

Alair Assis

***Aspectos anátomo - clínicos da doença raiva
em animais domésticos***

Tese de doutorado apresentada ao Curso Pós - Graduação em Anatomia Patológica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica.

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metzke

Campinas
UNICAMP
2000

UNIDADE	BE
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	As 76a
V.	Ex.
TOMBO BC/	45579
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	04/08/01
N.º CPD	

CM00158363-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

As76a Assis, Alair
Aspectos anátomo-clínicos da doença raiva em animais domésticos/
Alair Assis. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Konradin Metze
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

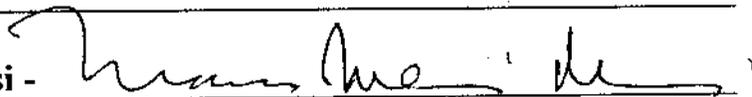
1. Morte súbita. I. Konradin Metze. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título

Banca examinadora da tese de Doutorado

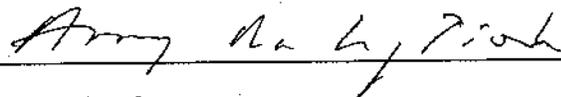
Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Membros:

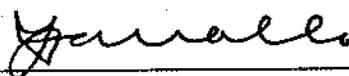
1. Prof. Dr. Marcos Antonio Rossi -



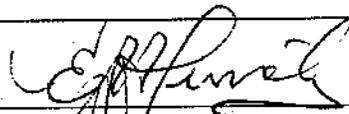
2. Prof. Dr. Arary da Cruz Tiriba -



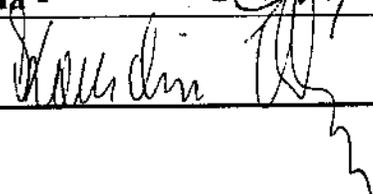
3. Prof. Dr. José Vassallo -



4. Prof. Dr. Eros Antonio de Almeda -



5. Prof. Dr. Konradin Metze -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13.11.2000

*A Nelson Assis (in memoriam), meu pai,
por ter me mostrado o caminho a seguir,*

*A Adriane, minha filha,
por dar sentido à minha caminhada.*

AGRADECIMENTOS

*Ao Prof. Dr. Konradin Metzke,
orientador, pelo apoio, confiança, amizade e dedicação na elaboração deste trabalho.*

*À Maria do Carmo Machado da Silva,
pela atenção, amizade e auxílio constantes.*

*Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Mogi Guaçu,
pela cooperação e dedicação.*

*Ao funcionários do CCZ de São Paulo,
pela colaboração no diagnóstico.*

Aos animais que foram meio e fim deste estudo.

*Para que os homens dêem um
único passo para dominar a natureza
por meio da arte da organização e da técnica,
antes terão que avançar três em sua ética*
(Friedrich Leopold von Hardenberg)

*O homem está condenado a ser livre, e suas
habilidades correspondem à sua liberdade*
(Jean-Paul Sartre)

SUMÁRIO

RESUMO

Resumo.....	27
-------------	----

INTRODUÇÃO

1. Introdução.....	31
1.1. Evolução dos conhecimentos.....	31
1.1.1. Classificação do vírus da raiva.....	31
1.1.2. Histórico.....	33
1.2. O vírus da raiva.....	39
1.3. Epidemiologia da raiva.....	45
1.4. Patogênese da raiva.....	53
1.5. Aspectos clínicos da raiva.....	59
1.5.1. Considerações quanto à exposição e infecção.....	59
1.5.2. Período de incubação do vírus da raiva.....	61
1.5.3. Período prodrômico e sintomatologia inicial.....	63
1.5.4. Período de envolvimento neurológico agudo.....	63
1.5.5. Casos atípicos e complicações na raiva.....	65
1.6. Diagnóstico.....	67
1.6.1. Diagnóstico clínico.....	67
1.6.2. Diagnóstico laboratorial.....	69

OBJETIVOS

2. Objetivos.....	77
-------------------	----

ANIMAIS E MÉTODOS

3. Animais e métodos.....	81
3.1. Seleção da amostragem.....	81
3.2. Casuística.....	85
3.3. Método de processamento do material.....	91

RESULTADOS

4. Resultados.....	99
4.1. Resultado da imunofluorescência direta e prova biológica.....	99
4.2. Resultado da avaliação clínica no período de observação dos animais.....	101
4.3. Resultado das necropsias.....	107
4.4. Resultado dos exames histopatológicos.....	109
4.4.1. Coração.....	111
4.4.2. Glândulas salivares.....	113
4.4.3. Supra-renal.....	113
4.4.4. Intestinos.....	115
4.4.5. Sistema Nervoso Central.....	115
4.4.6. Bexiga urinária.....	117
4.4.7. Pulmão.....	119
4.4.8. Rim.....	119
4.4.9. Baço.....	121
4.4.10. Fígado.....	123
4.4.11. Língua e Gânglios linfáticos adjacentes.....	123
4.5. Resultado da imunohistoquímica.....	125
4.6. Correlações anátomo-clínicas.....	129
4.6.1. Correlação anátomo-clínica da diarreia.....	133
4.6.2. Correlação anátomo-clínica dos casos de morte súbita.....	135
4.6.3. Comparação entre as doenças raiva e cinomose.....	139
DISCUSSÃO	
5. Discussão.....	143
CONCLUSÕES	
6. Conclusões.....	163
SUMMARY	
7. Summary.....	167
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	
8. Referência bibliográfica.....	171

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do vírus da raiva.....	43
Figura 2 – Ocorrência de hemofagocitose em tecidos de animais com diagnóstico positivo para a raiva.....	109
Figura 3 – Presença do vírus rábico em células do gânglio vegetativo do coração, demonstrado por imunohistoquímica.....	127
Figura 4 – Presença de vírus rábico em células do SNC, demonstrado por imunohistoquímica.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de raiva humana no Brasil por região do país, durante o período de 1986 a 1998.....	51
Tabela 2 - Casos de raiva humana segundo o tipo de animal agressor, no período de 1986 a 1998.....	51
Tabela 3 - Distribuição da coleta de material segundo causa da morte no período de agosto de 1989 a agosto de 1998.....	87
Tabela 4 - Critério de quantificação de achados histopatológicos observáveis à microscopia óptica.....	93
Tabela 5 - Resultado laboratorial para a raiva dos casos de importância epidemiológica enviados para diagnóstico no período de agosto de 1989 a agosto de 1998.....	99
Tabela 6 - Ocorrências no período de observação dos animais de interesse epidemiológico na história natural da raiva.....	103
Tabela 7 - Achados histopatológicos no coração de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	111
Tabela 8 - Achados histopatológicos nas glândulas salivares de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	113
Tabela 9 - Achados histopatológicos na supra-renal de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	113
Tabela 10 - Achados histopatológicos nos intestinos de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	115
Tabela 11 - Achados histopatológicos no SNC de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	117
Tabela 12 - Achados histopatológicos na bexiga urinária de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	117
Tabela 13 - Achados histopatológicos no pulmão de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	119
Tabela 14 - Achados histopatológicos no rim de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	121
Tabela 15 - Achados histopatológicos no baço de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	121

Tabela 16 - Achados histopatológicos no fígado de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE.....	123
Tabela 17 - Comparação entre os achados histopatológicos nos animais vítimas da raiva e a manifestação clínica apatia observada no período patogênico da doença.....	131
Tabela 18 - Comparação entre os achados histopatológicos nos animais vítimas da raiva e a manifestação clínica agressividade observada no período patogênico da doença.....	131
Tabela 19 - Comparação entre os achados histopatológicos dos animais vítimas da raiva e a manifestação clínica diarreia observada no período patogênico da doença.....	133
Tabela 20 - Comparação entre os achados histopatológicos nos animais sem e com diarreia, vítimas da raiva.....	135
Tabela 21 - Comparação entre os achados histopatológicos e a manifestação morte súbita no período de observação.....	137

SIGLAS E ABREVIATURAS

AChR	Receptores de Acetilcolina
CDC	“Centers for Disease Control”
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
EEG	Eletroencefalograma
ELISA	Imuno ensaio enzimático
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Glicoproteína
HE	Hematoxilina – Eosina
L	“Large protein”
N	Nucleoproteína
NS	Proteínas não estruturais
PV	Vírus Pasteur
PNZ	Programa Nacional de Zoonoses
RFFIT	Teste de inibição rápida
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RRAID	Imuno diagnóstico rápido para raiva
RNP	Ribonucleoproteína
SNC	Sistema Nervoso Central
VR	Vírus da Raiva
WHO	“World Health Organization”

RESUMO

RESUMO

A ocorrência de uma epidemia de raiva animal na região de Mogi Guaçu, estado de São Paulo, proporcionou estudos detalhados da evolução clínica da doença em animais, principalmente cães, possibilitando caracterizar quadros atípicos da doença. Ao longo da evolução da epidemia animal, e durante os anos posteriores em que ações de controle foram aplicadas (de 1989 a 1998), todos os animais de interesse epidemiológico foram observados clinicamente, bem como coletados materiais para estudos histopatológicos, pelas técnicas tradicionais e por imunohistoquímica. Assim sendo, 1152 lâminas de cortes histológicos de diversos órgãos de 112 animais positivos resultantes de 635 amostras de interesse epidemiológico encaminhadas para diagnóstico laboratorial foram confeccionadas e analisadas à microscopia, com correlações posteriores aos históricos dos respectivos animais bem como aos fatos ocorridos durante o período patogênico da doença, fornecendo, tais análises, informações que confirmam fatos já comentados na literatura científica, além de outros até então não descritos. Obtivemos a caracterização da ocorrência de casos atípicos da raiva, com destaque aos casos de morte súbita sem sintomas clínicos anteriores sugestivos da doença, enterite hemorrágica com óbito sem manifestação neurológica associada e manifestações típicas de outras doenças neurológicas. A ocorrência de morte súbita, a enterite hemorrágica e a hemofagocitose nos diversos tecidos, foram alguns dos achados de maior significado no presente estudo. Os casos atípicos com capacidade de eliminação do vírus pela via usual, possibilitam uma reavaliação dos métodos de profilaxia destinados aos comunicantes, já que os animais vítimas de tais manifestações, são importantes fontes de infecção nem sempre consideradas. Portanto, resumimos o presente trabalho como uma análise comparativa entre as evidências clínicas e os resultados da investigação histopatológica, produzindo informações de relevância para estudos epidemiológicos.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. EVOLUÇÃO DOS CONHECIMENTOS

1.1.1. CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA

Até data recente, mais de uma centena de Rhabdovirus haviam sido descritas em répteis, mamíferos, peixes, crustáceos e plantas (BAER, BELLINI & FISHBEIN, 1990). A família *Rhabdoviridae* pertence à ordem *Monomegavirale*, sendo que esta ordem ainda possui outras duas famílias, a *Filoviridae* e a *Paramyxoviridae*. A família *Rhabdoviridae* possui cinco gêneros: *Vesiculovirus*, *Ephenomenovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus* e *Lyssavirus*. A característica comum dos componentes desta família é o formato de bastão, conforme demonstrado em microscopia eletrônica. Os dois gêneros de Rhabdovirus atualmente conhecidos que acometem mamíferos são *Vesiculavirus* e *Lyssavirus* (DIETZSCHOLD et al., 1996; MURPHY, 1997). No gênero *Vesiculavirus* temos os agentes virais responsáveis por algumas das doenças vesiculares que acometem principalmente animais domésticos, não sendo ainda conhecidas em sua plenitude as doenças por este gênero que acometem as espécies silvestres de mamíferos e outros componentes do reino animal. No gênero *Lyssavirus* encontramos o vírus causador da raiva, responsável por encefalite em mamíferos silvestres, domésticos e inclusive o homem. Devido ao uso genérico, passou-se a chamar o gênero *Lyssavirus* comumente de vírus da raiva (VR), ou vírus rábico, para caracterizar o agente responsável pela doença de mesmo nome (SILVA, 1965; BAER, 1975).

1.1.2. HISTÓRICO

Ao longo da história a raiva tem sido apontada como um grande problema de saúde pública, causando conseqüências sociais e econômicas, pois provoca grande número de mortes humanas, de animais domésticos de interesse econômico ou de estimação, investimentos elevados em tratamentos pré e pós-exposições em grande número de pessoas, e ainda causando desconfortos psicológicos em indivíduos envolvidos com a doença (CARRADA, 1989; COSTY, 1989; GROLEAU, 1992).

O termo latino “Rabies” é oriundo de uma palavra do Sânscrito, “Rabhas”, que significa “cometer violência” (STEELE, 1975). A associação da palavra à doença deveu-se justamente ao quadro severo de alteração de comportamento observado principalmente em animais. O papel epidemiológico do cão na transmissão da raiva para o ser humano já era descrito na antigüidade. Relatos que nos induzem a pensar na doença foram encontrados descritos no “Código de Eshnunna” e no “Código de Hamurabi”, mais de 2300 anos antes da era cristã (SELLERS, 1954). “Aristaeus” e “Artemis” foram divindades gregas associadas ao combate e à cura da doença (BAER, 1975). Ao descrever a história natural da raiva, STEELE (1975) comenta que Homero fez citações da mesma na *Iliada*, demonstrando a influência da estrela “Cão” (Sírio) sobre a saúde da humanidade, sendo que no Egito e posteriormente em Roma, faziam-se associações entre o aparecimento da estrela e os casos de cães raivosos.

Nos primeiros séculos desta era, o homem identificava a saliva do cão agressor como uma possível causa da doença humana “por conter um perigoso veneno” (SMITHCORNS, 1958). Durante muitos séculos, estendendo-se por toda a idade média, a idéia inicialmente defendida por Aristóteles, quanto à cauterização de ferimentos para prevenir a doença, foi bastante utilizada por diversos povos. Mordidas de cães, raivosos ou não, eram sistematicamente tratadas com ferros incandescentes, muitas vezes produzindo deformações nas vítimas, numa tentativa de bloquear o desenvolvimento da doença em humanos, prática largamente empregada até algumas décadas atrás.

Tratamentos empíricos também eram utilizados, como mergulhar várias vezes uma pessoa com um quadro de encefalite típica de raiva, em uma coleção de água, para saciar a sede e perder o medo desta (STEELE, 1975). Ainda durante a idade média, época em que predominavam os conceitos religiosos ligados às causas de doenças, era usual apelar para determinadas entidades consideradas sagradas na esperança de produzir algum auxílio na prevenção ou cura de determinado distúrbio, seja este físico ou psicológico, sendo que no caso da raiva, a invocação era para “Saint Hubert” (SCHNEIDER & BURGOA, 1994).

Componentes das primeiras expedições colonizadoras à América Latina já foram vítimas do vírus, transmitido por agressões de morcegos hematófagos (BAER, 1975). A primeira referência da doença raiva nas Américas foi em 1709, no México, pelo Frei José Gill Ramirez, porém acredita-se que a doença já estava neste continente antes da chegada de Colombo devido às citações históricas de mordidas causadas por animais com conseqüências fatais (KOPROWSKI, 1959). Em 1804, Zinke, na Alemanha, fez a primeira abordagem científica em relação ao vírus, inoculando saliva de cães raivosos em cães sadios, obtendo sucesso na infecção. Galtier, em 1879, reproduziu a doença inoculando extratos cerebrais de coelhos com raiva em caprinos e ovinos, levando tal experimento, à conclusão obtida por Pasteur e colaboradores, que o vírus se replica no Sistema Nervoso Central (SNC). Pasteur passou a cultivar o vírus, inoculando-o sucessivamente em animais de laboratório, observando que o período de incubação antes variável, encurtava e se estabilizava. Esta amostra viral obtida experimentalmente, foi chamada de amostra “atenuada”, dando origem ao “vírus fixo”, de virulência constante e reprodutível para a espécie na qual foi adaptada, ao contrário dos vírus chamados “vírus de rua”, que são normalmente isolados dos animais naturalmente infectados (KOPROWSKY, 1985). Com o gradativo desenvolvimento da área clínica, surgiram numerosas propostas quanto ao tratamento da raiva, sempre citando a limpeza do ferimento como procedimento fundamental (SCHNEIDER & BURGOA, 1994). Porém nos últimos 100 anos, alguns eventos mudaram radicalmente os procedimentos em relação à doença. Desses procedimentos podemos citar a aplicação da primeira vacinação humana (1885), a caracterização do “corpúsculo de Negri” (Negri foi um patologista italiano da Universidade de Pavia, Itália) como sinal patognomônico da raiva (1903), a aplicação em massa de vacina anti-rábica canina a partir de

1940, a associação de soro hiperimune à vacinação em casos de risco potencial (1954), a adaptação do vírus da raiva em cultivo celular (1958, sendo que até então o vírus só era obtido diretamente do sistema nervoso central de animais), o desenvolvimento de anticorpos fluorescentes para o diagnóstico de cérebros de animais infectados (1959), e a identificação de pelo menos 04 variantes antigênicas do VR de características próprias, originários de áreas geográficas distintas (BAER, BELLINI & FISHBEIN, 1990).

Tais avanços permitiram o controle da doença em diferentes países nos diversos continentes, embora a doença continue existindo na maioria dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, dificultando assim o controle naqueles que tem tentado implantar as mais variadas medidas sanitárias e de vigilância epidemiológica (KAPLAN, GOOR & TIERKEL, 1954; TIERKEL, 1975; BAER, 1984). Nas últimas décadas, avanços significativos nos métodos de vacinação anti-rábica, tanto de áreas urbanas como em locais de concentração de animais silvestres, em algumas regiões dos Estados Unidos, Canadá e países europeus, têm possibilitado um maior controle e até mesmo uma possível erradicação da doença em regiões onde os diversos fatores a permitam, principalmente com a introdução da técnica de vacinação oral utilizada para imunização dos animais em áreas silvestres (TABEL et al., 1974; STEELE, 1975; CENTERS FOR DISEASES CONTROL, 1988; ESPOSITO et al., 1988; WANDELER et al., 1988). Não obstante, a raiva continua sendo um sério problema de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos e particularmente na América Latina, devido à cadeia epidemiológica envolvendo um grande número de espécies silvestres, dentre elas o morcego hematófago, bastante encontrado nesta região do globo terrestre.

LAFRENZ et al. (1990), ao analisarem as diversas metodologias empregadas no controle da doença, observaram que somente a cooperação entre a medicina humana e a medicina veterinária poderá propor e desenvolver metodologias adequadas de controle da raiva, diminuindo sensivelmente os casos observados ao redor do mundo.

1.2. O VÍRUS DA RAIVA

Pertencendo à família *Rhabdoviridae*, o gênero *Lyssavirus* tem como componentes o vírus da raiva e outros vírus bem semelhantes a este, menos estudados (BAER, BELLINI & FISHBEIN, 1990). Um *Rhabdovirus* à microscopia eletrônica, é uma estrutura em forma de bastão ou “bala de revólver”, com 50 a 95 nm de diâmetro e 130 a 380 nm de extensão, possuindo projeções compostas de uma glicoproteína “G” recobrando toda a sua superfície (Figura 1). Esta proteína glicosilada age como hemaglutinina de hemácias e é responsável pela fixação do vírus nas células do hospedeiro. EMERSON (1985) e WUNNER et al. (1988) descreveram ainda que no interior do envoltório, o nucleocapsídeo helicoidal é espiralado simetricamente em uma estrutura cilíndrica, dando a aparência de estriações à visualização. O nucleocapsídeo é composto de uma molécula de ácido ribonucléico (RNA) de filamento único, uma nucleoproteína “N”, e proteínas não estruturais “NS”. COSLETT, HOLLOWAY & OBIJESKI (1980) demonstraram haver basicamente cinco proteínas na estrutura viral: a nucleoproteína “N”, a bastante fosforilada proteína “NS” (também chamada de proteína “M1” da raiva ou ainda “P”), a proteína matricial “M”, a glicoproteína “G”, e uma proteína maior, componente do RNA polimerase chamada de proteína “L” (*large protein*). Sabe-se que a nucleoproteína “N”, constitui-se na principal proteína estrutural deste grupo de vírus, agindo na proteção do RNA contra a digestão pela ribonuclease (RNase) mantendo o RNA na configuração que lhe permite a transcrição. De um modo geral as proteínas virais do VR (a exemplo do que acontece com outros componentes da família *Rhabdoviridae*), estão associadas a pelo menos um ou dois componentes estruturais, ou seja, a ribonucleoproteína (RNP) ou o envelope viral.

O complexo RNP (ribonucleoproteína), é formado por proteínas pesadas, com aproximadamente 1800 cópias de proteínas “N” fosforiladas com 55 kilodalton (kd) cada, sendo portanto as maiores proteínas encontradas no interior da célula infectada pelo VR. As associações citadas têm a função de dar sustentação à estrutura helicoidal do nucleocapsídeo (RNP central) e segundo FLAMAND, DELAGNEAU & BUSSEREAU (1978), esta estrutura central em conjunto com cerca de 900 cópias de proteínas “NS” pesando 40 kd e 30 a 60 cópias de proteína “L”

pesando 244 kd, forma o complexo RNP tido como o responsável pela replicação/transcrição viral podendo acumular-se no interior da célula neuronal infectada, dando origem aos conhecidos “corpúsculos de Negri”, tão característicos da doença (MIYAMOTO & MATSUMOTO, 1965). A concentração de cargas negativas geradas pela proteína “N” do VR faz com que esta seja uma proteína antigênica específica (SCHNEIDER et al., 1973). O principal antígeno viral detectado pelas técnicas de imunofluorescência, imunoensaio enzimático, imunohistoquímica e fixação de complemento é a ribonucleoproteína porém o estímulo à produção de anticorpos neutralizantes é dado pela glicoproteína de superfície “G” (ANILIONIS, WUNNER & CURTIS, 1981; PERRIN, PROTNOI & SUREAU, 1982; WIKTOR et al., 1984). A proteína “G” é também considerada como responsável pela ligação do vírus à membrana da célula hospedeira, conforme proposto por IWASAKI, WIKTOR & KOPROWSKI (1973). A proteína “N”, conforme demonstrado por SUMNER, ESPOSITO & BELLINI (1988), pode induzir uma resposta imune eficiente contra o VR. Segundo LENTZ et al. (1984), parece haver uma interação entre a proteína “G” e os receptores de acetilcolina (AChR), facilitando a entrada do vírus na célula que concentra maior quantidade de AChR. Tal fato pode explicar o neurotropismo do VR já que uma das características principais do VR é a disseminação tanto centrípeta quanto centrífuga, sugerindo necessidade de receptores específicos na superfície das células hospedeiras. Vale lembrar porém que o papel dos receptores de acetilcolina proposto por LENTZ et al. (1982) é questionado por REAGAN & WUNNER (1985), ao demonstrarem o desenvolvimento do VR em cultivo celular, sendo que neste caso não há envolvimento necessariamente deste tipo de receptor. A análise química do VR puro demonstrou ser formado por 3 a 4% de RNA, 67% de proteínas, 3% de carboidratos associados às proteínas e 26% de lipídios (SCHNEIDER & DIRINGER, 1976). Devido à sua constituição o VR é facilmente inativado por solventes lipídicos e agentes emulsificantes como detergentes, sabões, compostos amoniacais quaternários e agentes oxidantes, além de ser sensível ao calor e dessecação, não permanecendo infeccioso muito tempo fora do hospedeiro (SOKOL, 1975).

Embora possam existir variantes secundárias do vírus da raiva (SCHNEIDER, 1982) temos um único sorotipo considerado para efeitos práticos, bem demonstrado por OLIVEIRA et al. (1995), ao compararem a identidade imunológica e sorológica entre a estirpe clássica do VR

(amostra PV) e as amostras dos vírus coletados em diferentes localidades do Brasil. Destacam-se ainda outros vírus que produzem reações cruzadas sorologicamente com o VR, tais como o “Lagos bat” (BOULDER & PORTERFIELD, 1958), o “Mokola” (FAMILUSI & MOORE, 1972; FOGGIN, 1982), o “Duvenhage” (MEREDITH, ROSSOUW & VAN PRAG KOCH, 1971), o “Obodhiang” (SCHMIDT et al., 1965), e o “Kotonkan” (KEMP et al., 1973).

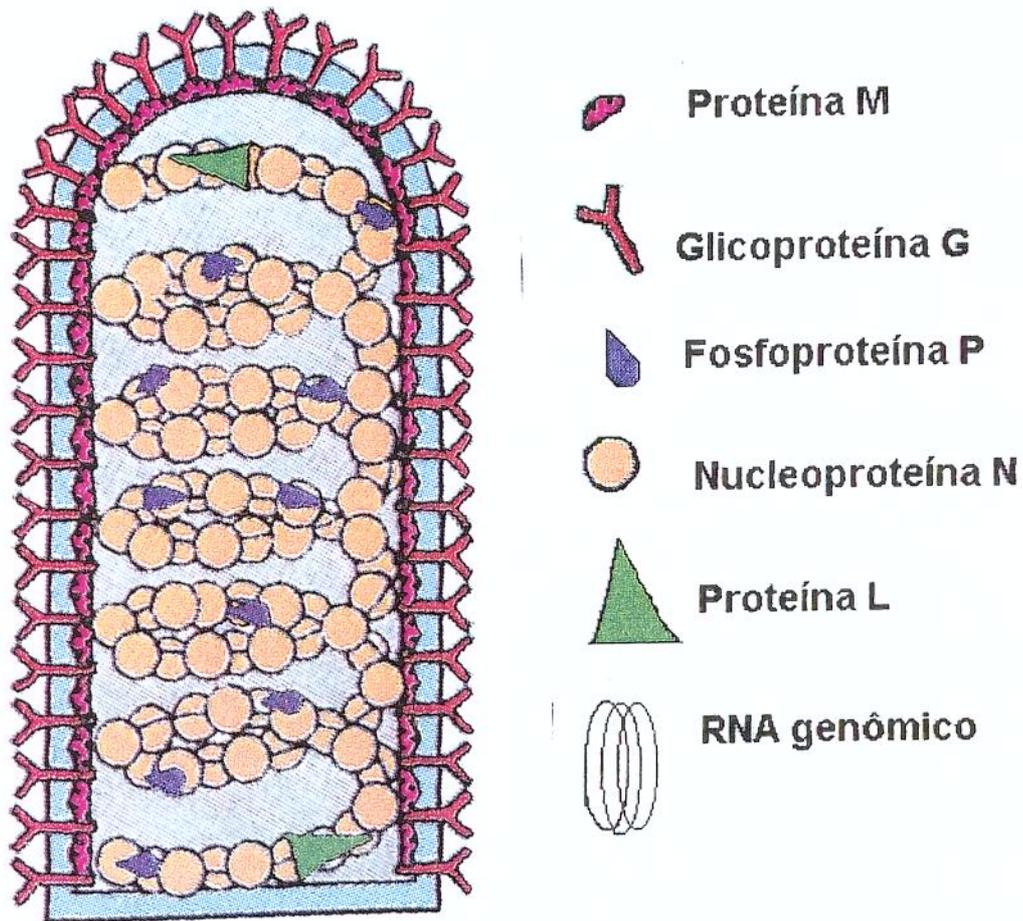


Figura 1 – Esquema do vírus da raiva. Fonte: Instituto Pasteur – São Paulo.

1.3. EPIDEMIOLOGIA DA RAIVA

O VR tem capacidade de produzir infecção em praticamente todos os animais mamíferos, porém observa-se que existe uma maior suscetibilidade para algumas espécies (WHO, 1973). As espécies tidas como as mais suscetíveis em condições naturais são os canídeos selvagens como os coiotes, chacais, raposas e lobos. Moderadamente suscetíveis são considerados os cães domésticos, gatos e os mão-peladas. O gambá comum é um dos menos suscetíveis à infecção. Na infecção experimental, as espécies mais fáceis onde se consegue reproduzir a doença utilizando a via intramuscular parecem coincidir com as espécies já citadas nas infecções naturais, acrescentando ainda os cangurus, seguidos pelos coelhos, morcegos, gatos domésticos, grandes ruminantes e suínos. Cães, ovinos, caprinos, equídeos, primatas não humanos e ratos parecem ser menos susceptível à infecção experimental intramuscular, embora este último grupo de animais sejam largamente utilizados para experimentos e diagnóstico rotineiro em inoculações intracerebrais (BAER, BELLINI & FISHBEIN, 1965).

Mesmo considerando que todos os mamíferos susceptíveis possam transmitir o VR ao ser humano, a principal fonte de infecção continua sendo o cão doméstico (WHO, 1987). Este continua, ao longo do tempo, sendo o principal transmissor da doença para seres humanos em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, constituindo-se, nesses locais, no mais importante componente da cadeia epidemiológica de transmissão (HELD, TIERKEL & STEELE, 1967; CHADLI, 1986; TAKAOKA, 1998). A forma de transmissão principal é através da mordida de um animal contaminado ou o contato direto da saliva com tecido lesado de um novo hospedeiro.

É atribuído ao pesquisador europeu Zinke, como já abordado anteriormente, a primeira demonstração científica da transmissão do VR pela saliva de um cão com sintomas clínicos da doença para um outro sadio. Cães e coelhos foram os primeiros animais a serem utilizados para reprodução da infecção experimental (PASTEUR & CHAMBERLAND, 1881) com documentação científica comprovando o fato.

Ao centralizarmos nossa ação sanitária aos caninos e felinos domésticos, além de termos como principais transmissores outros cães e gatos desenvolvendo a doença, teremos como fontes de infecção para estas espécies, os hospedeiros selvagens normalmente encontrados em áreas silvestres remanescentes e invadidas pelo homem, embora existam relatos de transmissões diretamente do VR oriundo do morcego hematófago para o cão (FERREIRA et al., 1998). Na grande maioria das vezes, quando há envolvimento humano, a transmissão do agente se dá no momento da mordida dos animais que estão eliminando o VR pela saliva. É prudente considerar uma série de fatores, a partir deste momento, quanto a possibilidade ou não da instalação do agente no novo hospedeiro, tais como quantidade de partículas virais inoculadas, patogenicidade da amostra, local de inoculação, profundidade da lesão, número de lesões e capacitação dos sistemas de defesa específica e inespecífica do novo hospedeiro. O local da agressão parece estar intimamente ligado à maior ou menor possibilidade de ocorrer ou não a doença, fato demonstrado por BABES (1912) desde o início do século, sendo que a inoculação do vírus em tecidos repletos de terminações nervosas, como por exemplo a face e a polpa digital, favorece a instalação e disseminação do VR em direção ao SNC.

É de se esperar que haja sempre uma agressão para a introdução do agente ou pelo menos contato da saliva recém eliminada com algum ferimento visível ou micro ferimentos nos tecidos. Porém a transmissão via oral, foi demonstrada por DELPIETRO et al. (1990) ao fornecerem tecidos de morcegos, cães, e bovinos mortos pela raiva, para ratos de espécies silvestres e sinantrópicos, sendo que estes ou desenvolveram a doença, ou apresentaram soropositividade ao agente indicando níveis de proteção. Tal fato pode ajudar a explicar a introdução da doença em áreas urbanas, nas espécies domésticas de companhia (cães e gatos principalmente), quando estas têm acesso a quirópteros contaminados que venham a morrer nessas áreas, mesmo que estes não sejam hematófagos.

Outras formas de transmissão têm sido descritas nas últimas décadas, como por exemplo os casos observados nos transplantes de córneas relatados por BAER et al. (1982) e O'DAY (1989). SIPAHIOGLU & ALPAUT (1985) descreveram um caso de raiva humana em recém nascido que,

embora não tenha desenvolvido o quadro típico da doença tal qual a genitora, morreu algum tempo depois do parto induzido, com diagnóstico laboratorial comprovando tratar-se de VR, indicando uma transmissão transplacentária. Esta via de transmissão também foi observada em bovinos por MARTEL, MONTES & ALCOCER (1973). Há ainda algumas citações na literatura quanto à transmissão via aerossol por inalação (WINKLER, BAKER & HOPKINS, 1972) e durante a lactação (MUGRAGE, 1930). A transmissão natural por contato direto de mucosas com saliva entre humanos também pode ocorrer segundo AMATO (1982), porém há necessidade de maiores investigações quanto à sua real possibilidade. Alguns pesquisadores questionam este tipo de transmissão baseados na não existência de comprovação científica descrita em literatura, o que também não exclui a possibilidade dela ocorrer (HELMICK, TAUXE & VERNON, 1987).

Diversos relatos já demonstraram que a raiva humana tende a diminuir quando há um eficiente programa de controle da doença em animais domésticos, principalmente quando controlamos a população canina de maneira correta, associado a um permanente programa de vacinação animal acessível à população (WHO, 1987). Dados recentes, divulgados em eventos relacionados a esta zoonose (PANACHÃO et al. 1998; PASSOS et al. 1998), demonstraram que tem aumentado a ocorrência de casos positivos entre quirópteros enviados para diagnóstico. Devido ao aumento das populações de morcegos de diversas espécies em áreas urbanas, com conseqüente aumento de notificações de agressões a humanos, esses animais silvestres assumem hoje o segundo lugar em importância na cadeia epidemiológica de transmissão do VR ao homem em algumas localidades no Brasil, principalmente devido aos diversos relatos de ocorrência do VR em espécies não hematófagas. Em alguns países da América Latina, os morcegos, de diversas espécies, tendem a assumir o primeiro lugar em importância epidemiológica na transmissão do VR para as populações locais (HOFF et al., 1993). No período de 1986 a 1998 ocorreram 573 casos humanos de raiva no Brasil diagnosticados em laboratórios, sendo que destes casos, 415 foram transmitidos por cães e 61 por morcegos, conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2. O período em questão coincide com o período utilizado para o presente estudo.

Tabela 1 - Casos de raiva humana no Brasil por região do país, durante o período de 1986 a 1998

Fonte: Fundação Nacional da Saúde – FNC, Ministério da Saúde, Brasil, 1999

REGIÃO	OCORRÊNCIAS
Norte	112
Nordeste	347
Sudeste	62
Sul	01
Centro Oeste	51
Total Geral	573

Tabela 2 - Casos de raiva humana segundo o tipo de animal agressor, no período de 1986 a 1998

Fonte: Fundação Nacional da Saúde – FNC, Ministério da Saúde, Brasil, 1999

Animal agressor	Número de casos humanos
Cão	415
Morcego	61
Ignorado	38
Gato	28
Raposa	13
Primatas	10
Outros	08
Total	573

1.4. PATOGÊNESE DA RAIVA

A saliva, em carnívoros, é a via de eliminação usual do vírus rábico sendo portanto as glândulas salivares os principais órgãos envolvidos na transmissão da doença (DIERKS, MURPHY & HARRISSON, 1969). Observa-se, porém, que nem sempre encontramos o VR na saliva de animais naturalmente infectados. Outros tecidos, particularmente os glandulares e epiteliais, podem ser infectados tanto por inoculações naturais como experimentais, inclusive os órgãos envolvidos na via de eliminação de vários agentes infecciosos tais como o pulmão, as tonsilas, os rins e bexiga, além do tecido subcutâneo, pâncreas, supra-renais, esôfago, estômago, intestinos e córnea (DEBBIE & TRIMARCHI, 1970). SMITH et al. (1972) já haviam demonstrado a presença do vírus nos nervos ao redor do folículo piloso em biópsia de pele, embora este não seja um método confiável para diagnóstico devido a possibilidade de falso-negativo tanto em animais como em humanos de acordo com FEKADU & SHADDOCK (1984).

Após a introdução do vírus, seja de forma natural ou inoculação experimental, o mesmo parece “esconder-se”, devido à dificuldade que temos de localizá-lo nesta fase. Posteriormente, há o reaparecimento do VR no sistema nervoso periférico e central, antes de quaisquer sintomas clínicos observáveis. Durante muito tempo, foi conceito generalizado que o VR, após ser introduzido no organismo por uma das usuais portas de entrada, penetrava em algum tecido nervoso periférico permanecendo aí na fase inicial do período de incubação, dirigindo-se posteriormente para o SNC, onde também permaneceria por um longo período de tempo, antes de produzir os primeiros sinais e sintomas da doença. MURPHY et al. (1973) demonstraram com o auxílio de imunofluorescência e microscopia eletrônica o acúmulo de antígeno viral nos músculos estriados e espaços extracelulares em “hamsters” recém-nascidos inoculados experimentalmente com amostras de Rhabdovirus. O VR tende a replicar-se inicialmente no tecido muscular antes de penetrar no tecido nervoso periférico através das conexões neuromusculares, permanecendo na musculatura por um período relativamente longo, porém até data recente ainda não estava claro se a replicação viral em células musculares é obrigatória (SHANKAR, DIETZSHOLD & KOPROWSKI, 1991). Ao

usarem ratos experimentalmente como modelo de infecção do VR, BAER & CLEARY (1972) observaram a permanência do vírus no local de introdução ou perto deste, durante boa parte do período de incubação, fato comprovado quando se realiza a amputação do membro utilizado para inoculação do agente, reduzindo de forma significativa os casos de manifestação clínica. É importante salientar que, com exceção do local de introdução do agente, não é possível, pelos métodos tradicionais, identificá-lo em nenhum outro tecido no espaço de tempo compreendido entre a introdução do VR e as primeiras manifestações clínicas da raiva (BAER, SHANTA & BOURNE, 1968).

A grande concentração do VR nas junções neuromusculares detectada por imunofluorescência, parece confirmar o envolvimento dos receptores da acetilcolina como um dos mecanismos utilizados para penetração na célula nervosa (LENTZ et al. 1984). Depois do período de dormência inicial e após penetrar nos nervos periféricos, o VR tende a avançar em direção ao SNC utilizando a mielina destes nervos, comprovado por MURPHY et al. (1973). BAER, SHANTA & BOURNE (1968) demonstraram o importante papel na disseminação do VR exercido pelos gânglios espinais, já que estes funcionam como uma espécie de ponte entre os nervos periféricos e a medula. De um modo geral, acredita-se que os agentes virais no tecido nervoso passam a disseminar-se célula por célula, sendo este o melhor mecanismo para explicar o direcionamento centrípeto do VR ao SNC. Através das junções sinápticas, o VR passa de neurônio a neurônio, transportado por movimento axonal retrógrado (TSIANG, 1978).

Após chegar e se instalar no encéfalo passa a haver replicação intensa do vírus por todo o tecido, havendo uma concentração maior, em algumas espécies, na região do hipocampo superior, sendo que a concentração de proteína viral no sistema límbico é responsável pela alteração de comportamento dos animais afetados, aumentando, na maioria dos casos, a agressividade do hospedeiro (MURPHY et al., 1985). Imediatamente após a replicação no encéfalo há uma distribuição centrifuga do vírus em direção aos outros órgãos, podendo ser detectado na saliva de vários animais, comprovando a disseminação em direção às glândulas salivares (DEAN, EVANS & MCCLURE 1963), havendo fortes indícios de predominância de altos títulos do VR na glândula salivar submaxilar.

No final do século XIX e início do século XX, a necessidade em desenvolver uma metodologia eficiente de diagnóstico da raiva, fez com que diversos estudos patológicos fossem desenvolvidos, que culminaram na evidenciação de inclusões no interior do citoplasma das células nervosas, inclusões estas que permanecem até hoje como sinal patognomônico para diagnóstico. As inclusões receberam o nome de seu descobridor, Adelchi Negri, passando a ser chamadas de “corpúsculos de Negri” (NEGRI, 1903; PERL, 1975). WARRELL, DAVIDSON & POPE (1976) e WARRELL & WARRELL (1988) descreveram que os achados patológicos, em casos de raiva humana, limitam-se à ocorrência de infiltrado inflamatório perivascular, congestão de vasos sanguíneos, algumas neuronofagias, e pequenas áreas de necrose neuronal, alterações estas que não justificam o elevado grau de distúrbios traduzidos pelos sintomas como aerofobia, hidrofobia, excitabilidade, incoordenações, convulsões e coma. NEHAUL (1955) e PERL (1975) observaram quadros patológicos diferentes em pessoas agredidas por quirópteros, tendendo a desenvolver mais paralisias progressivas. Estes autores descreveram ainda que não observaram alterações patológicas significativas em outros órgãos, embora corpúsculos de Negri pudessem ser detectados, o que foi confirmado por HELMICK, TAUXE & VERNON (1987) ao isolarem o VR *post mortem* de vários órgãos.

1.5. ASPECTOS CLÍNICOS DA RAIVA

1.5.1. CONSIDERAÇÕES QUANTO À EXPOSIÇÃO E INFECÇÃO

Vários estudos da história da raiva como por exemplo o descrito por BABES (1912), apontam casos de agressões humanas que não evoluíram para doença, em situações de ausência total de tratamento pós-exposição, e sendo que o animal agressor provocou a morte de pelo menos uma pessoa. Fatores já analisados como quantidade de VR inoculado no momento da agressão, tipo de agressão, e local da mordida podem explicar em parte a não evolução nesses casos, porém devemos salientar ainda que, como é usual encontrarmos sorologia positiva para VR em animais que nunca tomaram vacinas, é de se esperar nestes casos ter havido uma imunoprofilaxia naturalmente adquirida (BLACK & WIKTOR, 1986). MCKENDRICK (1941) já apontava como sendo as mordidas por animais raivosos a forma mais comum de haver infecção e desenvolvimento da doença, sendo que somente nas últimas décadas é que se observaram outras vias de penetração como possíveis de provocar a doença, vias estas já discutidas quando abordamos a transmissibilidade do VR. Chamamos a atenção para o crescente número de casos mais recentemente descritos como exposições de origem desconhecidas, ou seja, não ficaram caracterizadas fontes de infecção, após excluídas as tradicionais (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1984; CHADLI, 1986).

Como formas não naturais de infecção, a literatura aponta o transplante de córnea (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1980 e 1981), a vacinação humana com material inadequadamente inativado (PARA, 1969) e a possibilidade de transmissão sangüínea, devido à viremia observada em pacientes raivosos (BURNE, 1980).

1.5.2. PERÍODO DE INCUBAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA

Tanto em humanos quanto em animais, o período de incubação do VR tende a ser extremamente variado (DUTTA, 1992), podendo ser de apenas uma semana (PHUAPRADIT et al., 1985) até vários anos (WANG, 1956; DEAN, EVANS & MCCLURE, 1963; CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1965; WILDE & CHUTIVONGSE, 1988; GRATTAN et al., 1992).

O período de incubação, assim como o já abordado sucesso ou não da infecção viral, está relacionado com a quantidade de partículas virais inoculadas, distância do local de inoculação do SNC, e estado imunológico do hospedeiro (SIKES, 1962). Há uma tendência do período de incubação ser menor em crianças do que adultos (DUPONT & EARLE, 1966; HELD, TIERKEL & STEELE, 1967), assim como também ser menor, naqueles casos onde o paciente recebeu corticoterapia após à exposição ao agente (ANDERSON et al., 1985; ENRIGHT, 1974).

É de extrema importância observarmos que no final do período de incubação, ou seja, antes da instalação de um período prodrômico propriamente dito, é comum a eliminação do VR pela saliva do animal, principalmente do cão, por até cinco dias anteriores, sendo que nesta fase o mesmo não apresenta nenhuma sintomatologia da raiva, havendo citação na literatura de eliminação do VR por esta via, quando inoculado experimentalmente, por até treze dias antes de início da fase prodrômica (FEKADU, SHADDOCK & BAER, 1982).

1.5.3. PERÍODO PRODRÔMICO E SINTOMATOLOGIA INICIAL

As alterações iniciais observadas quase sempre são confundidas com outras doenças por não serem específicas, tais como febre, calafrios, cefaléia, cansaço, inquietação ou sugestivas de envolvimento do aparelho respiratório, (como tosse, dispnéia, irritação da mucosa), aparelho digestório (anorexia, náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia) (HATTWICK, 1972). À medida que a doença progride, observam-se alterações mais características de encefalites, como por exemplo a fotofobia, o priapismo, a agitação ou depressão, o aumento da libido, a hiposônia e distúrbios psicológicos (BHANDARI & KUMAR, 1986; CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1988). Em vários casos humanos, há queixa de dores no local da mordida e parestesias (TANGCHAI, YENBUTR & VEJAIJVA, 1970; KAPLAN, TURNER & WARRELL, 1985). Nos animais, observamos alterações bem semelhantes aos humanos, embora alguns distúrbios sejam de difícil caracterização (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1988).

1.5.4. PERÍODO DE ENVOLVIMENTO NEUROLÓGICO AGUDO

Em uma fase mais adiantada da doença há disfunções neurológicas mais observáveis, sendo que quando há uma hiperatividade, o quadro é classificado como raiva furiosa, ao passo que quando há predomínio de paralisias, é considerada raiva paralítica ou muda (LOVE, 1944; CHOPRA et al., 1980; VERMA et al., 1985; LANSKA, 1992). Períodos febris, rigidez da nuca, tremores musculares, convulsões e hipersalivação podem ser encontrados em quaisquer das duas formas mais comuns de apresentação da doença, segundo esses autores. Na raiva furiosa, ansiedade, agitação, alucinação, agressão e alterações de comportamento graves podem ser freqüentemente encontradas, associadas a quadros intermitentes de hidrofobia (WARRELL, DAVIDSON & POPE, 1976; ANDERSON et al., 1985), além de reações violentas a outros estímulos como táteis, auditivos, olfatórios e visuais. A simples movimentação do ar pode ser suficiente para desencadear um processo de agressão ou convulsão. Ainda nesta fase, há alternância entre períodos de extrema agressividade com períodos de relativa normalidade, conforme observaram KAPLAN, TURNER

& WARRELL (1985). Tais períodos ocorrendo em animais, principalmente os de companhia, acabam por significar riscos potenciais a seus proprietários, não só pela possibilidade de transmissão do vírus como também pelas lesões provocadas devido às mordidas, geralmente em crianças, já que a alternância de comportamento levam com frequência o proprietário e até mesmo o médico veterinário menos atendo, a não acreditar tratar-se de encefalite pelo VR. Na raiva paralítica, é comum observarmos um quadro inicial de parestesia, evoluindo para paralisias flácidas, diminuição dos reflexos, paraplegia, triplegia e tetraplegia (CHOPRA et al., 1980). Há casos de paralisias múltiplas de início súbito, nem sempre caracterizando uma evolução da sintomatologia. Observa-se ainda relaxamento de esfíncteres e alterações sensoriais significativas (PAWAN, 1939). Paralisias dos músculos da deglutição e da respiração acabam, assim como na raiva furiosa, levando o hospedeiro à morte (HEUSCHELE, 1987).

1.5.5. CASOS ATÍPICOS E COMPLICAÇÕES NA RAIVA

BHATT et al. (1974) e GODE et al. (1976) descreveram uma série de alterações orgânicas eventuais, principalmente nos casos em que os pacientes apresentaram uma fase clínica mais prolongada, tais como edema cerebral, aumento de secreção de hormônio antidiurético, *diabetes insipidus*, hipoxemia, arritmias cardíacas, hipotensão, retenção urinária, hipotermia, e hemorragia intestinal (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1988). A literatura demonstra citações de envolvimento cardíaco provocado pelo VR, tais como achados eventuais de corpúsculos de inclusão e miocardite focal em pequeno número dos casos humanos examinados (ARAÚJO, BRITO & MACHADO, 1971). Outros quadros atípicos de raiva animal, têm sido relatados na literatura, levando a confusões de diagnóstico clínico, o que abordamos no diagnóstico diferencial da raiva e na discussão do presente trabalho.

1.6. DIAGNÓSTICO

1.6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Considerando que a maioria dos casos humanos e animais com encefalite sugestiva de raiva apresentam sintomas bem característico da doença (LANSKA, 1992), é de se esperar que o diagnóstico clínico correto seja feito com certa frequência. A prática, porém, não tem demonstrado que há uma eficiência desejável neste tipo de diagnóstico por uma série de fatores. ANDERSON et al. (1985) apontaram como alguns desses fatores, os sintomas inespecíficos que podem ocorrer durante a fase prodrômica, levando o clínico, tanto da área humana quanto veterinária, a suspeitar de outras doenças infecciosas ou não, e até mesmo doenças degenerativas. Nos países pouco desenvolvidos, as falhas de formação profissional e de informação continuada à rede de assistência à saúde, tendem a contribuir para a falta de diagnóstico clínico precoce, sendo que mesmo nos países desenvolvidos, grande parte dos casos humanos só são diagnosticados após a necropsia (DUPONT & EARLE, 1966; CENTERS FOR DISEASES CONTROL, 1985, 1988), ou quando o paciente desenvolve encefalite de origem desconhecida associada ao histórico de possível exposição ao VR. O diagnóstico tardio da doença pode, de certa forma, comprometer o esquema de tratamento pós exposição de todas as pessoas que tiveram contato com o paciente, ou seja, os comunicantes na definição usual da epidemiologia (REMYINGTON, SHOPE & ANDREWS, 1985). É importante conhecer os agentes causadores de meningoencefalites, principalmente os virais, que comumente podem causar dúvidas, quer na patogenia, quer nas manifestações clínicas, como por exemplo, a pseudoraiva, a rinotraqueíte infecciosa, e a febre catarral maligna (HEUSCHELE, 1987). Outras doenças infecciosas que podem lembrar quadro clínico de raiva são o tétano, malária cerebral, doenças por rickettsias, febre tifóide, e ainda as não infecciosas tais como síndrome de Guillan-Barré, intoxicação por produtos químicos e encefalomielite alérgica vacinal (TURNER, 1983; HEMACHUDHA et al., 1987).

Em medicina veterinária, encefalites provocadas por doenças virais como a cinomose em cães, a encefalomielite virótica dos eqüídeos, a encefalomielite ovina, e a doença de Aujewsky em

suínos, podem levar o clínico menos atento a erro de diagnóstico. As ocorrências menos comuns, mas de igual importância no diagnóstico diferencial como a listeriose, abscessos pituitários, linfossarcomas compressivos, hipovitaminose A, botulismo, ingestão de plantas tóxicas, toxemia por organofosforados, envenenamento por chumbo, salivação por ingestão de toxinas de anfíbios, consequências de parasitoses, e doenças congênitas de envolvimento neurológico são algumas patologias ou disfunções que sempre devem ser consideradas quando o clínico analisar um envolvimento neurológico, nas diversas espécies animais (SHERMAN, 1987).

1.6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

De acordo com ANDERSON et al. (1985), testes químicos e hematológicos não são totalmente seguros para o diagnóstico de raiva, devido alterações significativas não serem observadas em todos os casos positivos. Normalmente observam-se à hematologia, índices ligeiramente fora dos padrões nos primeiros dias de curso do quadro clínico, acentuando-se à medida que a doença progride, o mesmo acontecendo à análise da urina, e exame do líquido céfalo raquidiano. KOMSUOGLU, DORA & KALABAY (1981) afirmaram que o eletroencefalograma (EEG) só caracteriza alterações significativas no período final da doença. Outros meios de diagnósticos, tais como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, edema e sinais indicativos de infartos cerebrais podem ser observados à medida que a doença progride (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1988). Ao longo do tempo diversas técnicas de diagnóstico têm sido utilizadas para o VR, geralmente utilizando o material, tanto animal quanto humano, coletado após a morte destes, sendo que prevalece as técnicas rotineiras de diagnóstico, principalmente a imunofluorescência direta (SILVA, SILVA & GUIMARÃES, 1973).

Para diagnóstico *ante mortem*, pode-se utilizar a técnica de biópsia de pele com bastante sucesso (BINGHAM & MLAMBO, 1995), juntamente com a imunofluorescência direta, ou outras técnicas como coleta da saliva e inoculação intracranial em camundongo ou em cultivo celular,

impressão da córnea, utilização da secreção traqueal e líquido cerebrospinal. É importante salientar que nenhuma destas técnicas produzem 100% de resultado positivo nos casos de raiva em pesquisa *ante mortem*. Os laboratórios de diagnóstico de raiva utilizaram por longo período a identificação dos corpúsculos de inclusão citoplasmática, conhecidos por corpúsculos de Negri para diagnóstico *post mortem* (FU, WEIHE & ZHENG, 1993). Porém, devido ao grande número de resultados falso-negativos e ao aparecimento de técnicas mais confiáveis tal método deixou de ser utilizado rotineiramente. No Brasil, a rotina laboratorial nos laboratórios credenciados utiliza as provas de imunofluorescência direta e isolamento do vírus, também chamada de prova biológica ou inoculação em camundongos. A imunofluorescência direta demonstra ser um método de grande sensibilidade, revelando as partículas virais disseminadas pelo material examinado, e evidenciando a infecção pelo VR mesmo que pouco material viral esteja contido na amostra. A evidenciação se faz através de minúsculos pontos fluorescentes, denominados comumente de “poeira antigênica”, que é o resultado da ligação do antígeno viral com o anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína, quando submetido à iluminação especial (SILVA, SILVA & GUIMARÃES, 1973). A prova biológica consiste em preparar o tecido nervoso a ser pesquisado, transformando-o em um macerado diluído em solução fisiológica, e tratado com antibióticos, para inoculação intracerebral em camundongos lactentes, na expectativa de reprodução da doença. Após a inoculação aguarda-se por um período mínimo de 21 dias com observação diária para detectar quaisquer sintomatologias já conhecidas da infecção pelo VR nestes animais. Os tecidos nervosos dos camundongos mortos neste período são coletados e submetidos a um novo exame de imunofluorescência direta para confirmar se a causa foi realmente a raiva. Todo este processo visa garantir o máximo possível de confiabilidade no resultado dos exames. (NILSSON & SUGAY, 1966).

A imunofluorescência direta e a prova biológica são de grande valor para o diagnóstico da raiva na rotina laboratorial devido à pouca possibilidade de ocorrer falso-negativos, mesmo quando comparados com o diagnóstico citológico imunohistoquímico (FEIDEN et al., 1985). ZIMMER et al. (1990) descreveram que os principais métodos de diagnóstico têm sido comparados quanto à sua eficiência. A técnica de peroxidase e anti-peroxidase juntamente com a imunofluorescência direta

são as que apresentam melhores resultados quando comparadas com a prova biológica, cultivo celular, identificação de corpúsculos de Negri e avaliação de alterações inflamatórias nos tecidos, sendo estes dois últimos métodos de pouca utilização no diagnóstico definitivo. Ainda em relação ao diagnóstico, a técnica de imuno diagnóstico enzimático rápido para raiva (RRAID) tem sido apresentada como método de maior sensibilidade e especificidade para o VR, quando comparada com a imunofluorescência direta e a prova biológica, porém com necessidade de adaptações aos diferentes hospedeiros observados para este agente (SAXENA et al., 1989). É importante salientar que em certas situações, como por exemplo na utilização de saliva de animais raivosos para diagnóstico, tanto a imunofluorescência direta quanto o teste enzimático não apresentam diversidade quanto à sensibilidade (JAYAKUMAR, RADAMASS & RAGHAVA, 1989). Anticorpos contra o vírus da raiva podem atualmente ser detectados por diversas técnicas, sendo que o método imuno ensaio enzimático (ELISA) e o teste de inibição rápido (RFFIT), parecem ser os que mais têm sensibilidade (MEBATSION et al., 1992).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Estudar prospectivamente as manifestações clínicas da raiva em animais domésticos, durante a ocorrência da epidemia em animais no município de Mogi Guaçu e região, estado de São Paulo, no período de 1989 a 1998.

Objetivos específicos:

- Estudar as manifestações clínicas típicas e atípicas da doença, que ocorreram no período.
- Estudar as alterações macro e microscópicas dos tecidos dos animais vítimas da doença.
- Estudar a correlação anátomo-clínica dos casos típicos e atípicos da doença.

Animais e Métodos

3. ANIMAIS E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DA AMOSTRAGEM

Durante uma epidemia de raiva animal na micro região de Mogi Guaçu, estado de São Paulo, envolvendo inclusive os municípios de Mogi Mirim, Itapira, Estiva Gerbi e Leme, houve a necessidade de implantação de um Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) para as atividades de controle da doença raiva em animais e outras zoonoses. A implantação do CCZ propiciou a busca ativa dos casos, observação clínica dos animais, coleta de material e encaminhamento para os laboratórios oficiais de diagnóstico, além de fornecer subsídios para os procedimentos médicos de atenção à saúde coletiva quanto à vacinação ou soro-vacinação humana. Mesmo durante a fase de implantação do CCZ passamos a fazer observações clínicas dos animais que teriam algum tipo de envolvimento na cadeia epidemiológica da raiva. Os animais clinicamente doentes (com sintomatologia típica esperada para raiva), os suspeitos, os comunicantes e os agredidos (e provavelmente em período de incubação) eram encaminhados para o Centro de Controle de Zoonoses para os procedimentos de rotina. A população foi orientada para que informasse sobre todo animal que apresentasse mudança de comportamento, por mais sutil que este se manifestasse, para que a unidade de controle o retirasse do convívio doméstico ou da rua, mesmo que temporariamente, e o submetesse a observações diárias no intuito de caracterizar manifestações clínicas sugestivas da infecção pelo VR. Todo animal encaminhado ao CCZ era submetido a exame clínico e colocado em observação por um período mínimo de dez dias a partir de uma possível agressão a humanos ou a detecção, ainda na residência, de mudanças de comportamento. Pelo menos quatro vezes ao dia os animais em isolamento eram rigorosamente observados para a detecção de quaisquer sintomatologias sugestivas de infecção pelo VR, sendo os dados anotados em folha de observação própria.

Cães não domiciliados capturados nas ruas e os que eram espontaneamente doados para as equipes de captura ou levados até o CCZ eram mantidos em canis coletivos, excetuando aqueles com sintomas sugestivos da raiva ou com alguma outra doença manifestada. Utilizou-se ainda, como fonte de infecção, os animais que eram encaminhados já mortos ao CCZ, quer por munícipes, quer por médicos veterinários autônomos. Alguns casos de animais mortos vieram de municípios vizinhos para coleta de material e encaminhamento para análise laboratorial. Além de cães, órgãos de alguns felinos e bovinos que também morreram com sintomas neurológicos e com diagnóstico posterior positivo para VR, foram regularmente examinados.

É importante salientar que todos os animais que morreram naturalmente, desenvolvendo ou não sintomas da raiva, nos canis de isolamento ou coletivos, tiveram o SNC coletado para diagnóstico, como também fragmentos do tecido cardíaco e de diversos órgãos em alguns casos para serem posteriormente processados, tão logo o envolvimento do VR fosse confirmado. O mesmo se deu com os cães que, por motivos variados, tiveram a história natural da doença abreviada por eutanásia e, ainda, os que foram encaminhados já mortos para o CCZ. Um dos objetivos iniciais era estudar a disseminação do VR no tecido cardíaco, razão pela qual no primeiro momento somente ter sido coletado fragmentos do SNC e coração. Passamos, posteriormente, a coletar fragmentos dos diversos órgãos de todos os animais caracterizados como possível fonte de infecção. Graças ao acompanhamento clínico rigoroso dos animais em observação é que se pôde observar a morte súbita em alguns cães que aparentemente não apresentavam quaisquer sintomas sugestivos da doença raiva, ou outra patologia clinicamente detectável.

3.2. CASUÍSTICA

Como a proposta inicial era estudar mais detalhadamente o tecido cardíaco de animais raivosos, nos primeiros casos não foram coletados outros órgãos, a não ser tecido nervoso do SNC e o coração (período de agosto de 1989 a julho de 1990). Todos os animais que foram encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses no período de agosto de 1990 a agosto de 1998, já mortos ou que tiveram morte natural no CCZ, e que tinham importância epidemiológica (atropelamentos, doenças com envolvimento neurológico, mudança de comportamento, histórico de ter sido agredido anteriormente por animais de destino desconhecido, morte súbita) foram necropsiados, com coleta de fragmentos do SNC para envio a laboratórios credenciados para o diagnóstico do VR, e coleta de fragmentos dos diversos órgãos. Entre animais das espécies canina, felina e bovina, foram coletadas amostras de tecidos de 635 animais, sempre observando o critério de haver um indicativo epidemiológico importante no histórico do animal ou no próprio óbito, relacionado com a possibilidade de ocorrência da doença raiva. A distribuição dos casos e do material colhido estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição da coleta de material segundo causa da morte no período de agosto de 1989 a agosto de 1998

ESPÉCIE	CAUSA DA MORTE	NÚMERO DE CASOS
Cães:		
	.Sem observações clínicas:	
	. Atropelamentos e morte	33
	. Atropelamentos com necessidade de eutanásia	10
	. Eutanásia na própria residência e realizada pelo proprietário	39
	.Observações clínicas por outros profissionais:	
	. Encaminhados por clínicas veterinárias, já mortos, com histórico de agressões	23
	.Observações clínicas no CCZ:	
	. Sintomatologia neurológica típica da raiva, com morte espontânea	268
	. Sintomatologia neurológica típica da raiva, com eutanásia por solicitação do proprietário	71
	. Mudança de comportamento e morte espontânea sem sinais neurológicos típicos	38
	. Encaminhados para observação com história de agressão anterior porém sem sintomas neurológicos no CCZ, com morte espontânea por outras doenças	97
	. Animais em período de observação, sem sintomas e com morte súbita inesperada	12
Total de cães		591
Gatos:		
	. Atropelamentos seguidos de morte	6
	. Doenças de envolvimento neurológico típico	13
	. Eutanásia na própria residência, realizada pelo proprietário	4
	. Eutanásia no CCZ, por solicitação do proprietário	5
	. Encaminhados por clínicas veterinárias	3
	. Agressores por outras doenças, sem envolvimento neurológico	4
	. Morte súbita	3
Total de gatos		38
Bovinos:		
	. Doenças de envolvimento neurológico típico	4
	. Morte acidental com histórico de agressão anterior por cão	2
Total de bovinos		6
Total de animais encaminhados para exame		635

Para garantia dos resultados, no mesmo período, 65 amostras controle de SNC foram encaminhadas para diagnóstico laboratorial sendo que desses, 20 foram processadas para histopatologia. Todas essas amostras pertenciam a animais da espécie canina, foram coletadas aleatoriamente e tiveram diagnóstico laboratorial negativo para o VR. Dos 635 casos de importância epidemiológica encaminhados para diagnóstico laboratorial, 112 apresentaram diagnóstico positivo para raiva na imunofluorescência direta e prova biológica. Deste total, 74 foram utilizados para o presente estudo. Foram selecionados também 10 casos de animais vítimas de outra doença viral, a cinomose, típica de cães, para estudo dos mesmos materiais coletados para a doença raiva, e posterior avaliação comparativa.

Considerando que desde a coleta de material e remessa ao laboratório credenciado de um caso com envolvimento epidemiológico importante para a doença raiva até que se tenha o diagnóstico conclusivo demanda algum tempo, principalmente devido à prova biológica, não nos restou outra alternativa a não ser coletar fragmentos de tecidos de todos os animais encaminhados, iniciar a fase de processamento e aguardar os resultados para dar continuidade ou não ao processo. Os animais eram necropsiados sempre com a preocupação de detectar alterações orgânicas macroscópicas sugestivas da raiva (como por exemplo a presença de corpos estranhos no estômago e intestino) como também de outras doenças típicas de animais (como por exemplo gastroenterite por outras viroses ou parasitas). Fragmentos de tecido nervoso, e de outros tecidos como glândulas salivares, língua, estômago, intestinos, linfonodos diversos, rins, bexiga, supra-renal, fígado, baço, pulmão foram retirados e colocados em solução de formol a 5%, em recipientes devidamente identificados. Todos os corações dos animais envolvidos foram coletados inteiros, bem como os respectivos SNC, sendo que destes, parte foi preservado e o restante encaminhado para diagnóstico laboratorial.

3.3. MÉTODO DE PROCESSAMENTO DO MATERIAL

O uso da parafina como método de preservação de estruturas para visualização microscópica tem sido largamente utilizada ao longo do tempo e demonstra ser um dos melhores métodos mesmo quando comparado a outras formas de preservação (BOURGON & CHARLTON, 1987). Após a confirmação da positividade da amostra para o VR, o material que estava já a alguns dias na solução de formaldeído a 5% era encaminhado para o laboratório de histopatologia do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), onde através de técnicas rotineiras era colocado em blocos de parafina (em média 20 blocos para cada animal) para posterior confecção de lâminas e submetidos a técnicas de coloração. Ao processar o tecido cardíaco, além das estruturas musculares procurou-se coletar as regiões anatomicamente conhecidas como concentrantes de gânglios e outros tecidos nervosos. No total foram confeccionadas 1152 lâminas (já descartadas as que apresentavam quaisquer tipos de imperfeições à confecção), sendo 992 de animais positivos para o VR e 160 dos animais controle. Além disso, tecidos de 10 animais com diagnóstico laboratorial positivo para cinomose, doença de envolvimento neurológico tipicamente canina, foram também processados para que pudessemos ter um padrão comparativo de outra doença viral, dando um total de outras 82 lâminas. Todas as lâminas foram submetidas à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (HE), identificadas adequadamente (tecido de origem) e numeradas, sendo que os blocos originais foram igualmente identificados e arquivados, seguindo metodologia de processamento laboratorial descrita por ALLEN (1992). Os tecidos que deram origem aos fragmentos coletados, estão conservados em solução de formaldeído e submetidos periodicamente a substituição da solução. Depois de prontas, as lâminas foram criteriosamente examinadas. Foram anotadas todas as alterações histopatológicas observáveis à microscopia óptica tais como presença de infiltrado inflamatório intersticial, infiltrado inflamatório perivascular, necroses focais, ganglioneurite, corpúsculos de Negri, hemofagocitose, e outras não relacionadas com a raiva, como granulomas inespecíficos e cistos parasitários, nos tecidos dos órgãos examinados e linfonodos regionais. Para quantificação dos achados histopatológicos, procuramos colocar em categorias de acordo com o número de achados, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Critério de quantificação de achados histopatológicos observáveis à microscopia óptica

Classificação	Quantificação	Achados por campo óptico
Achado discreto	+	> 5 achados
Achado moderado	++	6 a 15 achados
Achado intenso	+++	< 15 achados

Os fragmentos de tecidos preparados à coloração HE que demonstravam alterações significativas observáveis à microscopia óptica, ou seja, que foram classificados como achado intenso conforme descrito na tabela anterior, eram selecionados (os blocos parafinados) para serem submetidos à imunohistoquímica, com exceção do material oriundo dos animais vítimas de morte súbita. A investigação do VR pela técnica imunohistoquímica, foi demonstrada em casos de raiva humana (FEIDEN et al., 1985), sendo que nos animais objetos do presente trabalho, o referido pesquisador deu sua contribuição utilizando igualmente anticorpo específico contra a ribonucleoproteína (RNP) do VR (FEIDEN et al., 1988). Não foi possível submeter todo o material à análise imunohistoquímica, porque dependíamos de envolvimento de pesquisadores de outras instituições, porém o material encaminhado para ser processado fora do país forneceu resultado suficiente para complementar nossos estudos. Dos 74 casos estudados, 22 foram submetidos à imunohistoquímica na Alemanha, sendo principalmente seções do tecido cardíaco, da glândula salivar, da supra-renal e do SNC. Deste material processado na Alemanha, 34 lâminas pertencentes a 10 animais foram devolvidas para a origem, todas com positividade ao VR demonstrada através de anticorpos monoclonais. Os casos de cinomose foram selecionados a partir de investigação da história natural da doença durante o período que estiveram sob a guarda dos respectivos proprietários ou internados em clínicas veterinárias, associados à evidência clínica da doença, principalmente a instalação de mioclonias típicas. Todos os casos foram confirmados laboratorialmente e também encaminhados para análise da presença do VR.

Os 20 animais separados para controle passaram por exames clínicos e foram submetidos a eutanásia após um período de observação idêntico aos animais suspeitos de raiva, sendo parte dos encéfalos encaminhados para exames laboratoriais. Embora ao longo de todo o período de coleta de material utilizado neste trabalho não foram somente estes que apresentaram diagnóstico negativo para o VR, somente destes foram coletados fragmentos dos diferentes órgãos por terem sido submetidos a acompanhamento clínico rigoroso e necropsiados. A pesquisa histopatológica desses animais foi feita de forma “cega simples”, ou seja, sem que se conhecesse a origem, para não haver nenhum tipo de indução.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA E PROVA BIOLÓGICA

Todos os exames para diagnóstico de raiva foram encaminhados para o Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo ou para o Instituto Pasteur de São Paulo. Como procedimento de rotina, o material foi processado para imunofluorescência direta e prova biológica. O resultado das amostras enviadas aos laboratórios credenciados estão distribuídos na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultado laboratorial para a raiva dos casos de importância epidemiológica enviados para diagnóstico no período de agosto de 1989 a agosto de 1998

. Número de casos animais analisados em laboratório.....	635
. Casos animais positivos para a raiva.....	112 (17,67%)
. Caninos positivos.....	107
. Felinos positivos.....	3
. Bovinos positivos.....	2
. Animais negativos.....	519
. Casos impossibilitados de diagnóstico laboratorial.....	4
Casos humanos positivos para raiva no mesmo período.....	3

Das 635 amostras, 04 não puderam ser processadas devido ao adiantado estado de decomposição. No período de agosto de 1989 a agosto de 1998, 03 casos humanos tiveram diagnóstico para raiva na região, sendo o material igualmente encaminhado ao Instituto Pasteur de São Paulo.

4.2. RESULTADO DA AVALIAÇÃO CLÍNICA NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS

Durante o período de observação dos animais recolhidos ao CCZ, ou que permaneceram na residência, pôde-se caracterizar o desenvolvimento da raiva nas suas manifestações clínicas tradicionais em pelo menos 59 casos. Doze cães tiveram morte súbita, sendo que desses, 10 estavam recolhidos ao CCZ. Definimos como morte súbita os casos em que o animal morreu sem manifestar quaisquer sintomas típicos de raiva ou de outras doenças durante o período de observação, fato este caracterizado pela observação criteriosa de todos animais no mínimo 3 vezes ao dia, sendo ainda submetidos à necropsia tão logo fossem detectadas as mortes. Dos 12 cães com morte súbita, 06 apresentaram diagnóstico positivo para raiva ao exame laboratorial. Cinco desses animais estavam no CCZ, sendo que um deles, oriundo de quarentena em residência (devido histórico de ser agredido por cão desconhecido 28 dias antes da morte), se enquadrava perfeitamente na nossa definição de morte súbita. Enterite hemorrágica, sem outras alterações típicas da raiva, detectada clinicamente através de produção de fezes com indícios de sangue em decomposição, eliminação de muco, e odor característico foram observados em 14 animais posteriormente diagnosticados positivos para raiva, que permaneceram vivos por um período superior a 4 dias de evolução clínica natural. Esta ocorrência também foi notada em 06 animais que foram tratados com terapia de suporte (reposição hidro-eletrolítica e sedação), permanecendo vivos por período superior a 8 dias de evolução clínica da doença. Em 02 cães, a manifestação clínica principal foi paralisia progressiva dos membros posteriores sem caracterização de agressividade ou outras manifestações de distúrbios de comportamento, entrando em coma rapidamente (3 dias) e indo a óbito. Um animal apresentou todos os sintomas típicos da doença nos 4 primeiros dias de observação, iniciando um progressivo processo de restabelecimento a partir do 5º dia, voltando inclusive a se alimentar quase que normalmente no 7º dia de evolução clínica, porém no 9º dia iniciou um processo de paralisia progressiva indo a óbito no 12º dia. As principais ocorrências verificadas durante a observação estão distribuídas na Tabela 6.

Tabela 6 - Ocorrências no período de observação dos animais de interesse epidemiológico na história natural da raiva

. Número total de animais de interesse epidemiológico	635
. Número de cães de interesse epidemiológico.....	591
. Cães observados clinicamente.....	403
. Cães vítimas de morte súbita durante a observação	10
. Manifestações clínicas tradicionais nos animais da espécie canina, positivos para a raiva.....59	
Agressividade.....	24
Paralisias generalizadas.....	13
Agressividade seguida de paralisias generalizadas.....	22
Sialorréia.....	47
Paralisia da musculatura da deglutição.....	52
Apatia	11
. Manifestações clínicas sugestivas de outras doenças de envolvimento neurológico em cães positivos para a raiva.....25	
Mioclonias	5
Auto mutilação.....	2
Ataxia.....	9
Alteração do reflexo pupilar.....	3
Convulsões.....	5
. Manifestações clínicas sem envolvimento neurológico com diagnóstico positivo para a raiva.....17	
Enterite hemorrágica exclusivamente.....	10
Broncopneumonia exclusivamente.....	3
Enterite e broncopneumonia.....	4
. Cães vítimas de morte súbita positivos para a raiva.....	6
. Número de cães positivos para a raiva.....	107
. Enterite hemorrágica como um dos achados nos cães positivos para a raiva.....	39
. Evolução atípica quanto ao período patogênico esperado da doença em cães.....	1

Houve uma morte por asfixia logo no primeiro dia de observação após o animal ser recolhido ao CCZ por ter agredido o seu proprietário. À necropsia, verificou-se que houve asfixia por alimentos deixados à disposição do cão, já que este estava com dificuldade de deglutição. Tal fato nos induziu a mudança na estratégia de fornecimento de alimentos a animais suspeitos de raiva.

A maioria das observações nos casos de cinomose foi no período final da doença, onde já há manifestação neurológica típica, sendo que nesta fase é comum os proprietários procurarem descartar o animal devido à impossibilidade de resolução. Dos 10 animais observados, 04 tiveram morte natural e 06 foram submetidos à eutanásia após 15 dias de recolhimento ao CCZ. Durante a observação, pôde-se detectar ocorrência de 04 casos de pneumonias típicas na fase inicial da doença, além de mioclonias, apatia e paralisias de ocorrência final em todos os animais, conforme o esperado e citado na literatura.

4.3. RESULTADO DAS NECROPSIAS

Todos os animais comprovadamente raivosos utilizados no presente trabalho foram necropsiados para identificação macroscópica de possíveis alterações. Em 11 cães foram encontrados objetos estranhos no estômago e intestinos (pedras, plásticos, madeira, tecidos, metais e outros), provocando lesões gastrointestinais por corpos estranhos, porém em 39 cães observamos um quadro típico de enterite hemorrágica com lesões generalizadas ao longo da mucosa do intestino delgado e em muitos casos estendendo para o intestino grosso. Lesões por auto mutilação foram detectadas em 02 cães, sendo que um apresentava a parte superior da pata direita bastante mutilada por mordeduras e lambeduras constantes e outro com mutilação do prepúcio e parte do pênis (a observação clínica já havia detectado tais processos). Presença de líquido no pulmão foi achado constante embora a caracterização de edema pulmonar generalizado só foi confirmada em 08 animais. Em 16 cães observou-se comprometimento pulmonar provavelmente por infecções oportunistas, produzindo grande quantidade de secreção muco purulenta. Peritonite generalizada foi encontrada em um dos cães que tinha ingerido corpos estranhos, sendo que neste caso havia uma transfixação de um pedaço de arame em uma alça intestinal com extravasamento de conteúdo intestinal para a cavidade peritoneal. Os casos de morte súbita não apresentavam quaisquer alterações macroscópicas significativas, salvo em 02 animais onde foram encontrados exemplares de *Toxocara canis*, o que foi também achado macroscópico, junto de outras parasitoses, em 31 outros animais com diagnóstico positivo para raiva. Quanto aos demais casos de morte súbita que tiveram diagnóstico negativo para o VR, não foi possível chegar a nenhuma conclusão através da necropsia. Na maioria dos animais que tiveram resultado positivo, pôde-se observar macroscopicamente, congestão dos vasos no encéfalo. Tal achado foi comparado aos casos controle submetidos à eutanásia. Nestes, nenhuma alteração foi detectada, a não ser as referidas parasitoses, embora com infestações sem grande conseqüências aparentes para os animais hospedeiros. Dos 10 animais utilizados para diagnóstico de cinomose, 04 apresentavam alterações pulmonares (pneumonias, atalectasia, edema moderado) e 01 com urolitíase, sendo que um cálculo já havia se deslocado para a bexiga.

4.4. RESULTADO DOS EXAMES HISTOPATOLÓGICOS

Seguindo os critérios anteriormente apresentados (Tabela 4) referentes à quantificação do achados histopatológicos, passaremos a apresentar os resultados por órgãos, ou seja, das 1152 lâminas coletadas de diversos órgãos e estudadas. Um achado freqüente, e de certa forma inesperado ao início dos nossos trabalhos foi a ocorrência de hemofagocitose em quantidade acima do que se normalmente observa como fato natural, em vários tecidos. Tal ocorrência pode ser observada na Figura 2.

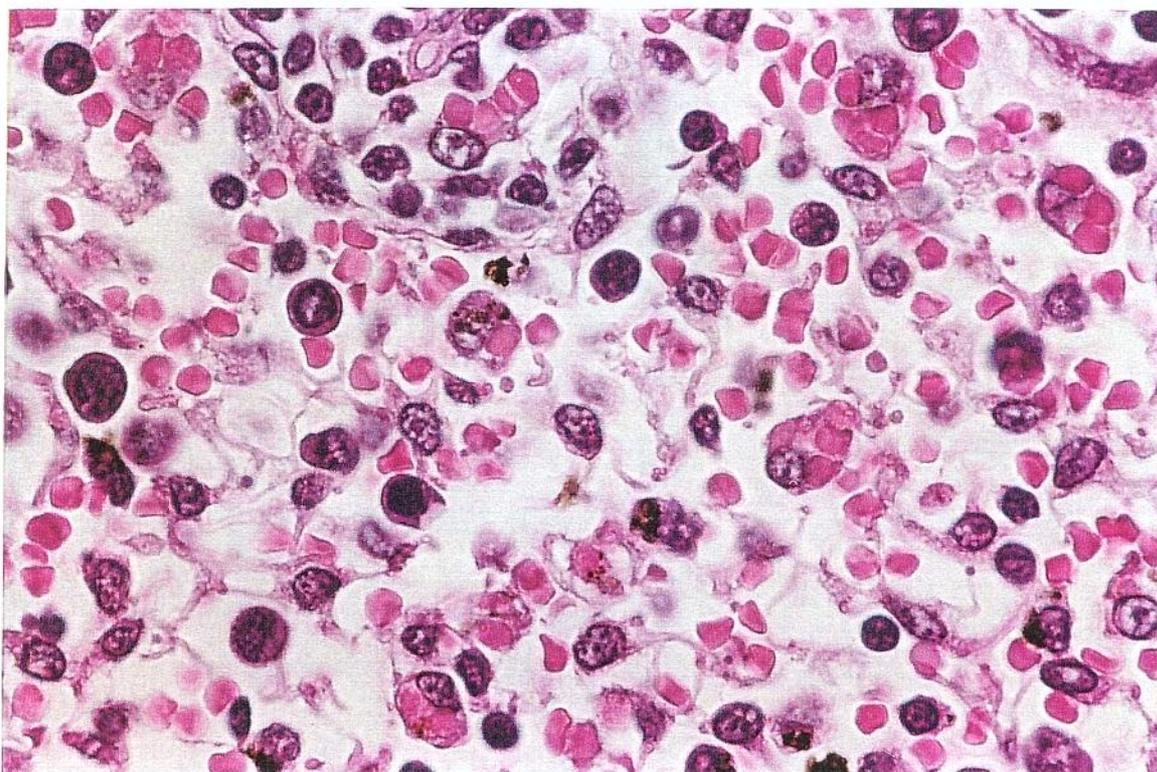


Figura 2 – Ocorrência de hemofagocitose em tecidos de animais com diagnóstico positivo para a raiva

4.4.1. CORAÇÃO

Dos 74 casos positivos para raiva que tiveram material cardíaco processado, foram confeccionadas 407 lâminas dos ventrículos (papilar anterior e posterior), átrios, nó sino-atrial, e aorta-pulmonar. Houve o critério de sempre tentar localizar um ou mais gânglios nervosos na observação microscópica. Os achados mais comuns estão distribuídos na Tabela 7

Tabela 7 - Achados histopatológicos no coração de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Infiltrado inflamatório intersticial, intenso	27	36
. Infiltrado inflamatório intersticial, moderado	62	84
. Infiltrado inflamatório perivascular, intenso	27	36
. Infiltrado inflamatório perivascular, moderado	48	65
. Ganglioneurite nos gânglios vegetativos, discreta	59	80
. Corpúsculos de Negri, discreto	28	38
. Hemofagocitose, intensa	25	34
. Hemofagocitose, moderada	20	27
. Necrose focal, discreta	04	05
. Cisto parasitário único	02	03
. Granuloma inespecífico único	01	01
N.º total de casos positivos para raiva examinados	74	

Os corações de 01 bovino e 02 felinos examinados não apresentaram alterações significativas. A evidenciação dos corpúsculos de Negri, foi através da própria técnica de coloração HE, não sofrendo o material quaisquer outros procedimentos de coloração. Como foram feitas várias lâminas de um mesmo tecido cardíaco, observaram-se alterações como os infiltrados inflamatórios linfocitários perivasculares em graus variados oriundos de um mesmo material.

4.4.2. GLÂNDULAS SALIVARES

Foram examinadas 113 lâminas oriundas de 52 animais positivos para raiva, com achados histopatológicos descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Achados histopatológicos nas glândulas salivares de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário, intenso	16	31
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário, moderado	38	73
. Ganglioneurite nos gânglios parassimpáticos, discreta	36	70
. Corpúsculos de Negri, discreto	12	23
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	

4.4.3. SUPRA-RENAL

Foram examinadas 86 lâminas oriundas de 52 animais positivos para raiva, com achados histopatológicos descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Achados histopatológicos na supra-renal de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário intenso na região medular	07	13
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário moderado na região medular	18	35
. Ganglioneurite nos gânglios parassimpáticos das imediações	22	42
. Corpúsculos de Negri, discreto	04	08
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	

4.4.4. INTESTINOS

Foram examinadas 73 lâminas oriundas de 52 animais positivos para raiva, com achados histopatológicos descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Achados histopatológicos nos intestinos de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário, intenso	18	35
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário, moderado	37	71
. Ganglioneurite nos plexos, moderado	11	21
. Infiltrado inflamatório perivascular, intenso	01	02
. Infiltrado inflamatório perivascular, moderado	09	17
. Hemofagocitose, moderada	04	08
. Corpúsculos de Negri, discreto	02	04
. Necrose da mucosa intestinal, moderada	07	13
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	

Dos 52 animais raivosos examinados 39 apresentavam sinais clínicos de enterite hemorrágica aguda, fato confirmado à necropsia.

4.4.5. SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Parte do SNC foi separado para envio ao laboratório de diagnóstico, sendo que geralmente a metade do hemisfério cerebral mais fragmentos do cerebelo, região de transição para medula, e porção inicial da medula foram processados para histopatologia. Dos 52 casos positivos para raiva estudados, selecionamos 118 lâminas, com achados patológicos descritos na Tabela 11. Como resultado, destacamos também a ocorrência de proteína viral indistintamente por todos os componentes do SNC, não limitando-se aos tradicionais locais de concentração citados na literatura.

Tabela 11 - Achados histopatológicos no SNC de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Encefalite característica no cérebro, moderada	19	36
. Encefalite característica no cerebelo, discreta	05	10
. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário discreto no tronco	35	67
. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário moderado na medula (proximal)	12	23
. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular, intenso	17	33
. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular, moderado	24	46
. Necrose neuronal, discreta	15	29
. Corpúsculos de Negri, moderado	27	52
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	
Total de lâminas com alterações patológicas	87	74
Total de lâminas examinadas	118	

4.4.6. BEXIGA URINÁRIA

Foram examinadas 37 lâminas oriundas de 52 animais positivos para raiva, com achados histopatológicos descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Achados histopatológicos na bexiga urinária de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário moderado na região adventícia dos vasos linfáticos	09	17
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário moderado na região muscular	04	08
. Ganglioneurite, discreta	16	31
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	
Total de lâminas com alterações patológicas	14	38
Total de lâminas examinadas	37	

4.4.7. PULMÃO

Foram examinadas 31 lâminas oriundas de 52 animais positivos para raiva, com achados histopatológicos descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Achados histopatológicos no pulmão de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário, moderado	05	10
. Antracose, moderada	22	42
. Atalectasia, discreta	13	25
. Edema, discreto	07	13
. Congestão de vasos, moderada	09	17
. Ganglioneurite, discreta	08	15
. Hemofagocitose, discreta	06	11
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	
Total de lâminas com alterações patológicas	27	87
Total de lâminas examinadas	31	

4.4.8. RIM

Foram examinadas 27 lâminas oriundas de 52 animais positivos para raiva, com achados histopatológicos descritos na Tabela 14.

Tabela 14 - Achados histopatológicos no rim de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário, intenso	05	10
. Infiltrado inflamatório intersticial linfoplasmocitário, moderado	10	19
. Necrose focal crônica, moderada	05	10
. Pielonefrite, discreta	07	13
. Ureterite, discreta	06	11
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	
Total de lâminas com alterações patológicas	13	48
Total de lâminas examinadas	27	

4.4.9. BAÇO

Foram examinadas 34 lâminas oriundas de 52 animais positivos para raiva, com achados histopatológicos descritos na Tabela 15.

Tabela 15 - Achados histopatológicos no baço de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Plasmocitose, discreta	04	08
. Hemofagocitose, intensa	21	40
. Centros germinativos ativados, moderado	09	17
. Necrose focal, discreta	03	06
. Autólise, moderada	02	04
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	

4.4.10. FÍGADO

Foram examinadas 28 lâminas oriundas de 52 animais positivos para raiva, com achados histopatológicos descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Achados histopatológicos no fígado de cães raivosos à microscopia óptica de lâminas coradas pela HE

Tipo de alteração patológica e quantidade	N.º de casos	% do total
. Hemofagocitose, moderada	19	36
. Necrose focal, discreta	07	13
. Autólise, discreta	01	02
. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular, moderado	03	06
N.º total de casos positivos para raiva examinados	52	

4.4.11. LÍNGUA e GÂNGLIOS LINFÁTICOS ADJACENTES

Foram preparadas 26 lâminas de tecido muscular da língua e 12 lâminas de gânglios linfáticos de regiões diversas. No material processado do tecido muscular, quase não se detectou alterações significativas, sendo digno de nota apenas pequenas regiões com infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários discretos. Nos gânglios linfáticos observamos a presença de hemofagocitose em 03 casos.

4.5. RESULTADO DA IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas analisadas demonstraram uma grande quantidade de proteína viral distribuída pelo citoplasma, principalmente nas células dos gânglios nervosos cardíacos (Figura 3) . O tecido do SNC e glândula salivar examinados também demonstraram concentração de proteínas virais, em intensidade variáveis. Dos animais submetidos à imunohistoquímica, 04 casos tiveram um curso maior de período patogênico, sendo que nestes a quantidade de material concentrado nos citoplasmas das células nervosas também foi maior. Chamou a atenção o fato de 02 cães que tiveram morte súbita, embora demonstrando pouca quantidade de material viral à imunofluorescência direta no SNC (mas suficiente para serem considerados positivos), apresentarem quantidade significativa de reação à imunohistoquímica nas lâminas oriundas dos gânglios cardíacos. Observamos ainda à imunohistoquímica, uma grande disseminação do vírus por todo o citoplasma das células do material submetido a esta técnica de investigação, sendo que em alguns casos, toda a célula nervosa apresentava a proteína viral, o que pode ser observado na Figura 4. Nos cortes histopatológicos obtidos em seqüência e submetidos a diferentes métodos de coloração para observação à microscopia, conseguimos detectar a ocorrência de apenas alguns corpúsculos de Negri à observação por técnicas de coloração usuais. O material contíguo, quando submetido à imunohistoquímica, apresentava, além dos tradicionais anéis de concentração de proteína que caracteriza a formação dos corpúsculos de Negri, uma quantidade relativamente grande de antígenos distribuídos pelo citoplasma da célula.

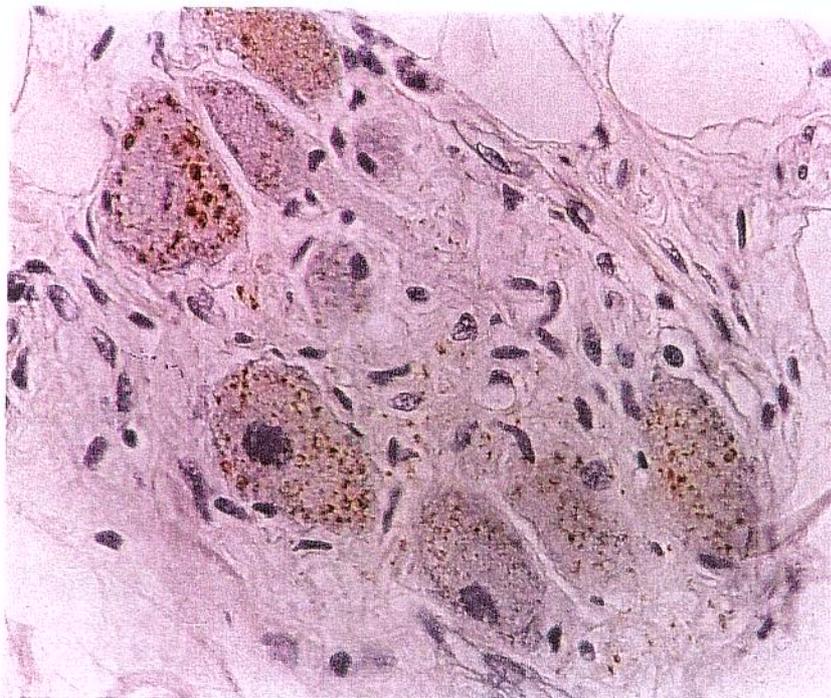


Figura 3 – Presença do vírus rábico em células do gânglio vegetativo do coração, demonstrado por imunohistoquímica

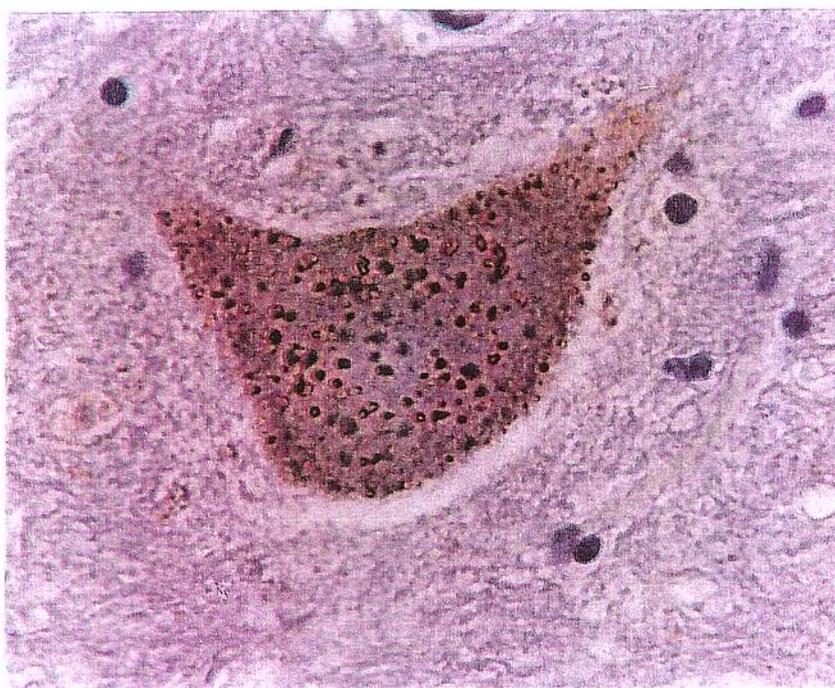


Figura 4 – Presença de vírus rábico em células do SNC, demonstrado por imunohistoquímica

4. 6. CORRELAÇÕES ANÁTOMO-CLÍNICAS

Considerando que durante as observações pôde-se caracterizar a ocorrência de variadas manifestações clínicas da raiva em animais, algumas bastante discutidas na literatura disponível tais como quadros de apatia intensa alternada com agressividade, agressividade seguida de paralisias generalizadas, apenas ocorrência de agressividade, apenas ocorrência de paralisias, apatia seguida de paralisias, e outras manifestações menos citadas como as convulsões, os quadros de diarreia, as mioclonias, e as alucinações, procuramos confrontar esses dados com outras manifestações clínicas e achados histopatológicos. Para melhor entendimento dos resultados das correlações apresentadas a seguir, as manifestações clínicas mais comumente observadas foram caracterizadas por numeração: apenas apatia durante o período patogênico (1), apenas agressividade durante o período patogênico (2), apatia alternando com agressividade (3). Estas manifestações clínicas foram comparadas com outras detectadas durante o período de observação, com dados do histórico dos animais e com os achados histopatológicos.

A comparação do número de órgãos com infiltrados inflamatórios com os grupos de manifestações clínicas mais comuns demonstrou não haver diferenças significativas ($p = 0,08673$), o mesmo ocorrendo comparando o achado histopatológico ganglioneurite e o achado corpúsculos de inclusão (Negri). Os animais que receberam mais doses de vacina anti-rábica anuais tenderam a apresentar a doença sem manifestações de agressividade, sendo que o quadro de apatia ($p = 0,00372$) e morte por paralisias progressivas foram as ocorrências mais observadas. O teste “student newman keuls” mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando todos os grupos em pares. Quando comparamos a ocorrência apatia e os achados histopatológicos por órgão, não caracterizaram-se resultados que pudessem expressar correlações significativas (Tabela 17). O mesmo se deu à comparação entre a agressividade e os achados histopatológicos por órgão (Tabela 18).

Tabela 17 - Comparação entre os achados histopatológicos nos animais vítimas da raiva e a manifestação clínica apatia observada no período patogênico da doença

	Número	r	p
. Infiltrado inflamatório linfocitário no coração	27	0,08433	0,33788
. Infiltrado inflamatório linfocitário no SNC	27	-7,33709e-04	0,49855
. Corpúsculo de Negri no coração	27	0,2429	0,11107
. Corpúsculo de Negri no SNC	27	0,26218	0,12807
. Órgãos com infiltrado inflamatório linfocitário	27	0,01912	0,46228
. Órgãos com ganglioneurite	27	0,12628	0,26511
. Órgãos com corpúsculos de Negri	26	0,07554	0,35689

Tabela 18 - Comparação entre os achados histopatológicos nos animais vítimas da raiva e a manifestação clínica agressividade observada no período patogênico da doença

	Número	r	p
. Infiltrado inflamatório linfocitário no coração	20	-9,85034e-04	0,49835
. Infiltrado inflamatório linfocitário no SNC	20	0,29296	0,105
. Corpúsculo de Negri no coração	20	0,02555	0,4574
. Corpúsculo de Negri no SNC	20	0,21523	0,18106
. Órgãos com infiltrado inflamatório linfocitário	20	0,12127	0,30526
. Órgãos com ganglioneurite	20	0,3641	0,05725
. Órgãos com corpúsculos de Negri	20	0,20253	0,19589

4.6.1. CORRELAÇÃO ANÁTOMO-CLÍNICA DA DIARRÉIA

Para verificarmos a possibilidade de ocorrência de quaisquer correlações entre os achados histopatológicos e a manifestação clínica diarreia, estudos comparativos foram realizados, obtendo-se os resultados indicados na Tabela 19, caracterizando uma tendência de aparecimento de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário nos animais com achados no intestino ou com diarreia. Estes achados podem ser demonstrados quando fazemos a correlação entre a diarreia e a linfoplasmocitose ponderada ($p = 0,00018$).

Tabela 19 – Comparação entre os achados histopatológicos dos animais vítimas da raiva e a manifestação clínica diarreia observada no período patogênico da doença

	Número	r	p
Infiltrado inflamatório linfocitário no coração	14	0,13774	0,31931
Infiltrado inflamatório linfocitário no SNC	14	0,52456	0,02706
Infiltrado inflamatório linfocitário na glândula salivar	14	0,51614	0,054
Infiltrado inflamatório linfocitário nos intestinos	14	0,61774	0,018
Infiltrado inflamatório linfocitário no esôfago	14	0,5203	0,056
Ganglioneurite na glândula salivar	14	0,0536	0,42779
Ganglioneurite no intestino delgado	14	0,53809	0,046
Hemofagocitose no intestino delgado	14	0,20393	0,24218
Plasmocitose no SNC	14	0,26319	0,18163
Plasmocitose na glândula salivar	14	0,46387	0,04738
Plasmocitose na supra-renal	14	0,21697	0,2281
Plasmocitose no intestino delgado	14	0,485	0,03938
Plasmocitose no intestino grosso	14	0,63178	0,00768
Corpúsculo de Negri no coração	14	0,43771	0,05875
Corpúsculo de Negri na supra-renal	14	0,34843	0,11106

Quando comparamos os animais que manifestaram diarreia com os que não a apresentaram, podemos observar que há uma ocorrência maior de certos achados histopatológicos nos animais que apresentaram esta manifestação clínica. Tais dados estão demonstrados na Tabela 20.

Tabela 20 - Comparação entre os achados histopatológicos nos animais sem e com diarreia, vítimas da raiva

Variável: Órgãos com infiltrado inflamatório Manifestação clínica: diarreia P = 0,02076 Animais com diarreia apresentam maior ocorrência de infiltrado inflamatório
Variável: Órgãos com hemofagocitose Manifestação clínica: diarreia P = 0,01064 Animais com diarreia apresentam maior ocorrência de hemofagocitose
Variável: Linfoplasmocitose ponderada Manifestação clínica: diarreia P = 0,04751 Animais com diarreia apresentam maior ocorrência de linfoplasmocitose
Variável: Órgãos com infiltrado inflamatório perivascular ponderado Manifestação clínica: diarreia P = 0,01744 Animais com diarreia apresentam maior ocorrência de infiltrado inflamatório perivascular
Variável: Órgãos com congestão Manifestação clínica: diarreia P = 0,01079 Animais com diarreia apresentam maior ocorrência de congestão

4.6.2. CORRELAÇÃO ANATOMO-CLÍNICA DOS CASOS DE MORTE SÚBITA

Embora tenham sido detectados 06 casos de morte súbita, todos com diagnóstico laboratorial comprovado para a doença raiva, 03 desses casos não foram estudados na sua integridade, tanto porque não houve preocupação inicial de coleta dos vários órgãos para estudo, como já relatado nos métodos de trabalho. Devido a este fato achamos por bem utilizar somente os 03 casos onde

podemos coletar os vários órgãos e estudá-los sistematicamente, sendo que o resultado desses estudos estão demonstrados na Tabela 21.

Tabela 21 - Comparação entre os achados histopatológicos e a manifestação morte súbita no período de observação

Variável: Infiltrado inflamatório linfocitário no coração Morte súbita P = 0,03168 Animais vítimas de morte súbita apresentaram menor número de infiltrado inflamatório linfocitário no coração
Variável: Infiltrado inflamatório linfocitário no sistema nervoso central Morte súbita P = 0,4745 Animais vítimas de morte súbita não apresentaram alterações significativas quanto número de infiltrado inflamatório linfocitário no sistema nervoso central
Variável: Infiltrado inflamatório linfocitário na glândula salivar Morte súbita P = 0,81909 Animais vítimas de morte súbita não apresentaram alterações significativas quanto número de infiltrado inflamatório linfocitário na glândula salivar
Variável: Ganglioneurite no coração Morte súbita P = 0,07705 Animais vítimas de morte súbita não apresentaram alterações significativas quanto número de ganglioneurite no coração
Variável: Corpúsculos de Negri no coração Morte súbita P = 0,07286 Animais vítimas de morte súbita não apresentaram alterações significativas quanto número de corpúsculo de Negri no coração
Variável: Corpúsculo de Negri no sistema nervoso central Morte súbita P = 0,31361 Animais vítimas de morte súbita não apresentaram alterações significativas quanto número de corpúsculo de Negri no sistema nervoso central
Variável: Número de órgãos com ganglioneurite Morte súbita P = 0,28286 Animais vítimas de morte súbita não apresentaram alterações significativas quanto número de órgãos com ganglioneurite

4.6.3. COMPARAÇÃO ENTRE AS DOENÇAS RAIVA E CINOMOSE

Embora o estudo da cinomose não se constituísse em um dos objetivos do presente trabalho, achamos por bem obter um modelo comparativo de ocorrência de doença viral, que manifestasse de forma semelhante ao vírus da raiva, para verificarmos se as alterações histopatológicas encontradas na raiva eram de ocorrência exclusiva da mesma. Os estudos histopatológicos resultaram em observações de infiltrado inflamatório linfocitário e hemofagocitose em níveis semelhantes nos animais estudados para ambas as doenças, porém as vítimas da cinomose apresentaram achados um pouco mais acentuados em alguns órgãos, conforme demonstrado nas análises a seguir. Comparando a densidade do infiltrado inflamatório linfocitário entre casos de raiva e da cinomose encontramos maior intensidade para cinomose em vários órgãos, tais como sistema nervoso central, (teste U Mann Whitney $p = 0,0009$), supra renal (teste U Mann Whitney $p = 0,0074$), intestino delgado (teste U Mann Whitney $p = 0,00792$), intestino grosso (teste U Mann Whitney $p = 0,02083$), estômago (teste U Mann Whitney $p = 0,00549$). A glândula salivar não demonstrou ocorrência de infiltrado inflamatório maiores para cinomose (teste U Mann Whitney $p = 0,09$). Ao compararmos a sobrevida nas duas doenças, observamos tempo significativamente menor na doença raiva (teste U Mann Whitney $p = 0,00503$).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A partir do momento em que se estabeleceram as diretrizes para o presente estudo todos os animais com diagnóstico laboratorial positivo para raiva oriundos da micro região em questão foram utilizados. Embora os casos positivos possam ter sido em um número muito maior que os diagnosticados ao exame clínico e laboratorial, fato demonstrado devido aos constantes relatos da população quanto à eliminação de cães agressores e descarte das carcaças, pôde-se utilizar um número bastante significativo de casos positivos de raiva animal naturalmente desenvolvida. Estudos experimentais semelhantes tornam-se relativamente difíceis devido a uma série de fatores, sendo o risco de transmissão às pessoas envolvidas algo a ser considerado, bem como a dificuldade de reprodução da doença em condições experimentais. Mesmo assim, um grande número de tecidos pode ser processado, constituindo-se em um arquivo significativo de material utilizado para o presente trabalho e para outros que por ventura venham a ser solicitados, encontrando-se devidamente conservado e arquivado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

No estabelecimento de critérios para coleta e remessa de material ao laboratório de diagnóstico de raiva, procuramos selecionar os animais de interesse epidemiológico para que não houvesse utilização inadequada dos meios de diagnóstico. Selecionamos todos os animais que na observação clínica apresentaram alguma manifestação neurológica, sugestiva de raiva ou não, animais com alteração de comportamento (por mais sutil que este se apresentasse), animais com manifestações clínicas sugestivas de alguma doença ou distúrbios pertencentes aos grupos tidos como passíveis de produzir confusões no diagnóstico diferencial, e animais vítimas de atropelamentos. Procuramos ainda incluir os casos onde a caracterização de outras doenças não foi evidenciada. A inclusão neste último grupo de vítimas de enterite, pneumonia e morte súbita, possibilitou que encontrássemos casos completamente atípicos de raiva. Tal procedimento pode vir a ser incluído nas normas de seleção e remessa de material para diagnóstico de raiva, ampliando assim, a segurança dos comunicantes.

A observação clínica com avaliações várias vezes ao dia, ajudou a caracterizar os casos de morte súbita, bem como a coleta das várias informações apresentadas ao longo do presente trabalho. Tal procedimento só se torna possível quando há a instalação de unidades de controle de zoonoses nos municípios, com estrutura adequada de funcionamento, e equipe com formação e treinamento para desempenhar as ações. A caracterização de um caso onde o período patogênico se estendeu por 12 dias, nos induz a repensar a norma de observação de animais agressores com o intuito de liberar os comunicantes humanos de imunoprofilaxia, que hoje prevê um período de observação não superior a 10 dias.

Os corpos estranhos encontrados à necropsia no aparelho digestório de 11 animais (10% dos animais positivos), com as conseqüências típicas desses casos, reforçam a necessidade de encaminhar para diagnóstico todas as vítimas de alteração de comportamento, mesmo que, nestes casos, não hajam manifestações clínicas sugestivas da raiva, já que a morte pode ocorrer antes dos sintomas característicos.

A utilização de anticorpos monoclonais já havia sido apontada por PASTORET (1982) e MACEK (1982), como uma grande aliada na análise e resolução de problemas nas áreas biológicas, principalmente na Medicina Veterinária, devido às possibilidades amplas de utilização em combinação com outras técnicas conhecidas na época e a serem desenvolvidas. O uso de anticorpos monoclonais contra o VR tem sido bastante difundido nos últimos anos para diversas finalidades, como já previa SMITH (1988), ao apontar o uso de monoclonais em estudos de prevalência, distribuição, transmissão e outros, principalmente no que se refere à raiva silvestre. OXFORD (1982) já havia demonstrado a importância do uso de anticorpos monoclonais em virologia. LAFON et al. (1985) utilizaram o anticorpo monoclonal para testes imunoenzimáticos demonstrando potência de vacinas, através da presença de glicoproteína nas mesmas. Nos nossos achados, pôde-se observar e demonstrar que, em vários órgãos estudados, há uma predileção do VR para o tecido nervoso, principalmente concentrando-se nos gânglios nervosos, confirmando o relato de FEIDEN et al. (1985).

Embora por muito tempo tenha sido sustentada a hipótese de concentração viral em determinadas áreas do SNC, razão pela qual sempre se utilizou áreas como o hipocampo, tidos como locais de concentração do VR (MURPHY, 1997), passamos a considerar a hipótese de distribuição das partículas virais por todo o SNC dos animais, aumentando no decorrer do curso natural da doença. A proteína viral é detectável por imunohistoquímica nas células nervosas, sendo que quando comparamos os tecidos assim processados oriundos dos animais que passaram pelo curso natural da doença, ou seja, tiveram uma sobrevida maior, com os animais vítimas de morte súbita, os primeiros apresentam uma quantidade significativamente maior de proteína viral no interior das células.

Ao visualizarmos a célula acometida pelo vírus através da imunohistoquímica, podemos perceber que pode haver tanto uma distribuição da proteína viral, como concentrações da mesma em determinados locais da célula. Como a coloração utilizada para detecção de corpúsculos de Negri baseia-se justamente na evidenciação dos locais onde há maior concentração do VR (SELLERS, 1955), é de se esperar que a mesma não evidencie bem as poucas partículas virais que por ventura estejam disseminadas pelo citoplasma. Por conseguinte, através da imunohistoquímica, podemos supor que a ausência de corpúsculos de Negri não exclui a hipótese da presença do VR. Embora a comparação da ocorrência de corpúsculo de inclusão à coloração por HE e imunofluorescência direta em relação à positividade por imunohistoquímica não fosse objeto do nosso estudo, pôde-se observar que a ocorrência de algumas áreas positivas à imunohistoquímica não evidenciava na mesma proporção a presença de corpúsculos de Negri, nem concentração da chamada “poeira antigênica” típica na imunofluorescência direta. Tal fato tende a corroborar com as evidenciações descritas por PALMER et al. (1985), sendo que no presente estudo além do SNC, as evidências também foram observadas em gânglios nervosos de outros órgãos, demonstrando uma maior sensibilidade da imunohistoquímica. A utilização de anticorpos monoclonais para auxílio no diagnóstico rotineiro ou ainda em estudos epidemiológicos pode vir a ser mais uma alternativa no futuro, a partir da utilização de material fixado por solução de formaldeído ou outros conservantes, já que de acordo com nossos estudos a imunohistoquímica provou ser superior como método para visualização de antígenos, quando comparado com outras técnicas rotineiras, porém com limitações

quando se preconiza o diagnóstico laboratorial rápido. Salientamos ainda que inclusões citoplasmáticas em células nervosas de cães comprovadamente não raivosos, indistinguíveis quanto à forma e estrutura das inclusões observadas em animais raivosos e denominadas de corpúsculos de Negri, foram observadas por NIETFELD et al. (1989), o que possivelmente não ocorreria à utilização de anticorpos monoclonais.

Os achados nas lâminas processadas pela coloração HE dos vários tecidos coletados, e confirmados por imunohistoquímica, podem ser interpretados como uma distribuição generalizada do VR por todo o organismo animal, conforme já havia sido teorizado por SILVA & SOUZA (1968) quando reproduziram a doença utilizando diferentes tecidos de cão raivoso, inoculando-os em animais de laboratório. Da mesma forma, os achados histopatológicos no tecido nervoso cardíaco na maioria dos animais por nós estudados, sugerem o comprometimento progressivo deste órgão na história natural da doença.

Procuramos classificar, mesmo que para efeitos didáticos, os hospedeiros doentes em típicos, em fase prodrômica e atípicos, sendo que estes últimos tornaram-se um dos principais objetos do nosso estudo. A importância dada aos casos atípicos se deve aos riscos de determinados hospedeiros poderem eliminar o agente pela via usual de transmissão, sem apresentar quaisquer sinais ou sintomas que permitam ao médico veterinário clínico caracterizar o caso como sendo raiva (SILVA & SILVA, 1973). A possibilidade de eliminação do vírus na ausência de quaisquer sintomatologias sugestivas da raiva, numa fase prodrômica, já havia sido considerada por FEKADU, SHADDOCK & BAER, (1982).

A revisão bibliográfica realizada para elaborarmos o presente trabalho não apresentou nenhuma citação de morte súbita sem sintomatologia anterior de encefalite pelo VR em animais, sendo que o único caso documentado foi um relato de morte súbita por VR em humano, descrito por SIPAHIOGLU & ALPAUT (1985), sobre um recém nascido cuja mãe desenvolveu quadro típico de raiva no último mês de gestação, sendo necessário a indução do parto. Segundo os autores a criança foi a óbito pouco tempo após o nascimento e só foi investigado o envolvimento neurológico pelo VR, devido ao histórico materno.

Discussão

Os casos de morte súbita com diagnóstico positivo para o VR à imunofluorescência, e com positividade à imunohistoquímica, e conseqüente ocorrência de infiltrados inflamatórios nos gânglios nervosos cardíacos, sugerem alterações fisiopatológicas neste órgão quer por disfunção no SNC, quer por alterações no próprio tecido nervoso do coração. Como hipótese, poderíamos supor que a morte ocorreu por anomalias no sistema de condução, devido a presença do vírus no SNC, causando arritmias e bradicardias graves, desencadeando a morte súbita, assim como é observado em pacientes humanos vítimas de epilepsia (OPESKIN, THOMAS & BERKOVIC, 2000). Não deixamos de considerar a possibilidade da morte súbita ser conseqüência da ganglioneurite, como descrito em doenças virais em pacientes humanos por JAMES & IMAMURA (1981), possibilidade de raiva humana (METZE & FEIDEN, 1991) e doença de chagas (BAROLDI, OLIVEIRA & SILVER, 1997), porém as alterações detectadas não nos dá subsídios suficientes para caracterizar a ocorrência da morte súbita devido às disfunções do tecido cardíaco das vítimas, levando-nos a crer que o óbito ocorre por ação do vírus diretamente no SNC, principalmente pelo fato da ocorrência da morte súbita se dar no período inicial da proliferação do VR. O fato é que, independentemente da origem, a ocorrência da morte súbita comprovada por VR torna-se um sério risco à saúde pública, pois coloca proprietários e outros comunicantes com o animal vitimado passíveis de contraírem o VR sem terem ciência de tal fato, principalmente quando consideramos os achados indicativos de comprometimento da glândula salivar pelo VR em 3 dos animais que apresentaram morte súbita. Quando comparamos os achados histopatológicos dos animais vítimas da raiva, incluindo os casos de morte súbita, com os animais vítimas de cinomose, observamos que a cinomose, provavelmente por ter um período patogênico maior, produz achados histopatológicos em quantidade senão maior, pelo menos na mesma proporção que a raiva nos animais, com exceção da glândula salivar, confirmando a nossa hipótese de comprometimento deste tecido pelo VR, mesmo na ausência de sintomatologias. Como já é conhecido a transmissão do VR na fase prodrômica da doença, esses animais podem perfeitamente infectar humanos por contágio direto, sendo que a morte súbita dificilmente resultará em coleta de material e envio para diagnóstico específico. A tendência natural seria descartar a carcaça do animal, descartando por conseguinte qualquer atitude de profilaxia em relação a uma eventual transmissão e instalação do vírus em outros hospedeiros humanos ou animais que conviveram com o vitimado, principalmente se agressões não fizerem

parte do histórico. Portanto, podemos afirmar que o conhecimento adequado das fontes de infecção, das vias de eliminação, das vias de transmissão e das vias de penetração, associados aos conhecimentos das atipias do VR, em muito pode colaborar com a vigilância epidemiológica da raiva, capacitando os técnicos para desenvolvimento de programas sanitários e educativos adequados ao controle da mesma, conforme já havia sugerido por PERRY (1987); STEHR-GREEN & SCHANTZ (1987) e NIEUWENHUIJS, HAAGSMA & LINA (1992).

A raiva assintomática, ou melhor dizendo, sem a sintomatologia clássica conhecida foi observada por SHERIKAR (1991), e apontada também como um grave problema de saúde pública. Os casos por nós observados de enterite hemorrágica com curso relativamente curto da raiva podem perfeitamente confundir o clínico menos avisado. O mesmo podemos considerar quando analisamos as apatias e as paralisias progressivas sem uma caracterização clara de outros sintomas sugestivos da doença raiva. A gravidade do problema é maior quando verificamos que várias regiões do país continuam sendo caracterizadas como “silenciosas” para a raiva animal, ou seja, embora não estejam ocorrendo casos notificados oficialmente, o número de solicitações de diagnóstico laboratorial de animais de interesse epidemiológico para a raiva é insuficiente ou até mesmo inexistente para traduzir tais regiões como livres da doença.

A ocorrência significativa de hemofagocitose na maioria dos casos de raiva comprovada, fato até então não demonstrado para esta doença em Medicina Veterinária (ASSIS, BRANDÃO & METZE, 1996), sugere uma desorganização do sistema imunológico frente a esta doença viral, a exemplo do que já foi relatado em casos de doenças virais humanas. EAKLE & BRESSOUD (2000) relataram ser a hemofagocitose uma desordem caracterizada por proliferação intensa de histiócitos, observada não só em doença virais (como Epstein-Barr), mas também em doenças bacterianas e parasitárias. Porém, os mecanismos fisiopatológicos da hemofagocitose ainda não são bem conhecidos conforme relatado por SOTTO et al. (1994). A hemofagocitose foi igualmente por nós observada nos casos de cinomose, que também é uma doença viral, típica de cães.

A apatia, com tempo de duração variável, foi mais observada em animais que tinham histórico de vacinação anti-rábica anterior, conforme ficou demonstrado na correlação desses fatos. Como o processo de imunização animal também estava sob responsabilidade do CCZ, sendo que havia uma certa garantia da qualidade do produto e das ações (vacinação anual), hipotetizamos que pode ter havido uma instalação mais gradativa do VR no SNC, provavelmente devido aos anticorpos formados pela vacinação, embora insuficientes para bloquear a doença, conforme ocorre em outras viroses de animais, como exemplo, a parvovirose.

A correlação dos achados histopatológicos nos animais raivosos que apresentaram a manifestação clínica diarreia, com os que embora igualmente positivos para o VR não a apresentaram, demonstrou haver uma tendência de concentração de infiltrados inflamatórios nos diversos tecidos, além dos intestinos. Ocorrência de hemorragia intestinal no curso da raiva é apontada como um dos achados em raiva humana (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1988), porém não há relatos da frequência em animais. Como em medicina veterinária existe um grande número de agentes causadores de gastroenterites, inclusive virais que tendem a cursar de maneira semelhante às observadas nos cães raivosos, a ocorrência de tais doenças tornam-se frequentes na clínica, dificultando o diagnóstico pelo profissional menos atento quanto à raiva, principalmente considerando que tal manifestação não é comumente citada como manifestação clínica da raiva.

Graças ainda a quantidade de material examinado, pôde-se caracterizar fatos não bem elucidados pela literatura científica consultada até a data deste trabalho. Os mais relevantes são: a presença de grande quantidade de vírus em determinados órgãos mesmo quando há pouca distribuição do mesmo no SNC, demonstrado por imunohistoquímica, sugerindo disseminação desordenada do VR pelo organismo; a concentração de infiltrados inflamatórios em determinados locais, sem que haja concentração compatível do agente nestes sítios, demonstrado por imunohistoquímica, sugerindo um desarranjo dos sistemas de defesa; a caracterização de que nem sempre há presença do VR no tecido glandular salivar, mesmo quando há disseminação da proteína viral por outros tecidos.

Os animais controle não apresentaram alterações dignas de nota, sendo que a utilização dos mesmos serviu para testarmos a confiabilidade de todos os procedimentos realizados, já que as numerações dos materiais examinados à histopatologia não indicavam a origem.

Todo o trabalho foi realizado em casos naturais da doença, sendo que tal procedimento, além das informações clínicas e histopatológicas já discutidas, produziram outros dados importantes para serem abordados nesta discussão. A disseminação do vírus em área urbana demonstrou estar intimamente ligada à imediata ou não interferência do homem no processo. Animais de interesse econômico criados pelo homem, tais como suínos, caprinos, ovinos, eqüídeos, e bovinos, têm no morcego hematófago a principal fonte de infecção, porém vale salientar que a prática demonstrou que os cães, em uma situação de epidemia da doença em animais, constituíram-se nos principais transmissores para estas espécies.

A detecção da epidemia de raiva animal na região estudada só foi possível mediante estudos retrospectivos quanto a circulação do agente na mesma, ao longo dos anos. O estudo retrospectivo revelou diagnósticos laboratoriais esporádicos de raiva animal em cães, gatos, bovinos e eqüinos desde a década de 60, porém sem nenhum trabalho anterior de controle efetivo da circulação do VR. Tal fato nos levou a crer que a circulação do agente viral já era antiga e cíclica, razão pela qual eventualmente nos picos das epidemias animais, um ou outro caso era encaminhado para diagnóstico, mantendo ao longo de quase três décadas (tempo utilizado de estudo retrospectivo) o aparecimento eventual de resultados laboratoriais, muitos deles com intervalos de vários anos. Importa salientar que o último caso positivo detectado na micro região foi em 1993, em um bovino, sendo que a coleta sistemática de material permaneceu até o mês de agosto de 1998, devido ser este tempo (5 anos) considerado como período de segurança para caracterizar uma determinada área como controlada para a doença raiva, após uma epidemia animal da mesma. Casos posteriores a 1993 foram encaminhados ao CCZ de Mogi Guaçu por profissionais do município de Leme.

A identificação das epidemias de raiva animal parecem sempre estar associadas à presença de profissionais com formação em saúde pública específica, o que nos leva a supor que devem ocorrer muitos outros casos de raiva nas diversas espécies animais e quem sabe até mesmo em humanos do que se tem notícia, embora a doença nas últimas décadas tenha declinado significativamente em várias regiões, principalmente no estado de São Paulo graças ao trabalho desenvolvido pelas comissões e Institutos ligados ao controle da mesma. Enquanto não há possibilidade de controle mais eficiente e duradouro, o nosso estudo contribui para que hajam metodologias de prevenção mais rigorosas para a população exposta nas áreas onde a doença é sabidamente sem controle.

Falta de pessoal adequadamente treinado, deficiência do processo de educação em saúde, dificuldade de convergência dos vários profissionais envolvidos em uma ação de controle e ausência de decisão política são provavelmente alguns dos principais motivos para se perpetuar a situação de epidemia da raiva animal em uma região não controlada, conforme já afirmavam TIERKEL (1975) e BAER (1984). Passamos a considerar tal afirmação quando analisamos que os três casos humanos na região estudada com diagnóstico laboratorial positivo só foram evidenciados justamente devido ao trabalho de conscientização da população e das ações estabelecidas pelo sistema de saúde dos municípios envolvidos frente à epidemia de raiva animal detectada. Na realidade, ao detectarmos uma fonte de infecção importante na zona urbana, e graças a um intenso trabalho de educação em saúde, pudemos ampliar as ações de vigilância epidemiológica tão importantes para a continuidade dos trabalhos desenvolvidos no sentido de minimizar a circulação do VR bem como implantar uma estrutura adequada de controle de população animal, fato este que só ocorreu após o primeiro óbito humano. Assim que foi implantado o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), conforme a diretrizes apontadas pelo Programa Nacional de Zoonoses (PNZ) do Ministério da Saúde que na época estabelecia as normas para tal fim, foram iniciados os trabalhos de controle desta zoonose permitindo um material para estudo que pudesse ser adequadamente controlado, dentro de um princípio de rigidez científica, e com condições de gerar as informações necessárias para o presente trabalho e outros de natureza epidemiológica, saúde pública, comportamento animal, e controle da raiva.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas observações clínicas, nas necropsias, na histopatologia convencional, na imunohistoquímica e no período de acompanhamento da epidemia da raiva, podemos enumerar algumas conclusões:

- Foi demonstrada a presença do vírus da raiva por imunohistoquímica no sistema nervoso central, no coração e na glândula salivar de animais vítimas de morte súbita, sem qualquer sintomatologia anterior sugestiva da raiva ou outra doença.
- A raiva pode apresentar-se com sintomatologias atípicas tais como diarreia e apatia, como únicas manifestações clínicas, ou apresentar-se com manifestações sugestivas de outras doenças induzindo a um diagnóstico clínico errôneo.
- Ficou caracterizada a possibilidade de ser as alterações provocadas pelo VR no SNC, o principal fator de desencadeamento da morte súbita.
- A ausência de corpúsculos de inclusão no citoplasma de células nervosas não exclui a possibilidade de haver proteína viral disseminada nas mesmas.
- A ocorrência de proteína viral nos tecidos de cães na fase prodrômica da doença, é um fator indicativo da eliminação do vírus pela saliva, sendo este um fator de risco potencial à saúde pública, principalmente nos casos de morte súbita.
- Há ocorrência de hemofagocitose em frequência elevada nos diversos tecidos de animais vítimas da raiva, sugerindo desorganização do sistema imunológico.

SUMMARY

7. SUMMARY

The occurrence of an epidemic of rabies in a certain region in the State of São Paulo provided detailed investigations related to the clinical development of the disease in animals, particularly in dogs. The event made the identification of the disease atypical pictures possible. During the animal epidemic evolution and the following years, when control actions were applied (from 1989 to 1998), all the animals presenting epidemiological interest were clinically observed, and material for histopathological studies was collected both through traditional techniques and immunohistochemistry. This way, 1152 slides of histological cuts from different organs of 112 animals positive in 635 epidemiologically interesting samples - which were sent for laboratory diagnosis - were prepared and analyzed under microscope. Afterward, comparisons with the history of these animals were carried out as well as with the facts which occurred during the pathogenic period of the disease. These analyses provided information confirming facts already mentioned in the scientific literature in addition to others which are not yet described. As a result, the occurrence of atypical rabies cases was identified such as sudden death without previous clinical symptoms suggesting the disease, hemorrhage enteritis followed by death without associated neurological manifestation and typical manifestations of other neurological diseases. The occurrence of sudden death, the hemorrhage enteritis, and the hemophagocytosis in several tissues were some of the major discoveries in this study. Atypical cases able to eliminate the virus through usual ways make a re-evaluation of the prophylaxis methods destined to communicators possible, since the animals which are victims of such manifestations are important infection sources and have not always been considered. Therefore we summarized this work as a comparative analysis between clinical evidences and the results of the histopathological investigation, thus producing information relevant to epidemiological studies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, T.C. - Hematoxylin and Eosin. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. ed. - **Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology, 53-57, 1992.
- AMATO, V.N. - Interhuman transmission of rabies. **Rev. Paul. Enferm.**, 2: 66, 1982.
- ANDERSON, L.J.; NICHOLSON, K.G.; TAUXE, R.V.; WINKLER, W.G. - Human rabies in the United States, 1960 to 1979: epidemiology, diagnosis and prevention. **Ann. Intern. Med.**, 100: 728-735, 1985.
- ANILIONIS, A.; WUNNER, W.R.; CURTIS, P. - Structure of the glycoprotein gene of rabies virus. **Nature**, 294: 275-278, 1981.
- ARAÚJO, M.F.; BRITO, T.; MACHADO, C.G. - Myocarditis in human rabies. **Rev. Inst. Med. Trop.** 13: 99-102, 1971.
- ASSIS, A.; BRANDÃO, M.M.; METZE, K. - Hemophagocytosis in lymphonodes of dogs with viral infections. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, VIII, São Lourenço, **Anais**. 1996. p.40.
- BABES, V. - **Traité de la rage**, Bailliere et Fils. Paris, 1912.
- BAER, G.M. - **The natural history of rabies**. New York, Academic Press. Inc., 1975. vs. I and II.
- BAER, G.M. - Control of rabies infection in animals and humans, In: KURSTAK, E., ed. **Control of virus diseases**. New York, Marcel Dekker, 1984. p.79-92.

- BAER, G.M.; BELLINI, W.J.; FISHBEIN, D.B. - Studies on the pathogenesis of fixed rabies virus in rats. **Bull. WHO**, **33**: 783-794, 1965.
- BAER, G.M.; BELLINI, W.J.; FISHBEIN, D.B. - Rabies virus. In: G.N. FIELDS; D.M. KNIPE et al. - **Virology**, 2. ed. New York, Raven Press. Ltd., 1990. p.883-930.
- BAER, G.M.; CLEARY, W.F. - A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. **J. Infect. Dis.**, **125**: 520-527, 1972.
- BAER, G.M.; SHADDOCK, J.H.; HOUFF, S.A.; HARRISON, A.K.; GARDNER, J.J. - Human rabies transmitted by corneal transplant. **Arch. Neurol.**, **39**: 103-107, 1982.
- BAER, G.M.; SHANTA, T.R.; BOURNE, G.H. - The pathogenesis of street rabies virus in rats. **Bull. WHO**, **38**: 119-125, 1968.
- BAROLDI, G.; OLIVEIRA, S.J.; SILVER, M.D. – Sudden and unexpected death in clinically “silent” Chagas disease. A hypothesis. **Int. J. Cardiol.**, **58**: 363-368, 1997.
- BHANDARI, M.; KUMAR, S. – Penile hyperexcitability as the presenting symptom of rabies. **Br. J. Urol.**, **58**: 224, 1986.
- BHATT, D.R.; HATTWICK, M.A. W.; GERDSON, R.; EMMONS, R.W.; JOHNSON, H.N. – Human rabies: diagnosis, complications, and management. **Am. J. Dis. Child.**, **127**: 862-869, 1974.
- BINGHAM, J.; MLAMBO, P. - Anti - mortem diagnosis of human rabies by the skin biopsy technique: three case reports from Zimbabwe. **Cent. Afr. J. Med.**, **41**: 258-260, 1995.

- BLACK, D.; WIKTOR, T.J. – Survey of racoon hunters for rabies antibody teeters: pilot study. **J. Fla. Med. Assoc.** 73: 517-520, 1986.
- BOULDGER, L.R; PORTERFIELD, J.F. - Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. **R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 52: 421-424, 1958.
- BOURGON, A. R.; CHARLTON, K.M. - The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using the peroxidase-antiperoxidase method: a comparative study. **Can. J. Vet. Res.**, 51: 117-120, 1987.
- BURNE, J.C. - Viraemia in rabies. **Lancet**, i: 95, 1980.
- CARRADA, B. - La rabia como problema de salud pública. **Bol. Med. Hosp. Inf.**, 46: 432-443, 1989.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL - Human rabies death. West Virginia. **MMWR**, 14: 195, 1965.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL - Human-to-human transmission of rabies via a corneal transplant. France, **MMWR**, 29: 25-26, 1980.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL - Human-to-human transmission of rabies virus via corneal transplant. Thailand, **MMWR**, 30: 473-474, 1981.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL – Human rabies. Pennsylvania, **MMWR**, 33: 633-635, 1984.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL - Human rabies acquired outside the United States. **MMWR**, 34: 235-236, 1985.

CENTERS OF DISEASE CONTROL - Rabies surveillance. **CDC Surveillance Summaries**, 37: 1-17, 1988.

CHADLI, A. - La rage en Tunisie. Analyse des resultats des 34 dernières années. **Arch. Inst. Pasteur Tunis.**, 63: 15-33, 1986.

CHOPRA, J.S.; BANERJEE, A.K.; MURTHY, J.M.K.; PAT, S.R. - Paralytic rabies: a clinico-pathologic study. **Brain**, 103: 789-802, 1980.

COSLETT, G.D.; HOLLOWAY, B.P.; OBJESKI, J.F. - The structural proteins of rabies virus and evidence for their synthesis from separate monocistronic RNA species. **J. Gen. Virol.**, 49: 161-180, 1980.

COSTY, F. - Rabies, a public health problem. **Arch. Belg.**, 47: 123-127, 1989.

DEAN, D.J.; EVANS, W.M.; MCCLURE, R.C. - Pathogenesis of rabies. **Bull. WHO**, 29: 803-811, 1963.

DEBBIE, J.G.; TRIMARCHI, C.V. - Pantropism of rabies virus in free-ranging rabid red fox (*Vulpes fulva*). **J. Wildl. Dis.**, 6: 500-505, 1970.

DELPIETRO, H.; SEGRE, L.; MARCHEVSKY, N.; BERISSO, M. - Rabies transmission to rodents after ingestion of naturally infected tissues. **Sevicio Nacional de Sanidad Animal**, 50: 356-360, 1990.

DIERKS, R.E.; MURPHY, F.A.; HARRISSON, A.K. - Extraneural rabies virus infection. Virus development in fox salivary gland.. **Am. J. Pathol.**, 54: 251-273, 1969.

- DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHET, E.; ZHEN, F. F.; KOPROWSKY, H. - Rhabdoviruses.
In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. - **Fields Virology**. 3.ed. Lippincott
Raven Publishers, Philadelphia, 1996. p.87-95.
- DUPONT, J.R.; EARLE, K.H. - Human rabies encephalitis: a study of forty-nine fatal cases with
a review of the literature. **Neurology**, **15**: 1023-1034, 1966.
- DUTTA, J.K. - Incubation period of rabies: how long could it be?. **J. Assoc. Physicians
India**, **40**: 771-772, 1992.
- EAKLE, J.F.; BRESSOUD, P.F. – Hemophagocytic syndrome following an Epstein-Barr virus
infection: a case report and literature review. **J. Ky. Med. Assoc.**, **98(4)**: 161-165, 2000.
- EMERSON, S.U. - Rhabdoviruses, In: FIELDS, B.N. - **Virology**, New York, Raven Press, 1985.
- ENRIGHT, J.B. - The effects of corticosteroids on rabies in mice. **Can. J.
Microbiol.**, **16**: 667-675, 1974.
- ESPOSITO, J.J.; KNIGHT, J.C.; SHADDOCK, J.H.; NOVEMBRE, F.J.; BAER, G.M. -
Successful oral rabies vaccination of racoons with racoon-poxvirus recombinants
expressing rabies virus glycoprotein. **Virology**, **165**: 313-316, 1988.
- FAMILUSI, J.B.; MOORE, D.L. - Isolation of a rabies related virus from the cerebrospinal
fluid. **Afr. J. Med. Sc.**, **3**: 93-96, 1972.
- FEIDEN, W.; FEIDEN, U.; GERHARD, L.; REINHARDT, V.; WANDELER, A. -
Rabies encephalitis: immunohistochemical investigations. **Clin.
Neuropathol.**, **4**: 156-164, 1985.

- FEIDEN, W.; KAISER, E.; GERHARD, L.; DAHME, E.; GYLSTORFF, B.;
EHRENSBERGER, F. - Immunohistochemical staining of rabies virus antigen with
monoclonal and polyclonal antibodies in paraffin tissue sections. **Zentralbl.
Veterinarmed. B.**, **35**: 247-255, 1988.
- FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; BAER, G.M. - Excretion of rabies virus in the saliva of dogs.
J. Infect. Dis., **145**: 715-719, 1982.
- FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H. - Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two
strains of rabies virus. **Am. J. Vet. Res.**, **45**: 724-729, 1984.
- FERREIRA, A.A.; ROMANO, A.P.M.; LICHTCAJER, H.; ANACLETO, J.B. - Relato de caso
de raiva canina a partir de vírus oriundo de morcego hematófago *Desmodus rotundus*
In: SEMINÁRIO NACIONAL DE ZOONOSES E ANIMAIS PEÇONHENTOS, III,
Guarapari, **Anais**. 1998. p.73.
- FLAMAND, A.; DELAGNEAU, J.F.; BUSSEREAU, F. - An RNA polymerase activity in the
detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins. **J. Gen.
Virol.**, **40**: 233-238, 1978.
- FOGGIN, C.M. - Atypical rabies virus in cats and a dog in Zimbabwe. **Vet. Rec.**, **8**: 110-118, 1982.
- FU, Z.F.; WEIHE, E.; ZHENG, Y.M. - Differential effects of rabies and Borna disease
viruses on immediate-early and late-response gene expression in brain tissues. **J. Gen.
Virol.**, **67**: 6674-6681, 1993.
- GODE, G.R.; RAJU, A.V.; JAYALAKSHMI, T.S.; KAUL, H.L.; BHIDE, N.K. - Intensive care
in rabies therapy: clinical observations. **Lancet**, **II**: 6-8, 1976.

- GRATTAN - SMITH, P.J.; O'REGAN, W.J.; ELLIS, P.S.; O'FLAHERTY, S.J.; McINTYRE, P.B.; BARNES, C.J. - Rabies. A second Australian case, with a long incubation period. **Med. J. Aust.**, 156: 65164-5, 1992.
- GROLEAU, G. - Rabies: Emergency Medical Clinical North America, **Depart. Med., University of Maryland Medical System Hospital**, 10: 361-368, 1992.
- HATTWICK, M.A. - Reactions to rabies. **N. England J. Med.**, 287: 1204, 1972.
- HELD, J.R.; TIERKEL, E.S.; STEELE, J.H. - Rabies in man and animals in the United States, 1946-1965, **Public Health Rep.**, 82: 1009-1018, 1967.
- HELMICK, C.G.; TAUXE, R.V.; VERNON A.A. - Is there a risk to contacts of patients with rabies?. **Rev. Infect. Dis.**, 9: 511-518, 1987.
- HEMACHUDHA, T.; PHANTHUMCHINDA, K.; PHANUPHAK, P.; MANHUTSATHIT, S. - Myoedema as a clinical sign in paralytic rabies. **Lancet**, I: 1210, 1987.
- HEUSCHELE, W.P. - Rabies and other viral diseases. **Vet. Clin. Noth. Am. Food Anim. Pract.**, 3: 45-59, 1987.
- HOFF, G.L.; MELLON, G.F.; THOMAS, M.C.; GIEDINGHAGEN, D.H. - Bats, cats, and rabies in an urban community. **South. Med. J.**, 86: 115-118, 1993.
- IWASAKI, Y.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. - Early events of rabies virus replication in tissue culture. **Lab. Invest.**, 28: 142-148, 1973.
- JAMES, T.N.; IMAMURA, K. - Virus-like particles associated with intracardiac ganglionitis in 2 cases of sudden unexpected death. **Jpn. Heart J.**, 22: 447-454, 1981.

- JAYAKUMAR, R.; RADAMASS, P.; RAGHAVA, R. - Comparison of enzyme immunodiagnosis with immunofluorescence for rapid diagnosis of rabies in dogs. **Int. J. Med. Microbiol.**, 271: 501-503, 1989.
- KAPLAN, C.; TURNER, G.S.; WARRELL, D.A. - **Rabies: the facts**. 2.ed. London Oxford, University Press, 1985.
- KAPLAN, M.M., GOOR, Y., TIERKEL, E.S. - A field demonstration of rabies control using chicken-embryo vaccine in dogs. **Bull WHO**, 10: 765-775, 1954.
- KEMP, G.E.; LEE, V.H.; MOORE, D.L.; SHOPE, R.E.; CAUSEY, O.R.; MURPHY, F.A. - Kotonkan, a new rhabdovirus related to Mokola of the rabies sorogroup. **Am. J. Epidemiol.**, 98: 43-49, 1973.
- KOMSUOGLU, S.S.; DORA, F.; KALABAY, O. - Periodic EEG activity in human rabies Encephalitis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychol.**, 44: 264-265, 1981.
- KOPROWSKI, H. - Viruses. **Trans. N.Y. Acad. Sci.**, 176-190, 1959.
- KOPROWSKI, H. - La rage et la vaccination rabique de Pasteur a nos jours. **Bul. Inst. Pasteur.**, 83: 301-308, 1985.
- LAFON, M.; PERRIN, P.; VERSMISSE, P.; SUREAU, P. - Use of a monoclonal antibody for quantitation of rabies vaccine glycoprotein by enzyme immunoassay. **J. Biol. Stand.**, 13: 295-301, 1985.

LAFRENZ, M.; LOPELMANN, H; DEDEK, J.; WITT, W. - Zum Zusammenwirken von Human und Veterinarmedizin bei Bekämpfung und Prophylaxe der Tollwut; Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten; Wilhelm-Pieck-Universität Rostock; **Z-Arztl-Fortbild-Jena**, **84**: 396-399, 1990.

LANSKA, D.J. - Rabies virus, paralytic and classical. **Lancet**, **8790**: 408-411, 1992.

LENTZ, T.L.; BURRAGE, T.G.; SMITH, A.L.; CRICK, J.; TIGNOR, G.H. - Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?. **Science**, **215**: 182-184, 1982.

LENTZ, T.L.; WILSON, P.T.; HAWROT, E.; SPEICHER, D.W. - Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. **Science**, **226**: 848-849, 1984.

LOVE, S.V. – Paralytic rabies: review of the literature and report of a case. **J. Pediatr.**, **24**: 312-325, 1944.

MACEK, C. - Monoclonal antibodies: key to a revolution in clinical medicine. **J.A.M.A.**, **247**: 2463-2470, 1982.

MARTEL, M.A.; MONTES, F.C.; ALCOCER, B.R. - Transplacental transmission of bovine rabies after natural infection. **J. Infect. Dis.**, **29**: 123-133, 1973.

MCKENDRICK, A.G. – A ninth analytical review of reports from Pasteur Institutes, **Bull WHO** **1940-1941**, **9**: 31-78, 1941.

- MEBATSION, T.; SILLERO-ZUBIRI, C.; GOTTELLI, D.; COX, J.H. - Detection of rabies antibody by ELISA and RFFIT in unvaccinated dogs and in the endangered Simian jackal (*Canis simensis*) of Ethiopia. **National Research Institute of Health; Zentralbl. Veterinarmed. B.**, 39: 233-235, 1992.
- MEREDITH, C.D.; ROSSOUW, A.P.; VAN PRAG KOCH, H. - An unusual case of human rabies thought to be of Chiropteran origin. **S. Afr. Med. J.**, 45: 767-769, 1971.
- METZE, K.; FEIDEN, W. - Rabies virus ribonucleoprotein in the heart. **New Eng. J. Med.** 324: 1814-1815, 1991.
- MIYAMOTO, K.; MATSUMOTO, S. - The nature of the Negri body. **J. Cell. Biol.**, 27: 677-682, 1965.
- MUGRAGE, E.R. - Milkborn rabies. **Lab. Clin. Med.**, 15: 460, 1930.
- MURPHY, F.A. - Rabies pathogenesis: brief review., **Arch. Virol**, 54: 279-297, 1997.
- MURPHY, F.A.; BAUER, S.P.; HARRISON, A.K. ; WINN, W.C. - Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. **Lab. Invest.**, 28: 361-376, 1973.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, G.P.; MARTELLI, M.A.; SUMMERS, M.D. - **Virus Taxonomy**. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer - Verlag Wien. New York, 1985.

- MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; WINN, W.C.; BAUER, S.P. - Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Infection of the CNS and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. **Lab. Invest.**, **29**: 1-16, 1973.
- NEGRI, A. - Beitrag zum Studium der Aetiologie der Tollwuth. **Z. Hyg. Infektionskr.**, **43**: 507-528, 1903.
- NEHAUL, B.B.G. - Rabies transmitted by bats in British Guyana. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **4**: 550-561, 1955.
- NIETFELD, J.C.; RADICH, P.M.; TYLER, D.E.; BAUER, R.W. - Rabies-like inclusions in dogs; Diagnostic assistance laboratory college of Veterinary Medicine. **J. Vet. Diagn. Invest.** **1**: 338-339, 1989.
- NIEUWENHUIJS, J.; HAAGSMA, J.; LINA, P. - Epidemiology and control of rabies in bats in The Netherlands; Ministry of Welfare, Public Health and Cultural Affairs. Rijswijk. **Veter. Sci. Tech.**, **11**: 1155-1161, 1992.
- NILSSON, M.R.; SUGAY, W. - O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. **Arq. Inst. Biol. S. Paulo**, **33**: 47-48, 1966.
- O'DAY, D.M. - Diseases potentially transmitted through corneal transplantation. **Ophthalmology**, **96**: 1133-1137, 1989.
- OLIVEIRA, R.P.; ITO, F.H.; CORTES, J.A.; VASCONCELOS, S.A.; SOUZA, M.C.A.M. - Caracterização de amostras do vírus rábico isoladas de animais domésticos oriundos de áreas endêmicas do Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, **32**: 89-95, 1995.

OPESKIN, K.; THOMAS, A.; BERKOVIC, S.F. – Does cardiac conduction pathology contribute to sudden unexpected death in epilepsy ?. *Epilepsy Res.*, **40**: 17-24, 2000.

OXFORD, J. - The use of monoclonal antibodies in virology. *J. Hyg. Lond.*, **88**: 361-368, 1982.

PALMER, D.G.; OSSENT, P.; SUTER, M.M.; FERRARI, E. - Demonstration of rabies viral antigen in paraffin tissue sections: comparison of the immunofluorescence technique with the unlabeled antibody enzyme method. *Am. J. Vet. Res.*, **46**: 283-286, 1985.

PANACHÃO, M.R.I.; HARMANI, N.M.S.; SODRÉ, M., TAKAOKA, N.Y.; KOTAIT, I. - Proposta de ações a serem desencadeadas para cobertura de foco de raiva em quirópteros em centros urbanos, In: SEMINÁRIO NACIONAL DE ZONÓSES E ANIMAIS PEÇONHENTOS, III, Guarapari, *Anais*. 1998. p.88.

PARA, M. - An outbreak of post-vaccinal rabies trade de laboratorial in Fortaleza, Brazil. *Bull Who*, **33**: 177-182, 1969.

PASSOS, E.C.; CARRIERI, M.L.; SILVA, M.M.S.; GONÇALVES, M.A.; LOPES, R.; FERREIRA, E.; GOLZENLEUCHTER, A.; ALVES, L.M.; ACHKAR, S.; SOUZA, R.G.S.; PRADO, A.M.; FAVORETTO, S.R.; SANTOS, D.L.P. - Raiva em morcegos no estado de São Paulo, In: SEMINÁRIO NACIONAL DE ZONÓSES E ANIMAIS PEÇONHENTOS, III, Guarapari, *Anais*. 1998. p.70.

PASTEUR, L.; CHAMBERLAND, R. - Sur la rage. *C.R. Soc. Sci.*, **92**: 1259, 1881.

PASTORET, P.P. - Anticorps monoclonaux et perspectives d'application en médecine Veterinaire. *Ann. Rech. Vet.*, **13**: 21-31, 1982.

- PAWAN, J.L. - Paralysis as a clinical manifestation in human rabies. **Ann. Trop. Med. Parasitolog.**, **33**: 21-32, 1939.
- PERL, D.P. - The pathology of rabies in the CNS; In: BAER, G.N. ed.- **The natural history of rabies**. **133**: 403-422, Academic Press, 1975.
- PERRIN, P.; PROTNOI, D.; SUREAU, P. - Étude de l'adsorption et de la penetration du virus rabique: interactions avec les cellules BHK 21 et des membranes artificielles. **Ann. Virol., Inst. Pasteur**, **133**: 403-422, 1982.
- PERRY, B.D. - Rabies. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, **17**: 73-89, 1987.
- PHUAPRADIT, P.; MANATSATHIT, S.; WARRELL, M.J.; WARRELL, D.A. - Paralytic rabies: some unusual clinical presentations. **J. Med. Assoc. Thai.**, **68**: 105-110, 1985.
- REAGAN, K. J.; WUNNER, W. H. - Rabies virus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor. **Arch. Virol**, **84**: 277-282, 1985.
- REMINGTON, P.L.; SHOPE, T.; ANDREWS, J. - A recommended approach to the evaluation of human rabies exposure in an acute care hospital. **JAMA**, **254**: 67-69, 1985.
- SAXENA, S.N.; MADHUSUDANA, S.N.; TRIPATHI, K.K.; GUPTA, P.; AHUJA, S. - Evaluation of the new rapid rabies immunodiagnosis technique. **Indian J. Med. Res.**, **89**:445-448, 1989.
- SCHMIDT, J.R.; WILLIAMS, M.C.; LULE, M.; MIVULE, A.; MUJOMBA, E. - Viruses isolated from mosquitoes collected in the southern Sudan and western Ethiopia. **E. Afr. Virus Res. Inst. Rep**, **15**: 24-25, 1965.

- SCHNEIDER, L.G. - Antigenic variants of rabies virus. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, 5: 101, 1982.
- SCHNEIDER, L.G.; DIETZSCHOLD, B.; DIERKS, R.E.; MATTHAEUS, W. ; ENZMANN, P.J.; STROHMAIER, K. - Rabies group-specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses. **J. Virol.**, 11: 748-755, 1973.
- SCHNEIDER, L.G.; DIRINGER, H. - Structure and molecular biology of rabies virus. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** , 75: 152-180, 1976.
- SCHNEIDER, M.C.; BURGOA, C.S. - Tratamiento contra la rabia humana: um pouco de su história. **Revista de Saúde Pública da Fundação Nacional de Saúde**, 28: 454-463, 1994.
- SELLERS, T.F. - Rabies. In: - HARRISSON, T.R., ed. **Principles of internal medicine**, McGraw-Hill, New York, 1106-1109, 1954.
- SELLERS, T.F. - Rabies. In: - HARRISSON, T.R., ed. **Principles of internal medicine**, McGraw-Hill, New York, 547-549, 1955.
- SHANKAR, V.; DIETZSHOLD, B.; KOPROWSKI, H. - Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication., **J. Virol.**, 65: 2736-2738, 1991.
- SHERIKAR, A.A. - Asymptotic canine rabies and public health. **Indian J. Public Health**, 35: 80-82, 1991.
- SHERMAN, D.M. - Localised diseases of the bovine brain and spinal cord. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, 3: 179-191, 1987.

- SIKES, R.K. - Pathogenesis of rabies in wildlife: comparative effect of varying doses of rabies virus inoculated in to foxes and skunks. **Am. J. Vet. Res.**, **23**: 1041-1047, 1962.
- SILVA, A.G. - Raiva no Brasil. Subsídio para o seu conhecimento. **SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE RAIVA, II. Anais.** Rio de Janeiro, 1965. p.109-130.
- SILVA, R.A., SILVA, N.M. - Infecção rábica em cão com presença de vírus nas glândulas salivares e avirulência do encéfalo. **Pesq. Agropec. Bras.**, **8**: 89-90, 1973.
- SILVA, R.A.; SILVA, N.M.; GUIMARÃES, R.S. - A utilização do método de imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímicos e biológicos no diagnóstico da raiva. **Pesq. Agrop. Bras.**, **8**: 1-4, 1973.
- SILVA, R.A.; SOUZA, A.M. - Ocorrência do vírus da raiva em diferentes tecidos de cão na doença natural. **Pesq. Agrop. Brasil.**, **3**: 317-318, 1968.
- SIPAHIÖGLU, U.; ALPAUT, S. - Transplacental rabies in humans, **Mikrobiyol. Bul.**, **19**: 95-99, 1985.
- SMITH, J.S. - Monoclonal antibody studies of rabies in insectivorous bats of the United States. **Vet. Infect. Dis.**, **4**: 637-643, 1988.
- SMITH, W.B.; BLENDEN, D.C.; FUH, T.H.; HILER, L.- Diagnosis of rabies by immunofluorescent staining of frozen section of skin. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **161**: 1495-1501, 1972.
- SMITHCORN, J.F. - The history of some current problems in animals disease. **Rabies Pt. Vet. Med.**, **53**: 267-273, 1958.

- SOKOL, F. - Chemical composition and structure of rabies virus. In: BAER, G.M., ed., **The natural history of rabies**. Orlando, Academic Press, 1975. p.79-102.
- SOTTO, A.; BESSIS, D.; PORNEUF, M.; TAIB, J.; CIURANA, A. J.; JOURDAN, J. – Syndrome of hemophagocytosis associated with infections. **Pathol. Biol.**,42: 861-867,1994.
- STEELE, J.H. - History of rabies. In: Baer, G.M., ed. - **The natural history of rabies**. Orlando, Academic Press, 1975. p.1-29.
- STEHR-GREEN, J.K.; SCHANTZ, P.M. - The impact of zoonotic diseases transmitted by pets on human health and the economy. **Vet. Clin. North Am. Small Pract.**,17: 1-15, 1987.
- SUMNER, J.; ESPOSITO, J.; BELLINI, W.J. - Expression of rabies virus nucleoprotein gene by recombinant pox viruses, In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 9. **Abstracts**. Orlando, 1988. p.33.
- TABEL, A.; CORNER, A.H.,WEBSTER, W.A.; CASEY A. - History and epizootiology of rabies in Canada. **Can. Vet. Journal**, 15: 271-281, 1974.
- TAKAOKA, N.Y. - Raiva humana no estado de São Paulo no período de 1903 a 1997(95 anos). In: SEMINÁRIO NACIONAL DE ZOONOSES E ANIMAIS PEÇONHENTOS, III, **Anais**. Guarapari, 1998. p.66.
- TANGCHAI, P.; YENBUTR, D.; VEIJAIJVA, A. - Central nervous system changes in human rabies: a study of twenty-four cases. **J. Med. Assoc. Thai.**, 53: 472, 1970.
- TIERKEL, E.S. - Control of urban rabies, In: BAER, G. M. ed., **The natural history of rabies**. Academic Press, 189-201, 1975.

- TSIANG, H. - Evidence for an intra axonal transport of fixed and street rabies virus. **J. Neurophal. Esp. Neurol.**, **38**: 286-292, 1978.
- TURNER, G.S. - Current concepts of immunology and pathogenesis of rabies.
In: PATTISON, JR. ed- **Rabies: a growing threat**. New York, Van Nostrand Reinhold, 1983. p.27-32.
- VERMA, K.; MAHESHWARI, M.C.; CHAUDHARY, C.; TICKOO, S. - Acute ascending motor paralysis due to rabies: a clinicopathological report. **Eur. Neurol.**, **24**: 160-62, 1985.
- WANDELER, A.; CAPT, S.; KEPPELER, A.; HAUSER, R. - Oral immunisation of wildlife against rabies; concept and first field experiments. **Rev. Infect. Dis.**, **10**: 649-653, 1988.
- WANG, S.P. - Statistical studies of human rabies in Taiwan. **J. Formosan Med. Assoc.**, **55**: 548-554, 1956.
- WARRELL, D.A.; DAVIDSON, A.; POPE, R.A. - The clinical picture of rabies in man. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **70**: 188-195, 1976.
- WARRELL, D.A.; WARRELL, M.J. - Human rabies and its prevention: an overview. **Rev. Infect. Dis.**, **10**: 726-731, 1988.
- WIKTOR, T.J.; MACFARLAN, R.I.; REAGAN, K.J.; DIETZSCHOLD, B.; CURTIS, P.J.; WUNNER, W.H.; KIENY, M.P.; LATHE, R.; LECOCQ, J.P.; MACKETT, M.; MOSS, B.; KOPROWSKI, H. - Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoproteins gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **81**: 7194-7198, 1984.
- WILDE, H.; CHUTTVONGSE, S. - Rabies: current management in Southeast Asia. **Med. Prog.**, 14-24, 1988.

WINKLER, W.G.; BAKER, E.F; HOPKINS, C.C. - An outbreak of non-bite transmitted rabies in a laboratory animal colony. **Am. J. Epidemiol.**, 95: 267-277, 1972.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Sixth report of the expert committee on rabies. Geneva, WHO, 1973. 105p. (Technical Report Series, 523).

WORLD HEALTH ORGANIZATION - World survey of rabies XXII (for years 1984/1985), Geneva, WHO, 1987. 33p.

WUNNER, W.H.; LARSON J.K.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C.L. - The molecular biology of rabies viruses. **Rev. Infect Dis.**, 10: 771-784, 1988.

ZIMMER, K.; WIEGAND, D.; MANZ, D.; FROST, J.W.; REINHACHER, M.; FRESE, K. - Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies; Institut für Veterinar Pathologie der Justus Liebig. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**,37: 392-400, 1990.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, T.C. - Hematoxylin and Eosin. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. ed. - **Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology, 53-57, 1992.
- AMATO, V.N. - Interhuman transmission of rabies. **Rev. Paul. Enferm.**, 2: 66, 1982.
- ANDERSON, L.J.; NICHOLSON, K.G.; TAUXE, R.V.; WINKLER, W.G. - Human rabies in the United States, 1960 to 1979: epidemiology, diagnosis and prevention. **Ann. Intern. Med.**, 100: 728-735, 1985.
- ANILIONIS, A.; WUNNER, W.R.; CURTIS, P. - Structure of the glycoprotein gene of rabies virus. **Nature**, 294: 275-278, 1981.
- ARAÚJO, M.F.; BRITO, T.; MACHADO, C.G. - Myocarditis in human rabies. **Rev. Inst. Med. Trop.** 13: 99-102, 1971.
- ASSIS, A.; BRANDÃO, M.M.; METZE, K. - Hemophagocytosis in lymphonodes of dogs with viral infections. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, VIII, São Lourenço, **Anais**. 1996. p.40.
- BABES, V. - **Traité de la rage**, Bailliere et Fils. Paris, 1912.
- BAER, G.M.; BELLINI, W.J.; FISHBEIN, D.B. - Studies on the pathogenesis of fixed rabies virus in rats. **Bull. WHO**, 33: 783-794, 1965.

- BAER, G.M.; SHANTA, T.R.; BOURNE, G.H. - The pathogenesis of street rabies virus in rats. **Bull. WHO**, **38**: 119-125, 1968.
- BAER, G.M.; CLEARY, W.F. - A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. **J. Infect. Dis.**, **125**: 520-527, 1972.
- BAER, G.M. - **The natural history of rabies**. New York, Academic Press. Inc., 1975. vs. I and II.
- BAER, G.M.; SHADDOCK, J.H.; HOUFF, S.A.; HARRISON, A.K.; GARDNER, J.J. - Human rabies transmitted by corneal transplant. **Arch. Neurol.**, **39**: 103-107, 1982.
- BAER, G.M. - Control of rabies infection in animals and humans, In: KURSTAK, E., ed. **Control of virus diseases**. New York, Marcel Dekker, 1984. p.79-92.
- BAER, G.M.; BELLINI, W.J.; FISHBEIN, D.B. - Rabies virus. In: G.N. FIELDS; D.M. KNIPE et al. - **Virology**, 2. ed. New York, Raven Press. Ltd., 1990. p.883-930.
- BAROLDI, G.; OLIVEIRA, S.J.; SILVER, M.D. - Sudden and unexpected death in clinically "silent" Chagas disease. A hypothesis. **Int. J. Cardiol.**, **58**: 363-368, 1997.
- BHANDARI, M.; KUMAR, S. - Penile hyperexcitability as the presenting symptom of rabies. **Br. J. Urol.**, **58**: 224, 1986.
- BHATT, D.R.; HATTWICK, M.A.W.; GERDSON, R.; EMMONS, R.W.; JOHNSON, H.N. - Human rabies: diagnosis, complications, and management. **Am. J. Dis. Child.**, **127**: 862-869, 1974.
- BINGHAM, J.; MLAMBO, P. - Anti - mortem diagnosis of human rabies by the skin biopsy technique: three case reports from Zimbabwe. **Cent. Afr. J. Med.**, **41**: 258-260, 1995.

- MEBATSION, T.; SILLERO-ZUBIRI, C.; GOTTELLI, D.; COX, J.H. - Detection of rabies antibody by ELISA and RFFIT in unvaccinated dogs and in the endangered Simian jackal (*Canis simensis*) of Ethiopia. **National Research Institute of Health; Zentralbl. Veterinarmed. B.**, 39: 233-235, 1992.
- MEREDITH, C.D.; ROSSOUW, A.P.; VAN PRAG KOCH, H. - An unusual case of human rabies thought to be of Chiropteran origin. **S. Afr. Med. J.**, 45: 767-769, 1971.
- METZE, K.; FEIDEN, W. - Rabies virus ribonucleoprotein in the heart. **New Eng. J. Med.** 324: 1814-1815, 1991.
- MIYAMOTO, K.; MATSUMOTO, S. - The nature of the Negri body. **J. Cell. Biol.**, 27: 677-682, 1965.
- MUGRAGE, E.R. - Milkborn rabies. **Lab. Clin. Med.**, 15: 460, 1930.
- MURPHY, F.A.; BAUER, S.P.; HARRISON, A.K. ; WINN, W.C. - Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. **Lab. Invest.**, 28: 361-376, 1973.
- MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; WINN, W.C.; BAUER, S.P. - Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Infection of the CNS and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. **Lab. Invest.**, 29: 1-16, 1973.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, G.P.; MARTELLI, M.A.; SUMMERS, M.D. - **Virus Taxonomy**. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer - Verlag Wien. New York, 1985.

- MURPHY, F.A. – Rabies pathogenesis: brief review., **Arch. Virol**, **54**: 279-297,1997.
- NEGRI, A. - Beitrag zum Studium der Aetiologie der Tollwuth. **Z. Hyg. Infektionskr**, **43**: 507-528, 1903.
- NEHAUL, B.B.G. – Rabies transmitted by bats in British Guyana. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **4**: 550-561, 1955.
- NIETFELD, J.C.; RADICH, P.M.; TYLER, D.E.; BAUER, R.W. - Rabies-like inclusions in dogs; Diagnostic assistance laboratory college of Veterinary Medicine. **J. Vet. Diagn. Invest.** **1**: 338-339, 1989.
- NIEUWENHUIJS, J.; HAAGSMA, J.; LINA, P. - Epidemiology and control of rabies in bats in The Netherlands; Ministry of Welfare, Public Health and Cultural Affairs. Rijswijk. **Veter. Sci. Tech.**, **11**: 1155-1161, 1992.
- NILSSON, M.R.; SUGAY, W. - O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. **Arq. Inst. Biol. S. Paulo**, **33**: 47-48, 1966.
- O'DAY, D.M. - Diseases potentially transmitted through corneal transplantation. **Ophthalmology**, **96**: 1133-1137, 1989.
- OLIVEIRA, R.P.; ITO, F.H.; CORTES, J.A.; VASCONCELOS, S.A.; SOUZA, M.C.A.M. - Caracterização de amostras do vírus rábico isoladas de animais domésticos oriundos de áreas endêmicas do Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, **32**: 89-95, 1995.

- SCHNEIDER, L.G.; DIETZSCHOLD, B.; DIERKS, R.E.; MATTHAEUS, W. ;
ENZMANN, P.J.; STROHMAIER, K. - Rabies group-specific ribonucleoprotein
antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses. **J.
Virol.**, **11**: 748-755, 1973.
- SCHNEIDER, L.G.; DIRINGER, H. - Structure and molecular biology of rabies virus. **Curr.
Top. Microbiol. Immunol.** , **75**: 152-180, 1976.
- SCHNEIDER, L.G. - Antigenic variants of rabies virus. **Comp. Immunol. Microbiol.
Infect. Dis.**, **5**: 101, 1982.
- SCHNEIDER, M.C.; BURGOA, C.S. - Tratamiento contra la rabia humana: um poco
de su história. **Revista de Saúde Pública da Fundação Nacional de
Saúde**, **28**: 454-463, 1994.
- SELLERS, T.F. - Rabies. In: - HARRISSON, T.R., ed. **Principles of internal medicine**,
McGraw-Hill, New York, 1106-1109, 1954.
- SELLERS, T.F. - Rabies. In: - HARRISSON, T.R., ed. **Principles of internal medicine**,
McGraw-Hill, New York, 547-549, 1955.
- SHANKAR, V.; DIETZSHOLD, B.; KOPROWSKI, H. - Direct entry of rabies virus into the
central nervous system without prior local replication., **J. Virol.**, **65**: 2736-2738, 1991.
- SHERIKAR, A.A. - Asymptotic canine rabies and public health. **Indian J. Public
Health**, **35**: 80-82, 1991.
- SHERMAN, D.M. - Localised diseases of the bovine brain and spinal cord. **Vet. Clin. North
Am. Food Anim. Pract.**, **3**: 179-191, 1987.

- SIKES, R.K. - Pathogenesis of rabies in wildlife: comparative effect of varying doses of rabies virus inoculated in to foxes and skunks. **Am. J. Vet. Res.**, **23**: 1041-1047, 1962.
- SILVA, A.G. - Raiva no Brasil. Subsídio para o seu conhecimento. **SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE RAIVA, II. Anais.** Rio de Janeiro, 1965. p.109-130.
- SILVA, R.A.; SOUZA, A.M. - Ocorrência do vírus da raiva em diferentes tecidos de cão na doença natural. **Pesq. Agrop. Brasil**, **3**: 317-318, 1968.
- SILVA, R.A., SILVA, N.M. - Infecção rábica em cão com presença de vírus nas glândulas salivares e avirulência do encéfalo. **Pesq. Agropec. Bras.**, **8**: 89-90, 1973.
- SILVA, R.A.; SILVA, N.M.; GUIMARÃES, R.S. - A utilização do método de imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímicos e biológicos no diagnóstico da raiva. **Pesq. Agrop. Bras.**, **8**: 1-4, 1973.
- SIPAHIÖGLU, U.; ALPAUT, S. - Transplacental rabies in humans, **Mikrobiyol. Bul.**, **19**: 95-99, 1985.
- SMITH, J.S. - Monoclonal antibody studies of rabies in insectivorous bats of the United States. **Vet. Infect. Dis.**, **4**: 637-643, 1988.
- SMITH, W.B.; BLENDEN, D.C.; FUH, T.H.; HILER, L.- Diagnosis of rabies by immunofluorescent staining of frozen section of skin. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **161**: 1495-1501, 1972.
- SMITHCORN, J.F. - The history of some current problems in animals disease. **Rabies Pt. Vet. Med.**, **53**: 267-273, 1958.