

KEILA CRISTINA DE LIMA

Avaliação da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) no estudo da distribuição do Vírus Rábico em camundongos (*Mus musculus*) inoculados experimentalmente

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária, Área de Vigilância Sanitária.

Botucatu

2003

KEILA CRISTINA DE LIMA

Avaliação da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) no estudo da distribuição do Vírus Rábico em camundongos (*Mus musculus*) inoculados experimentalmente

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária, Área de Vigilância Sanitária.

Orientador: Prof. Dra. Jane Megid

Orientada: Keila Cristina de Lima

Botucatu

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Lima, Keila Cristina de.

Avaliação da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) no estudo da distribuição do Vírus Rábico em camundongos (*Mus musculus*) inoculados experimentalmente / Keila Cristina de Lima. - 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Jane Megid

Assunto CAPES: 50502034

1. Raiva - Diagnóstico - Estudos experimentais

CDD 616.953

Palavras-chave: Imunofluorescência direta (IFD); PCR; Raiva; Patogenia

**À minha mãe Amélia e ao meu pai Milton,
pelo imenso amor e por tanta dedicação.**

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, pela vida e pelos momentos de serenidade

Aos meus pais por todo apoio, amor e carinho durante esta jornada

À minha querida irmã Christiane pelo incentivo e pelas palavras amigas

Ao meu querido Nilson, companheiro carinhoso, por todos os momentos juntos e a sua família que me acolheu

Ao meu amigo Luciano Santos, irmão de coração, pela força e amizade

Às amigas do Laboratório de Imunologia Satie Katagiri e Cristiane Nozaki pelo companheirismo

Aos amigos da residência Bianca, Lucinéia, Liliane, Cristina Brito e Otávio pelos momentos de aprendizado e à amiga Carla Moraes pela nossa sociedade de bombons

Aos amigos da República dos Belos, Jaime, Daniel e Wellington grandes companheiros, e aos residentes da M.I., Leandro, Taís e Tati, pela amizade

Às amigas de São Paulo, Andréa, Renata, Ana Claudia e Maria Cristina pela amizade de sempre

À minha amiga Dona Maria e seus filhinhos Cléber, Patrícia, Patrick e Fio pela amizade de todos os dias

Aos companheiros da pós-graduação Júnior, Sandia, Fábio, André, Wildo, Acácia, Cassiano, Ana, Caio e Camilo e aos residentes da Zoonoses Vanessa, Júlia, Érica, André e Rodrigo

À minha orientadora Prof. Dra. Jane Megid pelo desenvolvimento deste trabalho

Ao prof. Helio Langoni, pela co-orientação e incentivo, e por ter cedido o laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Zoonoses

Aos professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Antonio Carlos Paes, Marcio Garcia Ribeiro, Luis Carlos de Souza, Paulo Domingues e José Paes que acompanham nosso desenvolvimento desde a graduação

Às professoras Noeme Rocha e Tereza Cristina pelo carinho

Ao professor João Pessoa Araújo pelo auxílio nas dúvidas

Aos doutorandos Adriana Cortez do Laboratório de Imunologia da USP e Aristeu Vieira do Departamento de Higiene Veterinária de Botucatu, pelos ensinamentos e auxílios neste trabalho e às doutorandas Valéria Lara, Cristina e Anne pelas palavras de incentivo

Aos funcionários Wanderley, Sérgio, Dona Zeza, Adriana, Tânia, Seu Humberto, Rodrigo, Fernando Listoni, Nelson Fava e Nelson Spago pelo apoio

Ao funcionário do Laboratório de Histopatologia de Faculdade de Medicina da UNESP, Claudiney pela confecção das lâminas de histopatologia

Aos funcionários do Biotério Central da Unesp, Vera e Paulo, sempre à disposição para nos atender

Às bibliotecárias Meire e Elza pelo auxílio nas referências

Às funcionárias da pós-graduação Denise, Carmem e Maria pela ajuda

Aos meus companheirinhos de pêlos por tantos olhares de carinho: Sandy, Tripa, Willy e Mona

À FAPESP pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho

A FUNDUNESP pelo auxílio pesquisa contribuindo para realização deste trabalho,

A todas as pessoas que estiveram ao meu lado nestes anos de luta.

"Há dois homens em cada um de nós: o sábio, aquele que pela observação, pela experimentação e pelo raciocínio quer se elevar ao conhecimento da Natureza e ao seu lado, o homem sensível, de tradição, de fé ou de dúvida; o homem de sentimento, o homem que chora seus filhos que já não vivem, que não pode provar que tornará a vê-los, mas que crê e o espera, que diz a si mesmo que a força que existe nele se transformará. Os dois domínios são distintos, e, infeliz daquele que quer transbordar um sobre o outro no estado tão imperfeito dos conhecimentos humanos".

Louis Pasteur

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	14
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Material	29
3.1.1. Animais	29
3.1.2. Vírus	29
3.1.2.1. Vírus rábico de rua	29
3.1.2.2. Vírus rábico fixo	29
3.1.3. Suspensão de cérebro normal (SCN)	30
3.1.4. Diluente viral	30
3.1.5. Conjugado anti-rábico	30
3.1.6. Enzimas	31
3.1.7. Oligonucleotídeos Iniciadores (PRIMERS)	31
3.2. Métodos	32
3.2.1. Titulação da Amostra Viral	32
3.2.2. Reação de Imunofluorescência direta (IFD)	32
3.2.3. Técnica de Inoculação Intracerebral em camundongos (IC)	33
3.2.4. Técnica de heminested RT-PCR (hn RT-PCR)	34
3.3. Delineamento Experimental	38
3.4. Análise Estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Sintomatologia Clínica	42
4.2. Resultados da IFD	44

4.3. Resultados da IC	47
4.4. Resultados da hn RT-PCR.....	49
4.5. Resultados Globais.....	52
4.6. Resultados da Análise Estatística.....	55
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Camundongo apresentando paralisia de membros posteriores após a inoculação intramuscular com vírus rábico de rua. Botucatu, 2003.
- FIGURA 2 - Resultado positivo de Imunofluorescência direta em tecido cerebral de camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico. Botucatu, 2003.
- FIGURA 3 - Positividade na reação de hn RT-PCR em “pool” de materiais colhidos dos camundongos inoculados experimentalmente e sacrificados em diferentes tempos. Botucatu, 2003.
- FIGURA 4 - Resultados comparativos entre as reações de Imunofluorescência direta (IFD), Inoculação intracerebral (IC) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de materiais colhidos de camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico e sacrificados em diferentes tempos. (Resultados apresentados em percentuais). Botucatu, 2003.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Resultados da Imunofluorescência direta (IFD) nos diferentes tecidos e órgãos dos camundongos, inoculados com vírus rábico e sacrificados nos diferentes tempos pós-inoculação. Resultados apresentados em nº de materiais positivos / nº de materiais avaliados (positividade %). Botucatu, 2003.
- TABELA 2. Resultados obtidos na Inoculação intracerebral em camundongos (IC), para reisolamento viral dos diferentes materiais colhidos nos diferentes tempos, dos camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico. Resultados apresentados em nº de materiais positivos / nº de materiais inoculados (positividade %). Botucatu, 2003.
- TABELA 3. Resultados obtidos na reação de hn RT-PCR de “pools” dos diferentes tecidos e órgãos colhidos de camundongos inoculados experimentalmente e sacrificados em diferentes tempos. Resultados apresentados em nº de “pools” positivos / nº de “pools” avaliados (positividade %). Botucatu, 2003.

LIMA, K.C. **Avaliação da técnica da reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) no estudo da distribuição do vírus rábico em camundongos (*Mus musculus*) inoculados experimentalmente.** Botucatu, 2003. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O diagnóstico da raiva baseia-se na reação de Imunofluorescência direta (IFD) e Inoculação intracerebral em camundongos (IC). Atualmente vários trabalhos vem sendo realizados utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) no diagnóstico da raiva com resultados promissores. O presente trabalho pretendeu estudar a distribuição do vírus rábico utilizando a reação de PCR, em camundongos inoculados experimentalmente. Foram inoculados 150 camundongos, por via intramuscular, com vírus rábico de rua. Grupos de cinco animais foram sacrificados em diferentes tempos, sendo colhidos fragmentos de músculos dos membros posteriores e anteriores direitos e esquerdos, bexiga, rim direito e esquerdo, baço, fígado, pulmão, glândula salivar, cérebro e medula. Os materiais foram processados pelas técnicas de IFD, IC e PCR. Resultados positivos foram obtidos a partir do 5º dia pós-inoculação em medula, seguida pela detecção em cérebro, glândula salivar, membros, pulmão, fígado, baço, bexiga, língua e rim direito no 10º dia pós-inoculação utilizando as diferentes técnicas. A reação de PCR demonstrou ser eficaz para o estudo da distribuição viral.

Palavras-chave: Imunofluorescência direta (IFD), PCR, Raiva, Patogenia

LIMA, K.C. **Evaluation of polymerase chain reaction in the study of rabies virus distribution in mice (*Mus musculus*) experimentally inoculated.** Botucatu, 2003. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT:

Rabies diagnosis is routinely based in Fluorescent Antibody Technique (FAT) and Intracerebral Mouse Inoculation Technique (MIT). Recently, the Polymerase Chain Reaction (PCR) has been evaluated as a diagnostic method with good results. The aim of this work was to evaluate rabies virus distribution in mice experimentally inoculated using the Polymerase Chain Reaction. It was realized the inoculation of 150 mice with street rabies virus using intramuscular route. Groups of 5 animals were sacrificed in different moments and several tissues and organs were collected. The materials were processed by FAT, MIT and PCR. Rabies virus was detected first at spinal cord on the 5th day post inoculation , followed by brain, salivary gland, lung, kidney, foot pad, spleen, bladder and tongue after the 10th day. The Polymerase Chain Reaction demonstrated efficacy for rabies virus distribution study.

KEY - WORDS: Rabies, PCR, Fluorescent Antibody Technique, Intracerebral Mouse Inoculation, Pathogenesis.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A raiva é uma doença infecto-contagiosa que acomete o sistema nervoso central (SNC) de todos os mamíferos, incluindo o homem (PITZCHKE, 1998), quase sempre fatal, transmitida por mordeduras ou através de lesões de pele contaminada com saliva de animal raivoso (BLOOD et al., 1991).

A enfermidade é conhecida desde o século XXIV a.C., através do código de Eshmuna da Mesopotâmia e, mais tarde, no século IV a.C. é relatada a forma clínica da enfermidade por Demócrito (SILVA, 2000) e a transmissão pela mordedura de cão raivoso, por Aristóteles (NOVA et al., 1996). Cornelius Celsus foi o primeiro a descrever a raiva em humanos e criou o termo hidrofobia (KOPROWSKI, 1995).

Na Europa, os primeiros relatos de raiva em cães apareceram em 1029, na Grã-Bretanha, e nas Américas foram observados desde o século XVIII. Zinke demonstrou a infecciosidade da saliva dos cães em 1804. Gruner e Salm, em 1913, e Magendie e Brescher, em 1821, demonstraram, respectivamente, a infecciosidade da saliva dos herbívoros e dos humanos (SILVA, 2000).

O período de 1881 a 1885 é considerado a ERA PASTEURIANA, pois ocorreram sucessivos eventos através do pesquisador Louis Pasteur, onde foram realizados os primeiros informes sobre raiva, como, por exemplo, o uso do sistema nervoso dos animais para estudos sobre a enfermidade; passagens sucessivas do vírus do cão para o macaco e entre macacos, na tentativa de reproduzir a doença em primatas; a obtenção do chamado "vírus fixo", através da atenuação do

vírus rábico; os primeiros relatos sobre vacinações e importantes estudos no campo da imunidade (GUERREIRO, 1981).

O agente da raiva é um RNA-vírus pertencente à Ordem Mononegavirales, classificado na família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus* (PRINGLE, 1991). Possui uma estrutura cilíndrica em forma de “projétil de revólver”, com uma extremidade plana e outra arredondada, com aproximadamente 180 nm de comprimento por 75 nm de diâmetro (MURPHY, 1991).

Possui um envelope composto por uma bicamada lipídica, à qual estão associadas duas proteínas: a proteína M de membrana, importante na regulação da replicação viral (SOKOL et al, 1971; DELAGNEAU et al, 1981; TORDO et al, 1986) e a proteína G, uma glicoproteína presente na membrana, responsável pela adsorção viral e por induzir à formação de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados (TORDO e POCH, 1988).

O RNA genômico do vírus rábico é composto de uma fita simples (única), não segmentada, de polaridade negativa, com simetria helicoidal (HAGAN e BRUNER, 1988), na qual estão presentes duas outras proteínas virais: proteína L (large), que corresponde à RNA-polimerase do vírus, responsável pela transcrição e replicação do genoma viral e a proteína N (proteína de nucleocapsídeo), que corresponde a 32% da constituição protéica do vírus, importante no processo de encapsidação, estando intimamente ligada ao genoma viral (TORDO et al. 1986).

O gênero *Lyssavirus* é bastante grande, porém apenas seis espécies pertencem ao grupo do vírus da raiva, sendo essas

espécies classificadas segundo bases sorológicas e antigênicas (W.H.O., 1992).

As amostras clássicas do vírus rábico, incluindo as de vírus de rua e as de vírus fixos, são representadas pelo genotipo I (SCHNEIDER et al, 1975; BOURHY et al, 1990). Também os vírus isolados de morcegos das Américas pertencem a este genotipo.

O genotipo II é representado pelo vírus "Lagos Bat" isolado de morcego frugívoro na África (BOULGER e PORTEFIELD, 1958; KING e TURNER, 1993). O genotipo III é representado pelo vírus Mokola isolado de musaranho e de um homem na África. O genotipo IV é representado pelo vírus Duvenhage, isolado de morcego insetívoro e de um homem na África (MEREDITH et al, 1971) e os genotipos V, VI e VII correspondem ao "European Bat Lyssaviruses" (EBL 1 e EBL 2), que foram isolados de morcegos na Europa (SCHNEIDER, 1982) e atualmente o "Australian Bat Lyssavirus" (ABLV), que foi caracterizado por análise da seqüência de genes, na Austrália (GOULD et al, 1998).

A principal via de ingresso do vírus da raiva é transcutânea, pelo contato direto, através de mordida de animais raivosos, ou portadores, que estejam eliminando o vírus pela saliva (KOPROWSKI, 1995). Infecções por meio de contaminação de ferimentos são raras. A via respiratória também pode levar à doença, devido ao ingresso em cavernas com grande concentração de morcegos, e em laboratórios onde o risco de infecção é grande (CONSTANTINE, 1967; WINKLER, 1968; WINKLER et al., 1972; TILLOTSON et al., 1977).

Há evidências, que indicam que o vírus rábico replica-se em miócitos, no sítio de inoculação, antes de penetrar em nervos periféricos. A replicação em miócitos, após a inoculação, pode ser um

fator contribuinte pela variedade do período de incubação. Quando o período de incubação é curto, o vírus pode invadir o sistema nervoso periférico logo após a inoculação, com replicação limitada em tecidos extraneurais (MURPHY et al., 1973a; MURPHY et al., 1973b; CHARLTON e CASEY, 1979, 1981; MATSUMOTO e KAWAI, 1982; KOPROWSKI, 1995).

A ligação e a penetração do vírus nas células musculares não têm sido demonstradas "in vivo", mas, com facilidade, culturas celulares podem ser infectadas "in vitro", o que sugere a adesão do vírus às células, mediada por moléculas de glicoproteína viral e receptores na superfície, ocorrendo em seguida a penetração do vírus por fusão com a membrana plasmática celular ou por endocitose. Dentro da célula, o pH ácido da vesícula endocítica ativa a fusão da membrana do vírus com a membrana endossômica, permitindo ao genoma viral ser incluído dentro do citoplasma da célula (BAER e LENTZ, 1991).

O neurotropismo do vírus rábico foi reconhecido no século XIX, estabelecendo-se uma rota neural para o SNC, logo após a infecção. Este neurotropismo foi baseado em estudos experimentais com animais, onde procedimentos cirúrgicos de amputação do membro sugeriram a replicação do vírus em fibras musculares antes da invasão do sistema nervoso (MURPHY et al., 1973). A replicação do vírus, em células musculares, estaria relacionada à amplificação necessária para produção de uma quantidade de vírus suficiente para invasão do sistema nervoso periférico (MURPHY e BAUER, 1974).

O vírus rábico penetra pelas fibras nervosas desmielinizadas ou terminações musculares, por transporte axonal retrógrado, até o neurônio sensorial ou motor da raiz do gânglio dorsal ou corno anterior da medula espinhal, correspondente ao local afetado, onde

sofre o primeiro ciclo de replicação (KOPROWSKI, 1995). Pode haver então uma distribuição em duas direções, o retorno ao nervo sensorial periférico (no ponto onde houve a infecção) ou o transporte interaxonal, neurônio a neurônio, via junção neuronal, para o trato corticoespinal, onde infecta neurônios em quase todas as regiões até atingir o cérebro (JOHNSON, 1965; SCHNEIDER e HAMANN, 1969; SCHNEIDER, 1969a, b; MURPHY et al., 1973a; KOPROWSKI, 1995).

IWASAKI e CLARK (1975) observaram a liberação do vírus, por brotamento, da membrana plasmática de células nervosas de camundongos lactentes e adultos infectados com amostra de “vírus rua” e amostra de “vírus fixo” e sugeriram que a disseminação do vírus rábico é uma combinação de fluxo axoplásmico retrógrado, transmissão célula a célula via junção sináptica, e livre passagem do vírus dentro dos espaços intercelulares.

A infecção generalizada ocorre de maneira homogênea para áreas adjacentes, da entrada do SNC até as demais áreas do cérebro e medula espinhal. A distribuição pode ser rápida e neurônios com longos axônios podem possibilitar uma progressão da infecção a longas distâncias (KING e TURNER, 1993).

Após a replicação viral no cérebro, o vírus distribui-se de maneira centrífuga para uma variedade de tecidos nos tratos respiratórios, gastrointestinal e urogenital (MURPHY et al., 1973b; MURPHY e BAUER, 1974; SCHNEIDER, 1975) já tendo sido isolado ou demonstrado em glândulas salivares, pulmões, coração, língua, vesícula biliar, rins, bexiga, músculos e até junções mioneurais ou placas motoras (FISCHMAN e SCHAEFFER, 1971; BAER e LENTZ, 1975; IWASAKI e CLARK, 1975).

No caso de infecções por aerossóis o vírus rábico penetra no epitélio olfatório da narina e fibras nervosas da mucosa nasal, sendo transportado para os neurônios do bulbo olfatório, onde provavelmente se replica, distribuindo-se para outros neurônios do cérebro (KOPROWSKI, 1995).

SILVA e SOUZA isolaram vírus rábico de diferentes tecidos de bovinos (1967) e morcegos (1968). SILVA et al. (1967) isolaram o vírus de diferentes tecidos no cão e no gato (1968) e a presença do vírus rábico em tecidos não nervosos de morcegos foi relatada também por NILSSON e NAGATA em 1975.

Devido à distribuição irregular do vírus rábico pelo cérebro, outros tecidos podem ser usados associadamente para o diagnóstico, como glândulas salivares, córneas, pele e tonsilas (CAMPBELL e CHARLTON, 1988). FEKADU et al. (1982) demonstraram vírus rábico em tonsilas de cães e o vírus foi identificado em glândulas salivares ou saliva de raposas, gambás e cães (LARGHI et al., 1975; de ANGELIS CORTÊS G., 1979; CHARLTON et al., 1984; WINKLER et al., 1985; TRIMARCHI et al., 1986).

O diagnóstico clínico da raiva baseia-se nos sinais e sintomas, principalmente na forma furiosa e parálitica da doença (ACHA, 1986), no entanto, o diagnóstico definitivo é sempre laboratorial (BAER, 1975; NILSSON e SUGAY, 1966a, b).

Negri, em 1903, observou estruturas intracitoplasmáticas em tecidos cerebrais de animais afetados pelo vírus rábico (KRISTENSSON et al., 1996) e, em 1927, foi descrita a técnica de coloração de corpúsculos de Negri, denominada técnica de Sellers (SELLERS e FELLOW, 1927).

A técnica de Imunofluorescência direta (IFD) foi introduzida por GOLDWASSER e KISSLING (1958), mantendo-se até hoje como teste diagnóstico padrão em raiva (BORDIGNON e ZANETTI, 2000), realizada rotineiramente utilizando impressões de tecido cerebral em lâminas de microscopia. A utilização da IFD em cortes de congelamento foi relatada, posteriormente por TSIANG et al. (1983), HOWARD (1981) e LORETU et al. (1988) que a utilizaram para estudo da patogenia da raiva .

WEBSTER E DAWSON (1935) introduziram a técnica de Inoculação intracerebral em camundongos (IC) sendo considerada esta espécie o modelo biológico para detecção do vírus rábico em materiais suspeitos (JOHNSON, 1979; SUREAU, 1986).

O isolamento do vírus rábico pela técnica de IC é utilizado como confirmatório de IFD, uma vez que possibilita a replicação viral, permitindo a detecção de menores quantidades de vírus (ATANASIU, 1940 apud CAMPBELL e CHARLTON, 1988; KOPROWSKI, 1976).

A inoculação de camundongos por via intracerebral com vírus rábico de rua apresenta manifestações clínicas como excitabilidade e paralisia típica, enquanto que os camundongos inoculados com amostra de vírus rábico "fixo" apresentam apenas paralisia (MIYAMOTO e MATSUMOTO, 1967).

Para o sucesso de alguns novos testes diagnósticos em substituição ao teste de inoculação em animais, estes devem ser no mínimo tão sensível na demonstração do vírus rábico, como ocorre em cultivos celulares com células BHK, e em métodos de amplificação, como os bioquímicos, que podem ser usados quando a quantidade de vírus

rábico nos tecidos for pequena, a fim de se obter cópias do ácido nucléico viral (PORTNÖL, 1982; RAIVA ONLINE ; RUDD et al., 1980).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) provavelmente constitui o maior avanço na biologia molecular desde o advento da tecnologia do DNA recombinante (FENNER et al., 1993) e vem sendo considerada como uma alternativa para o diagnóstico, a tipificação e o estudo da epidemiologia molecular do vírus rábico (TORDO et al., 1996)

A técnica de PCR, utilizada rotineiramente para DNA, pode ser modificada para a detecção de RNA-viral por incorporação de um passo preliminar no qual a transcriptase reversa converte o RNA em DNA, constituindo a RT-PCR. Com este método, o RNA do vírus rábico pode ser enzimaticamente amplificado como cópias de DNA (FENNER et al., 1993).

SACRAMENTO et al. (1991) desenvolveram um protocolo para realização da técnica de PCR como método alternativo para o diagnóstico e estudos da epidemiologia molecular dos vírus rábicos.

Cerca de 40 ciclos de amplificação podem produzir 10^{12} vezes a quantidade original de ácido nucléico viral nas amostras teciduais. Essa técnica pode ser usada para confirmar resultados do teste de anticorpos fluorescentes e para detectar vírus na saliva e nas amostras de biópsia de pele, que contém diminutas quantidades de vírus rábico (RAIVA ONLINE).

Atualmente a técnica de PCR tem sido usada para diagnósticos rápidos de casos de raiva, assim como, detecção e identificação de genótipos do vírus rábico e vírus rábicos relacionados,

além de estudos epidemiológicos, permitindo estratégias de controle específico a serem implementadas (ACHA, 1986; NADIN-DAVIS, 1998; NEL et al., 1998)

ERMINE et al. (1990) realizaram um experimento utilizando a técnica de PCR para amplificar o ácido nucléico de vírus rábico, de cérebros de camundongos, antes de realizarem a técnica de hibridização, possibilitando o uso do PCR associado à hibridização no diagnóstico da raiva, principalmente nos primeiros estágios de inoculação.

KAMOLVARIN et al. (1993) detectaram RNA viral através de PCR usando “nested primers”. A seqüência de nucleocapsídeo rábico foi amplificada em amostras de cérebro de 95 cães e 3 humanos, com raiva confirmada por IFD e inoculação em camundongos. Outras 110 amostras de cérebro de cães e 2 de humanos negativas para raiva na IFD e IC resultaram também negativas no PCR.

HEATON et al. (1997) detectaram seis dos sete genótipos de vírus rábico e vírus rábicos relacionados existentes, realizando um estudo da sensibilidade da heminested RT-PCR (hn RT-PCR) em amostras de cérebros infectados com vírus rábico, positivas a IFD, demonstrando 100% de concordância entre os resultados da hn RT-PCR e da IFD.

WHITBY et al. (1997) desenvolveram um método rápido de detecção de vírus rábico e vírus rábicos relacionados, utilizando a técnica de RT-PCR, associado a um teste de ELISA, onde os produtos amplificados na reação de PCR puderam ser detectados pelo ensaio imunoenzimático.

Outra aplicação do uso da técnica de PCR foi demonstrada por KULONEN et al. (1999), que realizaram PCR em amostras de tecidos cerebrais positivos para raiva, confirmada pela IFD, e que estavam fixados em “Carnoy” e embebidas em parafina. A técnica de PCR mostrou 100% de sensibilidade frente a IFD.

HEATON et al. (1999) detectaram e identificaram vírus rábico e vírus rábicos relacionados usando “rapid-cycle PCR” ou PCR em tubos capilares, e através dessa técnica foram capazes de diagnosticar raiva em humanos em um período de cinco horas.

MCCOLL et al. (1993), na Austrália, com a amplificação de fragmentos do gene N (nucleoproteína) e gene G (glicoproteína) de vírus rábico diagnosticou, pela técnica de PCR, vírus rábico que se caracterizava por longo período de incubação em humanos. A presença do antígeno viral foi demonstrada na suspensão cerebral de uma paciente humana, que apresentava sinais de alteração neurológica compatíveis com diagnóstico de raiva, não justificado pelo longo período de cinco anos de incubação da doença.

CREPIN et al. (1998) detectaram RNA genômico de vírus rábico, usando um protocolo de RT-PCR, em amostras de saliva obtidas de 28 pacientes suspeitos de raiva, dos quais cinco com diagnóstico positivo no RT-PCR, confirmado em exame *pós-mortem* usando teste de anticorpos fluorescentes.

Na Estônia, duas amostras diferentes de vírus rábico foram identificadas utilizando a técnica de PCR, mostrando sua aplicação em investigações epidemiológicas e em surtos, podendo ocorrer infecções mistas em áreas geográficas próximas (KULONEN e BOLDINA, 1993).

ITO et al. (2001) detectaram RNA de vírus rábico isolado de diferentes espécies animais do Brasil (5 morcegos hematófagos, 14 bovinos, 12 cães, 11 gatos, 2 cavalos, 1 suíno, 1 ovino e 3 humanos), de diferentes regiões geográficas pela técnica de RT-PCR. Concluíram que os vírus rábicos isolados no Brasil podem ser divididos em duas populações de acordo com diferenças genéticas.

No Brasil, SOARES et al. (2002) utilizaram a reação do hn RT-PCR para detecção de vírus rábico isolado de morcegos hematófagos e herbívoros, mostrando ser a técnica eficiente na amplificação dos vírus rábicos isolados do ciclo epidemiológico rural.

Considerando as questões ainda existentes no que se refere à patogenia viral e os avanços relacionados ao uso da técnica de PCR no diagnóstico de raiva, o presente trabalho pretendeu avaliar a técnica de RT-PCR no estudo da distribuição do vírus rábico em camundongos inoculados experimentalmente com vírus de rua.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a técnica de hn RT-PCR no estudo da distribuição do vírus rábico de rua em camundongos inoculados experimentalmente.

2.2. Objetivos específicos

Estudar a distribuição do vírus rábico de rua em camundongos inoculados experimentalmente.

Avaliar a técnica de hn RT-PCR como método de detecção precoce do vírus rábico nos tecidos animais.

Comparar as técnicas de hn RT-PCR, Imunofluorescência direta (IFD) e Inoculação em camundongos (IC) no diagnóstico da raiva.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Animais

Para a inoculação experimental e para a técnica de Inoculação intracerebral (IC) foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos-suíços, machos e fêmeas, com 30 e 21 dias de idade, respectivamente, provenientes do Biotério Central da UNESP/Botucatu.

3.1.2. Vírus

3.1.2.1. Vírus rábico de rua

Utilizou-se uma amostra de vírus rábico de rua isolada originalmente de um cão¹, com uma passagem intracerebral em camundongos e mantida armazenada em nitrogênio líquido, no laboratório de Imunologia Aplicada das Enfermidades Infecciosas dos Animais (EIA).

3.1.2.2. Vírus rábico fixo

Na técnica de Imunofluorescência direta (IFD) foram utilizadas amostras de vírus fixo Challenge Vírus Standard (CVS)

¹ Cedido gentilmente por Dra. Luzia de Queiroz - FO - UNESP , Araçatuba - SP.

mantidas no laboratório de Imunologia Aplicada da EIA, para realização de lâminas controle-positivas e para a diluição a 20% do conjugado anti-rábico, segundo protocolo do fabricante.

3.1.3. Suspensão de cérebro normal

Cérebros de camundongos sadios foram macerados em graals e diluídos a 20% (peso/volume) com diluente viral, centrifugados e as suspensões foram utilizadas para diluição do conjugado anti-rábico, de acordo com protocolo do fabricante, constituindo controle negativo da reação de Imunofluorescência direta.

3.1.4. Diluente Viral

Para o preparo de suspensões virais foi preparado o diluente viral constituído de 100 mL de água mili Q esterilizada, acrescida de 2% de soro eqüino normal, inativado a 56° C por 30 minutos, e 10 mg tetraciclina (Terramicina®).

3.1.5. Conjugado anti-rábico

Para a técnica de Imunofluorescência direta foi utilizado conjugado anti-rábico anti-nucleocapsídeo produzido pelo laboratório SANOFI - PASTEUR (Conjugué Antinucléocapside Rabique Liquide®, 0,5 mL).

3.1.6. Enzimas

Para a técnica de RT-PCR foram utilizadas as enzimas Moloney Murine Leukemia Reverse Transcriptase (M-MuLV RT)[®] 200 U/ μ l dos laboratórios Invitrogen e a *Thermus aquaticus* DNA polymerase (taq DNA polymerase) [®] 5,000 U/ μ l dos laboratórios Labtrade do Brasil Ltda.

3.1.7. Oligonucleotídeos iniciadores (PRIMERS)

Os oligonucleotídeos utilizados na técnica de RT-PCR seguiram a descrição do protocolo de ALVES (2001). Os “primers” 505 e 937 externos foram utilizados na síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa e na amplificação do cDNA obtido nesta reação, gerando um produto de 432pb (pares de bases). O “primer” interno 779 foi utilizado no heminested PCR, para a reamplificação dos produtos obtidos na reação da PCR produzindo um fragmento de 274pb. Os “primers” foram direcionados ao gene codificador da nucleoproteína para detecção dos *Lyssavirus* pertencentes ao genotipo I, utilizando o programa OLIGO 4.0. (BERNARDI, 1999).

Os desenhos dos “primers” estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Seqüência dos “PRIMERS”.

Primers	Seqüência	Sentido
P 505	5' ATAGAGCAGATTTTCGAGACAGC 3'	Sense
P 937	5' CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA 3'	Anti-sense
P 779	5' CCCATATAACATCCAACAAAGTG 3'	Anti-sense

3.2. Métodos

3.2.1. Titulação da Amostra Viral

A titulação foi realizada utilizando-se diluições seriadas 10^{-1} a 10^{-5} de suspensão viral, inoculadas em camundongos, na dose 0,03 mL por via intracerebral. Todos os cálculos foram realizados segundo Reed e Muench (KAPLAN e KOPROWSKI, 1976).

3.2.2. Reação de Imunofluorescência direta (IFD)

A reação de IFD foi realizada segundo a metodologia preconizada por GOLDWASSER e KISSLING (1958), em cortes por congelamento de acordo com TSIANG et al. (1983).

Após a colheita, os órgãos foram congelados em nitrogênio líquido e encaminhados ao laboratório de histopatologia da Faculdade de Medicina da UNESP, campus de Botucatu, para realização dos cortes histopatológicos em micrótomo de criostato.

Os cortes foram realizados em espessura de 0,4 micras e fixados sobre lâminas de microscopia. Em seguida, delimitaram-se dois campos para leitura do material fixado. Em um dos campos acrescentou-se conjugado anti-rábico previamente diluído com CVS e no outro campo conjugado diluído com Suspensão de Cérebro Normal (SCN).

As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas a 37° C por 30 minutos.

Após a incubação, as lâminas foram submetidas a três lavagens, por 10 minutos cada, com solução salina de tampão fosfato (PBS), pH 8,5 e, em seguida, lavadas em água destilada. Após secas, adicionou-se uma gota de glicerina tamponada, pH 8,5, sobre os campos delimitados. As lâminas foram cobertas com lamínulas e a leitura realizada em microscópio binocular Olympus, modelo CX 40, com lâmpadas de mercúrio HBO 50 W/AC.

3.2.3. Técnica de Inoculação intracerebral em camundongos (IC)

A IC foi realizada segundo o método descrito por KOPROWSKI (1976) para o reisolamento viral, porém com a modificação da via de inoculação para a via intramuscular (membro posterior direito), na inoculação experimental, visando o estudo da distribuição viral.

Para o reisolamento viral, camundongos de 21 dias de idade foram inoculados, via intracerebral, com 0,03 mL das suspensões a 20% do macerado dos órgãos coletados dos animais nos diferentes tempos.

Os camundongos foram observados por um período de 30 dias. Animais com sintomas clínicos após o décimo dia de inoculação foram sacrificados para realização de IFD do cérebro.

Todos os animais que morreram após o quinto dia foram submetidos a IFD,

3.2.4. Técnica de heminested RT-PCR (hn RT-PCR)

A hn RT-PCR foi realizada segundo ALVES (2001).

A síntese de DNA complementar (cDNA), amplificação, heminested RT-PCR e eletroforese foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Zoonoses no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública -FMVZ - UNESP/Botucatu.

Com o fragmento dos órgãos macerados, preparou-se uma suspensão a 20% com solução TRIS-EDTA-HCL (TE) (10 mM Tris - HCL e 1 mM EDTA, pH 7,8), sendo então esta suspensão de órgãos acondicionada em microtubos plásticos e congeladas à -20° C até o momento da análise. Os materiais foram descongelados aos poucos e seguiram-se os protocolos:

Protocolo de Extração de RNA

- Homogeneizou-se 600 microlitros de Trizol® a 200 microlitros de suspensão de órgãos preparada a 20% em TE
- Incubou-se a suspensão a temperatura ambiente (15 - 30° C) por 5 minutos
- Adicionou-se 200 microlitros de clorofórmio e homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos
- Incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente
- Centrifugou-se a 12000g / 5 minutos a 4 ° C
- Transferiu-se a base aquosa para outro tubo (foram retirados 3 vezes o conteúdo de 160 microlitros)
- Adicionou-se 480 microlitros de álcool isopropílico
- Homogeneizou-se por inversão 5 vezes e depois em vórtex por 15 segundos
- Incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos
- Centrifugou-se a 12000g / 15 minutos a 4° C
- Desprezou-se o sobrenadante
- Lavou-se o sedimento com 1,0 mL de etanol 75%
- Homogenizou-se em vórtex por 15 segundos
- Centrifugou-se a 7500g / 5 minutos a 4° C
- Desprezou-se o conteúdo do microtubo cuidadosamente para não desprezar o “pellet” formado no fundo do tubo
- Secou-se o sedimento por 5 a 10 minutos
- Ressuspendeu-se em 15 microlitros de água DEPC autoclavada
- Incubou-se em banho-maria a 56° C por 10 minutos

Protocolo de Síntese de DNA complementar (cDNA)

Inicialmente aqueceu-se no termociclador a 95° C por 5 minutos, 7 microlitros de amostra de RNA extraído, para facilitar a ação da enzima transcriptase reversa, que foi adicionada às amostras. Preparou-se então o MIX para reação, constituído por:

- 4 microlitros de solução tampão (5 vezes concentrado)
- 2 microlitros de dNTP (10 milimolar)
- 2 microlitros de “primer” 505 (10 pmol/ μ)
- 2 microlitros de “primer” 937 (10 pmol/ μ)
- 2 microlitros de DTT (10 milimolar)
- 1 microlitro de RT (200 u/ μ)
- Distribuíram-se 13 μ L desta mistura nos microtubos com cada amostra aquecida, totalizando 20 μ L e incubou-se a 42° C por 60 minutos no termociclador

Protocolo para a Amplificação de cDNA

Para a amplificação do cDNA o mix de cada reação foi composto por:

- 25,25 microlitros de água mili-Q
- 8 microlitros de dNTP (1,25 milimolar)
- 5 microlitros de tampão para PCR
- 2,5 microlitros de “primer” 505 (10 pmol/ μ L)
- 2,5 microlitros de “primer” 937 (10 pmol/ μ L)
- 1,5 microlitros de MgCl₂ (50 milimolar)
- 0,25 microlitros de Taq polimerase
- Adicionaram-se 5 microlitros de cada amostra em 40 microlitros do mix.

No termociclador as amostras foram submetidas aos seguintes ciclos:

- Desnaturação inicial: 94° C por 3 minutos

Os ciclos de desnaturação, hibridização e extensão foram repetidos 35 vezes sendo:

- Desnaturação: 94° C por 45 segundos
- Hibridização: 55° C por 1 minuto
- Extensão: 72° C por 10 minutos

As amostras foram submetidas a um ciclo de extensão final de 72°, por 10 minutos, e mantidas a 4° C para realização do hn RT-PCR.

Protocolo para a hn RT-PCR

Para realização do hn RT-PCR o mix foi constituído de:

- 25,25 microlitros de água mili-Q
- 8 microlitros de dNTP (1,25 milimolar)
- 5 microlitros de tampão para PCR
- 2,5 microlitros de “primer” 505 (10 pmol/μL)
- 2,5 microlitros de “primer” 779 (10 pmol/μL)
- 1,5 microlitros de MgCl₂ (50 milimolar)
- 0,25 microlitros de Taq polimerase
- Distribuíram-se 45 microlitros desta mistura nos microtubos e adicionaram-se 5 microlitros de cada amostra de cDNA amplificado.

No termociclador as amostras foram submetidas as seguintes etapas:

- Desnaturação inicial: 94° C por 3 minutos

Os ciclos de desnaturação, hibridização e extensão foram repetidos 25 vezes sendo:

- Desnaturação: 94° C por 45 segundos
- Hibridização: 55° C por 1 minuto
- Extensão: 72° C por 10 minutos

As amostras foram submetidas a um ciclo de extensão final de 72° por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram conservados a 4° C até o momento da eletroforese, realizada em cuba horizontal contendo tampão borato EDTA (TBE) 0,5x (0,04M tris-borato e 1 mM de EDTA, pH 8,0) em gel de agarose a 1,5 % (p/v) e submetidos à corrida eletroforética a 100V por 1:20 hora. Os produtos amplificados foram visualizados no transiluminador, sob luz ultravioleta e fotografados com FCR-10 câmara/Fotodyne, com filme Polaroid 667, asa 3000.

3.3. Delineamento Experimental

Foram inoculados, por via intramuscular, com 0,03 mL de uma suspensão a $10^{-2.3}$ de vírus rábico de rua, 150 camundongos de 30 dias de idade. Grupos de 5 animais foram sacrificados às 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 horas e 5, 7, 10, 14, 17, 21, 25 e 30 dias pós-inoculação.

De cada animal sacrificado foram colhidos partes dos músculos dos membros anteriores direito (MAD) e esquerdo (MAE),

músculos dos membros posteriores direito (MPD) e esquerdo (MPE), bexiga, rins direito (rim D) e esquerdo (rim E), fígado, baço, pulmão, glândula salivar, língua, cérebro e medula. Estes materiais foram divididos em 3 fragmentos, acondicionados em tubos plásticos (tipo Eppendorf®) e processados de acordo com a técnica diagnóstica a que foram submetidos.

Para a reação de IFD os fragmentos foram envolvidos em talco cirúrgico, congelados em nitrogênio líquido e submetidos a cortes histológicos de congelamento e mantidos em lâminas a -20°C , até a realização da técnica.

Para a IC os fragmentos, de cada animal, foram congelados a -20°C e aos poucos foram macerados individualmente em graals, com diluente viral. Em seguida, foram centrifugados e as suspensões inoculadas via intracerebral em camundongos de 21 dias, visando o reisolamento do vírus rábico.

Para a técnica de hn RT-PCR os fragmentos foram congelados a -20°C , logo após terem sido colhidos, e depois foram macerados individualmente em graals com tampão TE, no momento da realização da técnica.

Foi realizado “pool” das suspensões dos órgãos, no momento da realização da técnica de hn RT-PCR, agrupando-se aleatoriamente dois e três materiais, entre os cinco colhidos.

3.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o método Kruskal - Wallis por meio do software “GraphPad InStat versão 3.00 para Windows 95”.

Foram analisados comparativamente os resultados obtidos pelas três técnicas nos diferentes órgãos e tempos, assim como os resultados de cada técnica entre os vários órgãos nos diferentes tempos de colheita, considerando-se $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Sintomatologia clínica

Os camundongos inoculados, por via intramuscular, apresentaram sintomatologia clínica a partir do 11º dia pós-inoculação, onde foram observadas paralisia de membros posteriores, apatia e incoordenação (Figura 1) e morte, evidenciados até o 17º dia pós-inoculação.

Ao serem necropsiados para a retirada dos órgãos observou-se presença de retenção urinária, com aumento da bexiga. Os cérebros apresentavam-se congestos e degenerados, tendo uma aparência amolecida.



FIGURA 1. Camundongo apresentando paralisia de membros posteriores após a inoculação intramuscular com vírus rábico de rua. Botucatu, 2003.

4.2. Resultados da IFD

As reações positivas foram caracterizadas pela presença corpúsculos de Negri no tecido analisado (Figura 2) e as negativas por ausência de fluorescência.

Os resultados obtidos na leitura das lâminas submetidas a IFD nos cortes de congelamento estão apresentados na Tabela 1.

Não foram observados resultados positivos na IFD em todos os tecidos dos vários animais examinados até o 7º dia pós-inoculação.

Ao 10º dia pós-inoculação foram observados 40% de resultados positivos na IFD, em cérebro, medula e glândula salivar. No 14º dia, 80% de positividade foi obtida em cérebro e glândula salivar, seguida de 40% de materiais positivos em medulas e 20% em rim D, fígado, baço e língua.

No 17º dia pós-inoculação foi verificada 40% de positividade em cérebro, medula e glândula salivar e 20% em língua. No 21º dia pós-inoculação foram obtidos 60% de resultados positivos em cérebros, medula e glândula salivar e ausência de positividade nos demais órgãos.

No 25º dia e no 30º dia pós-inoculação foram obtidos 80% de positividade em cérebro com ausência de resultados nos demais órgãos e tecidos.

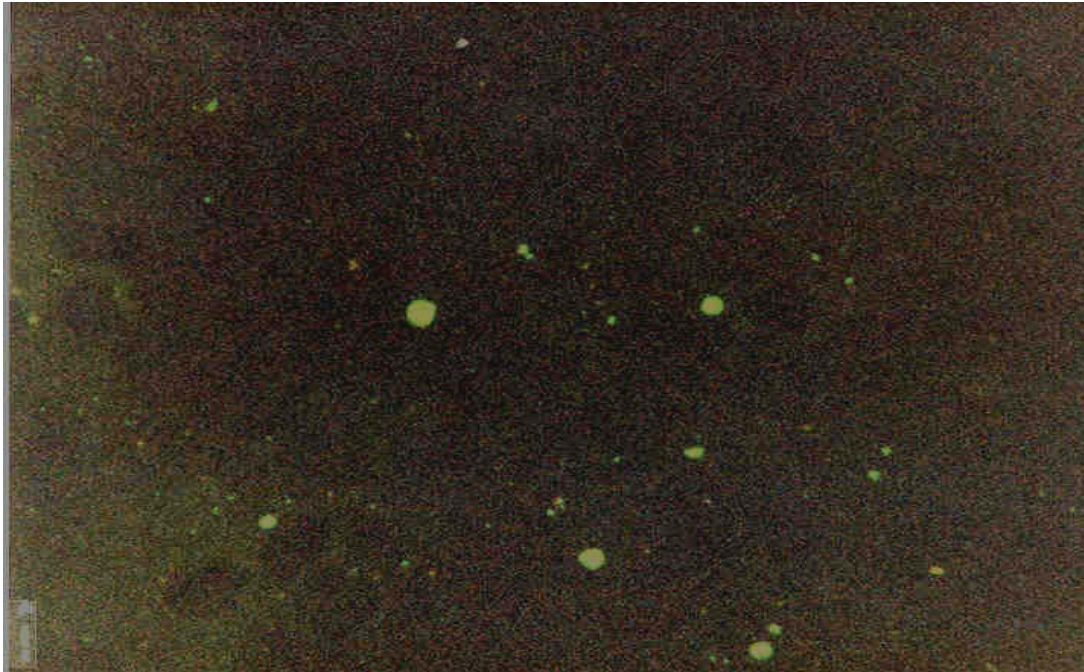


FIGURA 2. Resultado positivo de Imunofluorescência direta de tecido cerebral de camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico. Botucatu-2003.

TABELA 1. Resultados da Imunofluorescência direta (IFD) nos diferentes tecidos e órgãos dos camundongos, inoculados com vírus rábico e sacrificados nos diferentes tempos pós-inoculação. Resultados apresentados em nº de materiais positivos / nº de materiais avaliados (positividade %). Botucatu, 2003.

MATERIAIS/ TEMPOS	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA													
	MEDULA	BEXIGA	RIM D	RIM E	FÍGADO	BAÇO	PULMÃO	CÉREBRO	GL.SALIVAR	MPD	MPE	MAD	MAE	LÍNGUA
3h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
6h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
12h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
24h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
48h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
72h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
96h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
5d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
7d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
10d	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
14d	2/5 (40%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)
17d	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)
21d	3/5 (60%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)	3/5 (60%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
25d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
30d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

MPD = membro posterior direito

MPE = membro posterior esquerdo

MAD = membro anterior direito

MAE = membro anterior esquerdo

4.3. Resultados da IC

Os resultados obtidos do reisolamento viral dos diferentes materiais, colhidos dos animais nos diferentes tempos, estão apresentados na Tabela 2.

Foi observada positividade a partir do 5º dia em uma das medulas inoculadas (20%).

Ao 10º dia, 40% e 20%, respectivamente, de cérebros e medulas resultaram positivos à IC. No 14º dia, 60% dos cérebros, 40% das medulas e 20% de glândulas salivares e rim D resultaram positivos ao teste de IC. No 17º dia os maiores percentuais de positividade foram observados em glândula salivar (40%), seguido de 20% em cérebro e rim D. Os últimos resultados positivos foram observados no 21º dia em que 20% dos cérebros foram positivos ao teste.

TABELA 2. Resultados obtidos na Inoculação intracerebral em camundongos (IC), para reisolamento viral dos diferentes materiais colhidos nos diferentes tempos, dos camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico. Resultados apresentados em nº de materiais positivos / nº de materiais inoculados (positividade %). Botucatu, 2003.

MATERIAIS/ TEMPOS	INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL													
	MEDULA	BEXIGA	RIM D	RIM E	FÍGADO	BAÇO	PULMÃO	CÉREBRO	GL.SALIVAR	MPD	MPE	MAD	MAE	LÍNGUA
3h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
6h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
12h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
24h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
48h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
72h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
96h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
5d	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
7d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
10d	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
14d	2/5 (40%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
17d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
21d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
25d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
30d	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

MPD = membro posterior direito

MPE = membro posterior esquerdo

MAD = membro anterior direito

MAE = membro anterior esquerdo

4.4. Resultados da hn RT-PCR

Foram considerados positivos os materiais que demonstraram a presença obrigatória de fragmento de tamanho de 274pb, decorrente do hn RT-PCR, isoladamente ou juntamente com o fragmento de 432pb resultante da amplificação do cDNA (Figura 3).

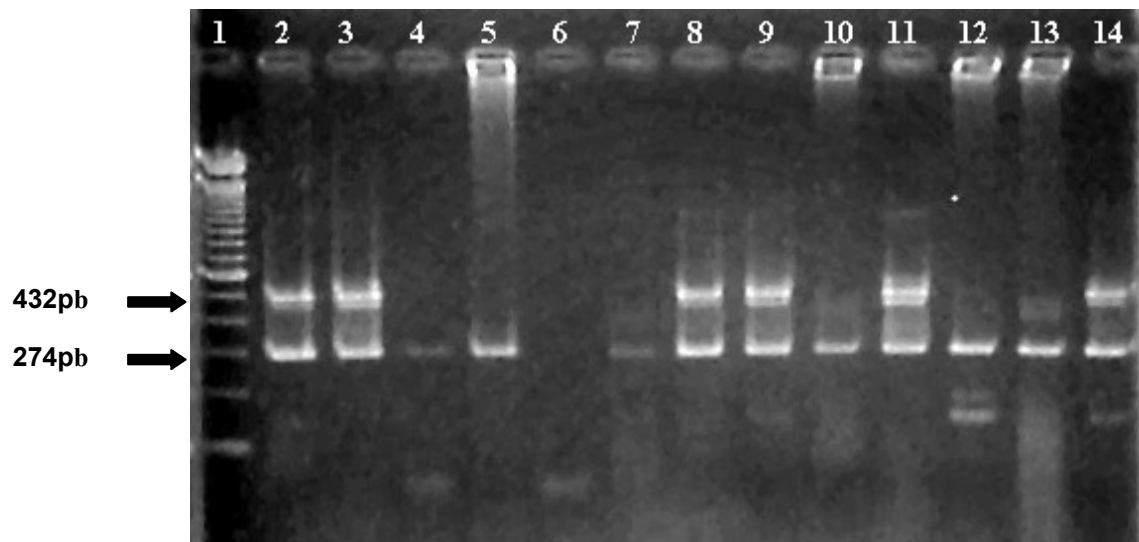
Em nenhum momento observou-se a presença de reações inespecíficas caracterizadas por fragmentos de diferentes tamanhos ao esperado, assim como a ocorrência de contaminação demonstrada por resultados positivos em água mili-Q.

Os resultados obtidos na hn RT-PCR podem ser verificados na Tabela 3.

Foi verificada amplificação do RNA viral a partir do 10° dia, onde 3/3 (100%) dos “pools” avaliados de cérebros e medulas e 1/2 (50%) dos “pools” de pulmão, glândula salivar, MPD, MPE, MAE e língua foram positivos. Foi observada também amplificação viral no 14° dia em 1/2 (50%) dos “pools” de cérebro e glândula salivar.

Foi observada positividade também no 17° dia, resultando positivos 3/3 (100%) dos “pools” dos cérebros, 1/2 (50%) de medula, bexiga, rim D, pulmão e língua e 1/3 (33,3%) de glândula salivar. No 25° dia observou-se 1/2 (50%) dos “pools” de cérebros e línguas positivos, seguidos por 1/2 (50%) dos “pools” de cérebro no 30° dia pós-inoculação.

FIGURA 3. Positividade na reação de hn-RT-PCR em “pool” de materiais colhidos dos camundongos inoculados experimentalmente e sacrificados em diferentes momentos. Botucatu, 2003.



1- Marcador 100pb
2- medula 17 d
3- cérebro 17 d
4- glândula salivar 17 d
5- medula 14 d
6- glândula salivar 14 d
7- cérebro 14 d

8- cérebro 14d
9- cérebro 10d
10- pulmão 10d
11- cérebro positivo
12- cérebro positivo
13- cérebro CVS
14- cérebro positivo Labmas

TABELA 3. Resultados obtidos na reação de hn RT-PCR de “pools” dos diferentes tecidos e órgãos colhidos de camundongos inoculados experimentalmente e sacrificados em diferentes tempos. Resultados apresentados em nº de “pools” positivos / nº de “pools” avaliados (positividade %). Botucatu, 2003.

MATERIAIS/ TEMPO	heminested RT-PCR													
	MEDULA	BEXIGA	RIM D	RIM E	FÍGADO	BAÇO	PULMÃO	CÉREBRO	GL. SALIVAR	MPD	MPE	MAD	MAE	LÍNGUA
3h	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
6h	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
12h	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
24h	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
48h	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
72h	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
96h	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
5d	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
7d	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
10d	3/3 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	3/3 (100%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
14d	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
17d	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	3/3 (100%)	1/3 (33,3%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
21d	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
25d	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
30d	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)

MPD = membro posterior direito

MPE = membro posterior esquerdo

MAD = membro anterior direito

MAE = membro anterior esquerdo

4.5 Resultados Globais

Os resultados comparativos entre as várias técnicas, nos diferentes momentos e materiais, estão apresentados na Figura 4.

Foram observados no 5º dia, resultados positivos na IC de material procedente de medula, contrariamente as demais técnicas.

No 10º dia resultados positivos foram observados na hn RT-PCR em medula e cérebro, juntamente com a IFD e IC; em glândula salivar na IFD e PCR e somente pela hn RT-PCR, em MPD, MPE, MAE , pulmão e língua.

Somente na IFD foi observada positividade em fígado, baço e língua no 14º dia. Todas as técnicas foram positivas em cérebro e glândula salivar neste período. Na medula positividade foi evidenciada pela IFD e IC.

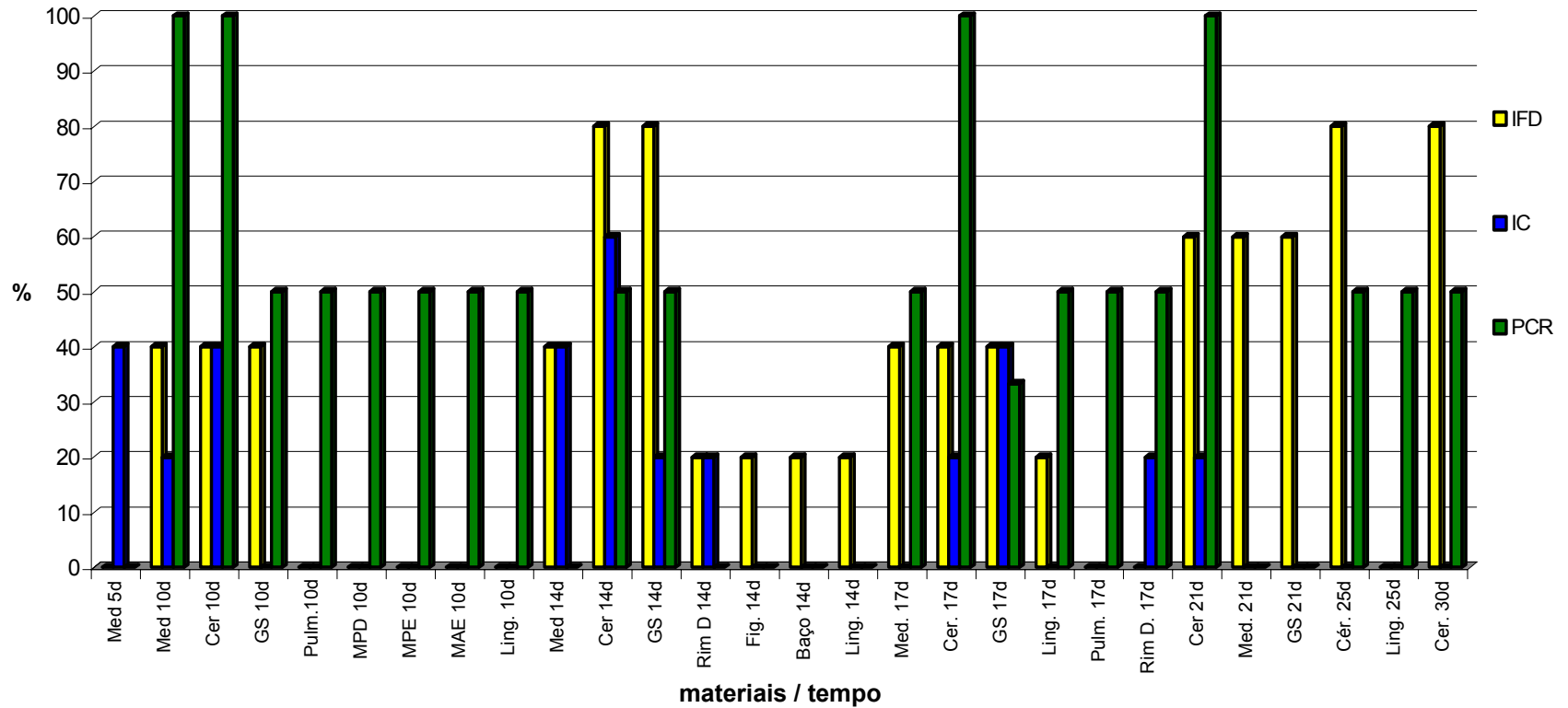
No 17º dia a hn RT-PCR resultou positiva em medula, cérebro, glândulas salivares, língua, pulmão, bexiga e rim D. Neste período, resultados positivos foram observados na IFD e IC em cérebro e glândula salivar; pela IFD em medula e língua, e pela IC em rim D.

No 21º dia positividade nas três técnicas foi observada em cérebro. Resultados positivos em medula e glândula salivar, neste dia, foram evidenciados somente pela IFD.

No 25º dia somente a hn RT-PCR resultou positiva em língua, porém positividade foi observada em cérebro por esta técnica e pela IFD.

Observaram-se resultados positivos novamente, em cérebro no 30º dia com as técnicas de hn RT-PCR e IFD.

FIGURA 4. Resultados comparativos entre as reações de Imunofluorescência Direta (IFD), Inoculação em Camundongos (IC) e Reação em cadeia pela Polimerase (PCR) de materiais colhidos de camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico e sacrificados em diferentes tempos. (Resultados apresentados em percentuais). Botucatu, 2003.



6. Resultados da Análise Estatística

A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa entre os resultados obtidos nos órgãos nos diferentes tempos pelas três técnicas utilizadas.

Quando avaliados os resultados obtidos entre os diferentes órgãos e tempos em cada técnica, positividade superior, estatisticamente significativa, foi observada na IFD do cérebro, frente aos demais tecidos, exceto, medula, glândula salivar e língua.

Resultados positivos superiores, na IC, estatisticamente significantes, foram também observados entre o cérebro e demais órgãos, excetuando-se medula, glândula salivar e rim D.

Na reação de hn RT-PCR positividade estatisticamente significativa, foi observada somente em cérebro comparativamente a rim E, fígado, baço e MAD.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A sintomatologia clínica apresentada pelos animais foi evidenciada a partir do 11º dia pós-inoculação, similar ao observado em trabalhos anteriores com esta mesma amostra viral e via de inoculação (MEGID et al., 2002), caracterizada especificamente por paralisia dos animais, concordante com os sintomas decorrentes de inoculação por vias periféricas (CAMPBELL e CHARLTON, 1988).

Foram observados no 5º dia, resultados positivos na IC de material procedente de medula, contrariamente às demais técnicas. A presença do vírus em medula, neste período, pode ser justificada pela progressão ascendente do vírus rábico com primeiro ciclo de replicação em gânglios nervosos da medula espinhal e posterior progressão ao cérebro (KOPROWSKI, 1995), sendo desta forma inicialmente detectada na medula espinhal.

A ausência de resultados positivos na reação de IFD pode ser justificada por baixo título viral presente neste tecido e ou a distribuição irregular do vírus rábico, que são fatores relacionados com resultados falso negativos na reação de IFD (DEAN, 1996; WHITFIELD et al., 2001; SMITH, 2000).

No 10º dia, contrariamente ao observado nos tempos anteriores, os melhores resultados foram observados na hn RT-PCR, sendo encontrada positividade em medula, cérebro e glândula salivar juntamente com a IFD e IC e, somente pela hn RT-PCR, em MPD, MPE, MAE e língua, demonstrando uma maior sensibilidade desta reação, comparativamente às

demais técnicas, concordando com vários autores (TRIMARCHI e BRIGGS, 1999; SMITH, 2000).

A superioridade do hn RT-PCR frente às demais técnicas foi evidenciada também no 17º dia similar ao observado no 10º dia, demonstrando a presença do vírus rábico em medula, cérebro, glândulas salivares, língua, pulmão e rim D. Neste período, resultados positivos foram observados na IFD e IC em cérebro e glândula salivar; pela IFD somente em língua, e pela IC somente em rim D. Resultados positivos em hn RT-PCR e resultados negativos na IFD e IC podem ser decorrentes de infecção viral limitada a determinada área tecidual (SMITH, 2000).

Positividade em cérebro pela hn RT-PCR com resultados negativos na IFD foi descrita por ALVES (2001) em hamsters assintomáticos vacinados com amostra PV oral, e sacrificados em diferentes momentos. Este mesmo autor relata a presença do vírus rábico em estômago, sangue e pulmão de hamsters por esta técnica.

Adicionalmente, CREPIN et al. (1998) detectaram o vírus rábico em saliva de humanos suspeitos de raiva, utilizando a RT-PCR para diagnóstico "in vivo", demonstrando sensibilidade superior a IFD de biópsia de pele.

Positividade somente na IFD foi observada em fígado, baço e língua no 14º dia. Uma vez que resultados positivos foram observados em cérebro, medula e glândula salivar pelas reações de IC e PCR é bem possível que estes resultados estejam relacionados à disseminação centrífuga do vírus, aspecto citado por vários autores (CAMPBELL e CHARLTON, 1988; KOPROWSKI, 1995).

Resultados positivos na IFD, e negativos na IC e hn RT-PCR foram observados em medula no 21º dia. Estes animais resultaram positivos à presença do vírus rábico em cérebro, justificando o seu encontro em medula. A discrepância dos resultados na IFD e IC pode ser justificada por perda de viabilidade viral decorrente de conservação inadequada ou autólise (DEAN et al., 1996).

Resultados positivos na IFD e negativos no isolamento viral foram apresentados por BOURHY et al. (1998), os quais compararam as técnicas de IFD, ELISA e isolamento em células de neuroblastoma, consideradas mais sensíveis ao isolamento viral que camundongos e outros tipos celulares, similar ao observado em nosso experimento.

Adicionalmente, MARTORELLI et al. (2000) apresentam resultados em que, de 57 amostras cerebrais positivas a IFD, somente 48 resultaram positivas a IC e 56, ao PCR, demonstrando a ocorrência de resultados discrepantes entre as três técnicas, aspecto também observado neste experimento.

Indica-se, desta forma, a realização da IC com as mesmas porções do material submetido a IFD (TRIMARCHI e BRIGGS, 1999) e a utilização de múltiplas áreas para maior confiabilidade do teste (WHITFIELD et al., 2001; BINGHAM et al., 2002). Neste experimento, os materiais foram fragmentados para serem processados pelas diferentes técnicas, resultando, muitas vezes, em quantidades extremamente pequenas, justificando os resultados negativos obtidos no teste.

Resultados discrepantes entre as técnicas de IFD, IC e RT-PCR são relatados por SMITH e YAGER (1999) e correlacionados às dificuldades técnicas para detecção do vírus em infecções localizadas em

áreas cerebrais restritas obrigando a utilização de primers adicionais para amplificação.

A partir do 10º dia a hn RT-PCR foi capaz de detectar, em todos os tempos avaliados, concordância com a IFD, e a presença do vírus rábico em cérebro, demonstrando sua eficácia como possível método diagnóstico da raiva (TRIMARCHI e BRIGGS, 1999; CREPIN et al., 1998) e como confirmatório da IFD (TRIMARCHI e BRIGGS, 1999).

A presença do vírus rábico foi caracterizada, inicialmente, na medula no 5º dia, seguida pela detecção viral no 10º dia em MPD, MPE, MAE, cérebro, medula, glândula salivar, língua, pulmão e rim D, em fígado e baço no 14º dia e também em bexiga no 17º dia, coincidindo com o período de sintomatologia clínica e morte dos animais. Estes resultados concordam com KOPROWSKI (1995) que relata primeiro o ciclo de replicação viral em gânglios nervosos da medula espinhal, com conseqüente disseminação ao cérebro via centrífuga, e concordam com CAMPBELL e CHARLTON (1988) que relatam a sintomatologia nervosa após replicação viral em sistema nervoso central.

A presença do vírus rábico em órgãos extraneurais foi demonstrada recentemente, em humanos, por meio de imunohistoquímica em adrenal, coração, pâncreas e trato gastrintestinal (JOGAI et al., 2002). Vírus rábico em miocárdio, rim, pulmão, fibras musculares e pâncreas de camundongos e outras espécies, foi relatado por meio de estudos com técnicas imunohistoquímicas e por imunofluorescência por vários autores (FISCHMAN e SCHAEFFER, 1971; CAMPBELL e CHARLTON, 1988) reforçando os encontros neste trabalho.

A presença do vírus nos diversos órgãos e tecidos, neste experimento, é concordante com vários autores que demonstraram a

disseminação centrífuga do vírus rábico e sua presença em vários tecidos e órgão extraneurais (FISCHMAN e SCHAEFFER, 1971; MURPHY et al., 1973b; MURPHY e BAUER, 1974; SCHNEIDER, 1975; CAMPBELL e CHARLTON, 1988; KOPROWSKI, 1995; JOGAI et al., 2002).

Não se detectou a presença do vírus rábico no membro posterior direito nos períodos mais imediatos pós-inoculação. A presença do vírus rábico em membros foi observada no 10º dia após inoculação e pode ser justificada pela disseminação centrífuga viral ou mesmo, no caso do MPD, por persistência viral no ponto de inoculação, uma vez que trabalhos relatam a positividade no local de inoculação por até 18 dias pós-inoculação (CHARLTON e CASEY, 1979; CAMPBELL e CHARLTON, 1988).

Adicionalmente, ressalta-se a positividade em cérebro dos animais assintomáticos sacrificados aos 25 e 30 dias, sugerindo período de incubação mais prolongado da doença nestes animais, justificado por persistência viral em ponto de inoculação (CAMPBELL e CHARLTON, 1988).

Embora o fracionamento dos órgãos possa ter prejudicado as técnicas utilizadas, os resultados obtidos possibilitaram a detecção e o estudo da patogenia viral dentro do modelo proposto. Adicionalmente, a hn RT-PCR foi capaz de detectar, de forma mais eficiente, a presença do vírus rábico em tecidos extraneurais, que resultaram negativos às demais técnicas, durante a fase de disseminação centrífuga do vírus rábico demonstrando ser possível a sua utilização no estudo da patogenia viral.

Concordamos, no entanto, com os autores que relatam que o hn RT-PCR não deve substituir atualmente a IFD (TRIMARCHI e BRIGGS, 1999; RUPPRECHT, 2002) em função do maior tempo para obtenção dos resultados, dos custos dos reagentes e dos equipamentos. Adicionalmente, deve-se levar em consideração a degradação do RNA viral decorrente de

Rnases, obrigando a cuidados para a realização do teste e a possibilidade de resultados falso-negativos nestas situações, contrariamente a IFD que detecta a presença do antígeno rábico independentemente de sua viabilidade (DEAN et al., 1996).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Vírus rábico, após a infecção experimental em camundongos, foi evidenciado em tecido nervoso e em tecidos extraneurais pelas reações de IFD, IC e hn RT-PCR.

A presença do antígeno rábico em órgãos e tecidos extraneurais foi demonstrada de forma mais eficiente pela hn RT-PCR.

A hn RT-PCR não demonstrou precocidade no diagnóstico da raiva em tecidos nervosos, dentro deste modelo estudado.

A substituição da IFD pela hn RT-PCR não se justifica em função de seu custo, tempo para obtenção dos resultados e fatores que interferem no teste.

A hn RT-PCR demonstrou ser uma técnica viável para aplicação no estudo da distribuição do vírus rábico, demonstrando a presença do vírus no sistema nervoso central, órgãos e tecidos extraneurais de forma bastante eficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ACHA, P.N.; SZYFRES, B.. Rabia. In:____ **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes ao hombre y los animales**. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud, 1986. p. 515-516.

ALKAMI QUICK GUIDE TM for PCR. A laboratory reference for the polimerase chain reaction. 1999. v. 1, 133p.

ALVES, L.M. **Patogenia do vírus rábico; amostras ERA e PV administradas por via oral em hamster (*M. auratus*)**. 2001. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ATANASIU, P. In:____BAER, G.M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 373-400.

BAER, G.M.; LENTZ, T.L. Rabies pathogenesis to the central nervous system. In:____BAER, G.M. **The natural history of rabies**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 105-132.

BAER, G.M.. Bovine paralytic rabies and rabies in the vampire bat. In:____BAER, G.M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 155-175, 387-454.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação- Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BINGHAM, J.; MERWE, M. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 101, p. 85-94, 2002.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Clínica veterinária**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991. 1263p.

BORDIGNON, J.; ZANETTI, C.R. Avanços no diagnóstico laboratorial da raiva no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2000. p. 33-34.

BOULGER, L.R.; PORTEFIELD, J. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, n. 52, p. 421-424, 1958.

BOURHY, H.; ROLLIN, P.E.; VINCENT, J.; SUREAU, P. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test virus isolation from tissue culture, enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, n. 3, p. 519-523, 1998.

BOURHY, H.; SUREAU, P.; TORDO, N. From rabies to rabies-related viruses. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, n. 23, p. 115-128, 1990.

CAMPBELL, J.B.; BARTON, L.D. Serodiagnosis of rabies. Antibody tests. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. **Rabies**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. cap. 10, p. 223-241.

CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. **Rabies**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. 221p.

CASALS, J.J. **Exptl. Med.**, n. 72, p. 445-451, 1940.

CHARLTON, K.M.; CASEY, G.A. Experimental rabies in skunks: Immunofluorescence light and electron microscopic studies. **Lab. Invest.**, Baltimore, n. 41, p. 36-44, 1979.

CHARLTON, K.M.; CASEY, G.A. Experimental rabies in skunks: Persistence of virus in denervated muscle at the inoculation. **Can. J. Comp. Med.**, Ottawa, n. 45, p. 357-362, 1981.

CHARLTON, K.M.; CASEY, G.A.; WEBSTER, W.A. **Can. J. Comp. Med.**, Ottawa, n. 48, p. 338-339, 1984.

CONSTANTINE, D.G. Rabies transmission by air in bat caves. **Public Health Serv.**, Washington, n. 1617, p. 51, 1967.

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y.; GACOINS, A.; CAROFF, C.; BOURHY, H. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 4, p. 1117-1121, 1998.

de ANGELIS CORTÊS G., V.; OLIVEIRA, M.C. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, n. 46, p. 131-134, 1979.

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

DELAGNEAU, J.F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Structure of the rabies virus: spatial relationship of the proteins G, M1, M2 and N. **Ann. Virol.**, Paris, n. 132, p. 473-493, 1981.

ERMINE, A.; LARZUL, D.; CECCALDI, P.E.; GUESDON, J.L.; TSIANG, H. Polymerase chain reaction amplification of rabies virus nucleic acids from total mouse brain RNA. **Mol. Cell Probes.**, London, n. 4, p. 189-191, nov., 1990.

FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; CHANDLER, F.W.; BAER, G.M. **Arch.Virol.**, Wien, n. 78, p. 37-47. 1983.

FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; BAER, G.M. Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 145, n. 5, p. 715-719, 1982.

FENNER, J.F.; GIBBS, E.P.J; MURPHY, F.A.; ROTT, R.; STUDDERT, M.J.; WRITE, D.O. **Veterinary virology**. 2.ed. California: Academic Press, 1993. 666 p.

FISCHMAN, H.R.; SCHAEFFER, M. Pathogenesis of experimental rabies as revealed by immunofluorescence. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, New York, n. 177, p. 78-79, 1971.

GOLDWASSER, R.A.; KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of rabies virus antigen in the salivary glands of rabid animal. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Duluth, n. 98, p. 219-223, 1958.

GOULD, R.A.; HYATT, A.D.; LUNT, R.; KAHENBELT, J.A; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S.D. A novel lyssavirus isolated from *Pteropid* bats in Australia. **Virus Res.**, Amsterdam, n. 54, p. 165-187, 1998.

GRAPHPAD SOFTWARE. **Graphpad InStat version 3.00 for windows 95**. San Diego, 1998.

GUERREIRO, M.; MAYR, A. **Virologia veterinária**. 2.ed. Porto Alegre: SULINA, 1981. 480p.

HAGAN, W.A.; BRUNER, D.W. The Virales. In:____**Microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8. ed. New York: Cornell University Press, 1988. p. 832-846.

HEATON, P.R.; JOHNSTONE, P.; MC ELHINNEY, L.M.; COWLEY, R.; O'SULLIVAN, E.; WHITBY, J.E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2762-2766, 1997.

HEATON, P.R.; MC ELHINNEY, L.M.; LOWINGS, J.P. Detection and identification of rabies and rabies related viruses using rapid-cycle PCR. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, n. 81, p. 63-69, 1999.

HOWARD, D.R. Rabies virus tropism in naturally infected skunks (*Mephitis mephitis*). **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 42, n. 12, p. 2187-2190, dec. 1981.

ITO, M.; ITOU, T.; SAKAE, T.; SANTOS, M.F.C.; ARAI, Y.T.; TAKASAKI, T.; KURAN, I.; ITO, F.H. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 63, n. 12, p. 1309-1313, dec. 2001.

IWASAKI, Y.; CLARK, H.F. Cell to cell transmission of virus in the central nervous system. Experimental rabies in the mouse. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 33, n. 4, p. 391-399, 1975.

JOGAI, S.; RADOTRA, B.D.; BANERJEE, A.K. Rabies viral antigen in extracranial organs a *post-mortem* study. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, Oxford, v. 28, p. 334-338, 2002.

JOHNSON, H.N. Rabies virus. In: LENNETE, E.H.; SCHMIDT, N.J. **Diagnosis procedures for viral and rickettsial diseases**. 3.ed. New York: American Public Health Association, 1979. p.356-380.

JOHNSON, R.T. Experimental rabies. Studies of cellular vulnerability and pathogenesis using fluorescent antibody staining. **J. Neuropathol. Exp. Neurobiol.**, Oxford, n. 24, p. 662-674, 1965.

KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIUWAMOKE, R.; TIRAWATNPONG, S.; PANPARICH, T.; HEMACHUDHA, T. Diagnosis of rabies by Polymerase Chain Reaction with nested primers. **J. Infect. Dis.**, Chicago, n. 167, p. 207-210, 1993.

KING, A.A.; TURNER, G.S. Rabies: a review. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v. 108, p. 1-39, 1993.

KAPLAN, M.N.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **La rabia, tecnicas de laboratorio**. 3.ed. Geneva: W.H.O., 1976. 389p.

KOPROWSKI, H. Prueba de inoculacion en ratón. In: KAPLAN, M.N.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **La rabia, tecnicas de laboratorio**. 3.ed. Geneva: W.H.O., 1976. p. 88-97.

KOPROWSKI, H. Visit to an ancient curse. **Sci. Am. Sci. Med.**, New York, v. 2, p. 48-55, may./jun. 1995.

KOTAIT, I.; TAKAOKA, N.; GONÇALVES, C.; PERES, N.F.; SOUZA, M.C.; TORRES JR, M.; PANACHÃO, M.R.I. Rabies among herbivores in a São Paulo state region. In: REUNION INTERNACIONAL SOBRE AVANCES EN LA INVESTIGACION Y CONTROL DE LA RABIA EN LAS AMERICAS, 9., 1998, México. **Anais...** México, 1998. p. 37.

KRISTENSSON, K. et al. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, Oxford, v. 22, p.179-187, 1996.

KULONEN, K.; BOLDINA, I. Differentiation of two rabies strain in Estonia with reference to recent finish isolates. **J. Wildl. Dis.**, Lawrence, v. 29, n. 2, p. 209-213, 1993.

KULONEN, K.; FEKADU, M.; WHITFIELD, S.; WARNER, C.K. An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival Carnoy-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **J. Vet. Med.**, v. 46, p.151-155, 1999.

LARGHI, O.P.; NEBEL, A.E.; LAZARO, L.; SAVY, V.L. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, n. 1, p. 243-245, 1975.

LORETU, K.; BLENDEN, D.C.; TORRES-ANJEL, M.J.; SATALOWICH, F.T. Morphologic appearance of inclusion bodies and their association with the antigenic composition of naturally occurring rabies viruses. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 26, n. 2, p. 283-286, feb. 1988.

MARTORELLI, L.F.A.; AGUIAR, E.A.C.; ALMEIDA, M.F.A.; DURIGON, E.L. Molecular diagnoses of isolated rabies virus in the state of São Paulo between 1989 and 1999. In: REUNION INTERNACIONAL SOBRE

AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN Y CONTROL DE LA RABIA EN LAS AMÉRICAS, 11., 2000, Lima. **Anais...**, Lima, 2000. p.25

MATSUMOTO, S.; KAWAI, A. Studies on the rabies virus replication in organized cultures of neural tissue. **Ann. Rep. Inst. Virus Res.**, n. 25, p. 41-42, 1982.

MCCOLL, K.A.; GOULD, A.R.; SELLECK, P.N.; HOOPER, P.T.; WESTBURY, H.A.; SMITH, J.S. Polymerase Chain Reaction and other laboratory techniques in the diagnosis of long incubation rabies in Australia. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v. 70, n. 3, p. 84-89, 1993.

MEGID. J.; CREMONINI, D.N.; LEOMIL, H. Distribution of rabies virus in infected mice, vaccinated and submitted to P. acnes as immunomodulator. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 237-248, jul. 2002.

MEREDITH, C.D.; PROSSOUW, A.P.; KOCH, H. van P. A unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. **S. Afr. Med. J.**, Cape Town, n. 45, p. 767-769, 1971.

MIYAMOTO, K.; MATSUMOTO, S. Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. **J. Exp. Med.**, New York, v. 125, n. 3, p. 447-456, mar. 1967.

MURPHY, F.A.; BAUER, S.P. Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. **Intervirology**, Baxl, n. 3, p. 256-268, 1974.

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.**, Baltimore, n. 28, p. 361-376, 1973a.

MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; WINN, W.C., BAUER, S.P. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. **Lab. Invest.**, Baltimore, n. 29, p. 1-16, 1973b.

MURPHY, F.A. Morphology and morphogenesis. In: BAER, G.M. **The natural history of rabies**. Boca raton: CRC Press, 1991. p. 33-36.

NADIN-DAVIS, S.A. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, n. 75, p. 1-8, 1998.

NEL, L.H.; BINGHAM, J.; JACOBS, J.A.; JAFTHA, J.B. A nucleotide-specific polymerase chain reaction assay to differentiate rabies virus biotypes in South Africa. **J. Vet. Res.**, n. 65, p. 297-303, 1998.

NILSSON, M.R.; NAGATA, C.A. Isolamento do vírus rábico do cérebro, glândulas salivares e interescapular, coração, pulmões e testículos de morcego *D. rotundus* no estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, São Paulo, n. 42, p. 183-187, 1975.

NILSSON, M.R.; SUGAY, W. Diagnóstico da raiva. Comparação entre a pesquisa de inclusões em esfregaços e a inoculação de camundongos. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, São Paulo, n. 33, p. 11-16, 1966a.

NILSSON, M.R.; SUGAY, W. O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, São Paulo, n. 33, p. 47-48, 1966b.

NOVA, A.V.; RENGELL, F.S.; HINRICHSEN, S.L. Raiva. In: VERONESI, R.; FOCACIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 479-488.

PITZSCHKE, H. Raiva. In: BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo : Roca, 1988. 380p.

PORTNÖI, D.; FAVRE, S.; SUREAU, P. **Rabies Info. Exch.**, p. 35-36. 1982.

PRINGLE, C.R. The order Mononegavirales. **Arch. Virol.**, Wien, v. 117, p.137-140, 1991.

RAIVA. DIAGNOSIS. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/Diagnosis/diagnosi.html>> Acesso em: 7 ago. 2000.

RUDD, R.J.; TRIMARCHI, C.V.; ABELSETH, M.K. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, n. 12, p. 590-593, 1980.

RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; HEMACHUDHA, T. Rabies reexamined: reviews. **Lancet Infect.Dis.**, London, v.2, p. 327-343, 2002. Disponível em: <<http://infection.thelancet.com>>. Acesso em: 20 jun. 2003.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies. **Mol. Cell Probes**, London, v. 5, p.229 - 240, 1991.

SCHNEIDER, L.G.; HAMANN, I. Pathogenesis of rabies in mice. III Centrifugal virus spread and virus generalization in the body. **Zentralbl. Bakteriol.**, Stuttgart, n. 212, p. 13-41, 1969b.

SCHNEIDER, L.G. Antigenic variants of rabies virus. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, Oxford, n. 5, p. 101-107, 1982.

SCHNEIDER, L.G. Spread of virus from the central nervous system. In: BAER, G.M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. p. 273-301.

SCHNEIDER, L.G. The corneal test: a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. **Zentralbl. Veterinarmed.**, Hamburg, n. 8, p. 24-31, 1969a.

SELLERS, T.F.; FELLOW, A.P.H.A. A new method for staining Negri bodies of rabies. **Am. J. Public Health**, Boston, v. 17, p. 1080-1081, 1927.

SILVA, R.A; SOUZA, A.M. Ocorrência do vírus da raiva em diferentes tecidos de cão na doença natural. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Rio de Janeiro, n. 3, p. 317-318, 1967.

SILVA, R.A; SOUZA, A.M.. Isolamento do vírus rábico de pulmão, coração, rins, bexiga e outros diferentes tecidos de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Rio de Janeiro, n. 7, p. 291-301, 1968.

SILVA, R.A. Evolução histórica da raiva. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Anais...**São Paulo, 2000.

SILVA, R.A.; SOUZA, A.M.; ANDRÉ, C.A.F. Ocorrência do vírus da raiva em pulmão, rins, bexiga e outros tecidos de gato doméstico naturalmente infectado. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Rio de Janeiro, n. 3, p. 361-364, 1968.

SILVA, R.A.; SOUZA, A.M.; LIMA, A.C. Isolamento de vírus rábico do rim, coração e cérebro de bovino na doença natural. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Rio de Janeiro, n. 2, p. 359-366, 1967.

SMITH, J.S.; YAGER, P.A.; ORCIARI, L.A. Tests of the test: quality control for fluorescrtnt antibody tests for rabies virus. In: ANNUAL RABIES IN THE AMERICAS MEETING, 10.,1999, San Diego. **Anais...Sandiego**, 1999. Session I - Diagnosis and Epidemiologic Surveillance. p.23.

SMITH, J.; McELHINNEY,L.M.; HEATON, P.R; BLACK, E.M. ; LOWINGS, J.P. Assessment of template quality by the incorporation of an internal control into a RT-PCR for the detection of rabies and rabies related viruses. **J.Virol. Methods**, Amsterdam, v. 84, p. 107-115, feb. 2000.

SOARES, R.M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S.M.; HEINEMANN, M.B.; CORTEZ, A.; ALVES, L.M.; MEYER, A.D; ITO, F.H.; RICHTZENHAIN, L.J. A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 109-111, jan. 2002.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSI, H. Structural proteins of rabies virus. **J. Virol.**, Washington, p. 241-249, 1971.

SUREAU, P. Les techniques rapides de diagnostic de laboratoire de la rage. **Arch. Inst. Pasteur Tunis.**, Tunísia, v. 63, n. 1, p. 183-197, mar. 1986.

TILLOTSON, J.R.; AXELROD, D.; LYMAN, D.O. Follow-up on rabies. **M.M.W.R. - Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, n. 26, p. 249-50, 1977.

TORDO, N.; POCH, O. Structure of rabies virus. In: CAMPBELL, J.B. e CHARLTON, K.M. (Eds.) **Rabies**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988, p. 25-45.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome; segmented homology with VSV. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, n. 14, p. 2671-2683, 1986.

TORDO, N.; SACRAMENTO, D.; BOURHY, H. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. In: MESLIN, F,-X; KAPLAN, M,M. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 157-174.

TRIMARCHI, C.V.; BRIGGS, D.J. The diagnosis of rabies. In: **Rabies: guidelines for medical professionals**. USA: Veterinary Learning Systems, 1999. p. 55-65.

TRIMARCHI, C.V. Rabies diagnosis and laboratory science. In: ANNUAL RABIES IN THE AMERICAS CONFERENCE, 8., 1997, Kingston. **Anais...Kingston**, 1997.

TRIMARCHI, C.V.; RUDD, R.J.; ABELSETH, M.K. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, n. 47, p. 777-780, 1986.

TSIANG, H.; DERER, M.; TAXI, J. An *in vivo* and *in vitro* study of rabies virus infection of the rat superior cervical ganglia. **Arch. Virol.**, Wien, v. 76, p. 231-243, 1983.

WEBSTER, L.T.; DAWSON, J.R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, v. 32, p. 570-573, 1935.

W.H.O. World Health Organization. Expert Committee on Rabies. **8th report**. Geneva, 1992. (WHO Technical Report Series, n. 824).

WHITBY, I.E.; HEATON, P.R.; WHITBY, H.E.; O'SULLIVAN, E.; JOHNSTONE, P. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 63-72, 1997.

WHITFIELD, S.G.; FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; NIZGODA, M.; WARNER, C.K.; MESSENGER, S.L. A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 95, p. 145-151, 2001.

WINKLER, W.G. Airbone rabies virus isolation. **Bull. Wildl. Dis. Assoc.**, Ames, n. 4, p. 37-40, 1968.

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

WINKLER, W.G.; SHADDOCK, J.S.; BOWMAN, C. **J. Wildl. Dis.**, Lawrence, n. 21, p. 297-298, 1985.