÇÃO OU SÉRIE:JellieffD.B. 1968.Evaluación del estado de nutrición dela comunidad. Ginebra: Organizacion Mundial de La Salud. [Serie de Monografias, 53], 201p.

• RESUMOS

[Sempre com o N.º do evento (Cidade e País)]

→PUBLICADO EM ANAIS:Bisol J.F.W., Vieira M.J., Keller A., Mattos R.C. & Gregory R.M. 2000. Efeito da adição de antibióticos ao diluente de sêmen resfriado eqüino na fertilidade de éguas. In: *Resumos do XII Salãode Iniciação Científica da UFRGS(Porto Alegre, Brasil)*. p.125.

→PUBLICADO EM ANAIS COM VÁRIOS VOLS.:Barcellos D.E.S.N., Razia L.E. & Borowski S.M. 2002. Microagglutination test detecting antibodies against *Brachyspira pilosicoli*[paper 537]. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.2. (Ames, U.S.A.). p.362.

→PUBLICADO EM REVISTA: Reischak D., Costa U.M., Moojen V. & Ravazzolo A.P. 1999. Ovine synovial membrane cell line permissive to in vitro caprine lentivirus replication [abstract A-097]. In: *Viroológica 99 (Curitiba, Brazil)*. *Virus Reviews & Research*. 4(1): 81-82.

• DISSERTAÇÕES / TESES

Machado M.L.S. 2001.Dermatófitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. 82f. PortoAlegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LIVROS

[Sempre com nome da Cidade: nome da Editora]

→CAPÍTULO EM LIVRO COM AUTORIA:Rodrigues J.L. 1982. Transferência Embrionária. In: Mies Filho A. (Ed). Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, pp.710-720. [mencionar o Ed ou Eds]

→CAPÍTULO EM LIVRO SEM AUTORIA:Solomon S.E. & Nascimento V.P. 1994.Hen's egg Shell structure and function. In: The Microbiology of the Avian Egg. London: Chapman & Hall, pp.1-24.

→CITAÇÃO DE LIVRO:Bladh W. H. 1971.Nuclear Medicine. 2nd edn. New York: MacGraw-Hill, 858p.

RELATÓRIOS / BOLETINS TÉCNICOS

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 1982.Censo Demográfico: Dados Distritais. Rio de Janeiro. v.1. IBGE, 20p.

World Health Organization. 1994.Expert Committee on Drug Dependence. Geneva. 29th Report . Geneva. (WHO-Technical Report Series,56).120p