

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

Relatório de estágio curricular obrigatório em Prática Veterinária, realizado junto ao Instituto Pasteur e a Estação Quarentenária de Cananéia, assunto de interesse: Diagnóstico da Raiva em animais no Estado de São Paulo em agosto de 2023.

Vitória Maximiana Soares dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Estevam G. Lux Hoppe

Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Unesp, para graduação em Medicina Veterinária.

**Jaboticabal - S.P.
2º semestre 2023**

S237r Santos, Vitória Maximiana Sores dos
Relatório de estágio curricular obrigatório em Prática Veterinária, realizado junto ao Instituto Pasteur e a Estação Quarentenária de Cananéia, assunto de interesse: Diagnóstico da Raiva em animais no Estado de São Paulo em agosto de 2023. / Vitória Maximiana Sores dos Santos. -- Jaboticabal, 2021
41 p. : il., tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Prof. Dr. Estevam G. Lux Hoppe

1. Vírus da raiva. 2. Epidemiologia. 3. Zoonoses. I. Título.

unes



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL



CERTIFICADO

Certifico que o Relatório de Estágio Curricular em Prática Veterinária foi apresentado à Banca Examinadora e aprovado, conforme especificações abaixo

TÍTULO: Relatório de estágio curricular obrigatório em Prática Veterinária, realizado junto ao Instituto Pasteur e a Estação Quarentenária de Cananéia, assunto de interesse: Diagnóstico da Raiva em animais no Estado de São Paulo em agosto de 2023.

ACADÊMICA: Vitória Maximiana Soares dos Santos

CURSO: Medicina Veterinária

ORIENTADOR: Prof Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

SUPERVISORES: Samira Maria Achkar Pinheiro
Sandriana dos Ramos Silva
Mateus Carvalho Silva Araújo

LOCAIS: Instituto Pasteur
Estação Quarentenária de Cananéia

01 de agosto a 08 de dezembro Semestre: 10º Ano: 2023

Jaboticabal, 20 de dezembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Presidente Prof. Dr. Estevam G. Lux Hoppe

Membro Wilson Júnior Oliveira

Membro Patrícia Parreira Perin

Profª. Drª. Karina Paes Burger

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais por todo o suporte e amor que fortaleceram meu percurso acadêmico e meu desenvolvimento pessoal. Sou eternamente grata por apoiarem minhas decisões e embarcarem nessa jornada comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Estevam G. Lux Hoppe, agradeço pela atenção, confiança, ótima orientação e paciência ao ter acompanhado minha trajetória na graduação e acreditado no meu potencial desde o início.

À banca avaliadora, Me. Patrícia Parreira Perin e Dr. Wilson J. Oliveira, pela disponibilidade, análise e feedbacks que enriqueceram meu trabalho.

Aos supervisores de estágio, que proporcionaram uma grande experiência prática que foi muito enriquecedora para minha formação profissional e pessoal e essencial para elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos de Votuporanga e Jaboticabal, sou grata pela amizade que tornou esse período mais leve. E também, pelos momentos felizes e divertidos que são lembranças que ficarão eternamente em minha memória.

Em especial, agradeço à república Tua Ksa, por ser meu lar e segunda família, me acolherem nos momentos bons e ruins, pela amizade e troca de experiências e proporcionarem uma ótima experiência universitária.

Às minhas amigas, Ísis, Giovanna e Victória, por estarem comigo desde de o começo e por compartilharem os desafios e as risadas destes 5 anos.

Ao meu amado namorado, Gustavo, pelo apoio emocional e por sempre acreditar no meu potencial nos momentos desafiadores. Agradeço por ser uma fonte constante de inspiração e suporte.

Agradeço a cada um de vocês que participaram da minha jornada na graduação e que tornaram ela tão especial. Muito obrigada!

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
I RELATÓRIO DE ESTÁGIO	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO	2
2.1 Instituto Pasteur (IP)	2
2.2 Estação Quarentenária de Cananéia (EQC)	3
3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	5
3.1 Instituto Pasteur	5
3.1.1 Laboratório de virologia	5
3.1.1.1 Preparo e processamento de amostras	5
3.1.1.2 Imunofluorescência Direta (IFD)	9
3.1.1.3 Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC)	11
3.1.1.4 Isolamento Viral em Camundongos (IVC)	12
3.1.1.5 Técnicas biomoleculares	13
3.1.1.6 Identificação de morcegos	14
3.1.2 Laboratório de imunologia	15
3.1.2.1 Preparo e processamento de amostras	15
3.1.2.2 Cultura celular	15
3.1.2.3 Simplified Fluorescence Inhibition Microtest (SFIMT)	16
3.1.2.4 Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)	17
3.2 Estação Quarentenária de Cananéia (EQC)	18
3.2.1 Biossegurança	18
3.2.2 Quarentenas de suínos	21
3.2.3 Quarentenas de aves	23
4 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
6 REFERÊNCIAS	25
II- ASSUNTO DE INTERESSE	26
Diagnóstico da raiva em animais no estado de São Paulo em agosto de 2023	26
1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Métodos de diagnóstico	31
3.2 Coleta de dados	31
3.3 Caracterização espacial dos dados coletados	31
3.4 Análise estatística	31

4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	37
7 REFERÊNCIAS	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAR	Conjugado antirrábico
CC	Cultivo celular
CSB	Cabine de Segurança Biológica
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EQC	Estação Quarentenária de Cananéia
GAL	Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial
GTA	Guia de Trânsito Animal
IFD	Imunofluorescência Direta
IP	Instituto Pasteur
IVC	Isolamento Viral em Camundongos
IVCC	Isolamento Viral em Cultivo Celular
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM	Meio essencial mínimo de Eagle
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMSA	Organização Mundial da Saúde Animal
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	
PV	Vírus padrão
RFFIT	<i>Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test</i>
RT-PCR	
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SFIMT	<i>Simplified Fluorescence Inhibition Microtest</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPH	Soro padrão humano
TGE	Gastroenterite Transmissível dos suínos
TV	Titulação do vírus

I RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os esforços para controle e vigilância da raiva se tornaram o primeiro exemplo de integração de Saúde Única, quando o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva foi criado em 1973. Esse programa é resultado de um acordo entre Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura, Central de Medicamentos (CEME, órgão governamental para aquisição de vacinas e medicamentos) e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (São Paulo, 2008). O diagnóstico da raiva em animais e humanos é uma peça-chave do programa, pois a partir dele é possível combater focos e entender a distribuição da doença (Schneider e al., 2023).

Somado a isso, prevenir a introdução de doenças exóticas e de controle oficial é fundamental para a sanidade e economia de todos os países. No Brasil, a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é responsável pela prevenção e o combate de doenças de animais que possam ameaçar a preservação do patrimônio pecuário nacional. Dentre as medidas de prevenção de introdução de patógenos, destaca-se o controle das importações de animais. A realização de quarentenas e de testes diagnósticos em animais vivos constitui parte importante da maioria dos procedimentos de importação. Tais procedimentos são sempre feitos em estações quarentenárias oficiais ou previamente credenciadas pelo MAPA (Governo Federal, 2017).

Tendo em vista o interesse da aluna Vitória Maximiana Soares dos Santos por Zoonoses e Saúde Pública, este relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o período de estágio curricular obrigatório, realizado no Instituto Pasteur de 1 de agosto a 29 de setembro de 2023 e na Estação Quarentenária de Cananéia de 2 de outubro a 8 de dezembro de 2023, totalizando 656 horas. A acadêmica foi orientada pelo Prof. Dr. Estevam G. Lux Hoppe, docente do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) campus Jaboticabal. O período de estágio no Instituto Pasteur foi supervisionado por Samira Maria Achkar Pinheiro e Sandriana dos Ramos Silva e, na Estação Quarentenária de Cananéia, pelo Médico Veterinário Matheus Carvalho Silva Araújo.

2 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO

2.1 Instituto Pasteur (IP)

O Instituto Pasteur (IP) de São Paulo foi criado em 1903, como uma instituição privada, seguindo os ideais de Louis Pasteur. Em 1916, foi doado ao Governo Estadual, passando a ser uma instituição pública. Após a estatização do IP foi firmado o Decreto-Lei nº 1.525, de 13 de agosto de 1916, tornando dever do governo do Estado a vacinação e controle da raiva (São Paulo, 2008). O prédio do Instituto, localizado na Avenida Paulista (Figura 1), foi inaugurado em 18 de fevereiro de 1904.



Figura 1. Fachada do prédio do Instituto Pasteur localizado na Avenida Paulista, São Paulo, SP. (Fonte: arquivo pessoal).

No início do século XX, a raiva canina ocorria sem controle devido ao acelerado desenvolvimento industrial e êxodo rural, o que resultava em muitos óbitos. Com isso, a fundação do Instituto Pasteur foi de grande importância para a população brasileira da época. No início da sua história, o Instituto tinha três principais áreas de atuação: a produção de imunobiológicos, como a vacina contra a raiva e o soro antitetânico; o ensino da bacteriologia, que incluía um curso de inspeção de alimentos; e a pesquisa na área da saúde pública, com foco em doenças tropicais (Teixeira, 1995). O IP também contava com um canil, onde os animais suspeitos para raiva eram observados.

Ao final de 1905, após diversas tentativas de contratar um cientista estrangeiro e de renome para dirigir a instituição, o médico italiano Antônio Carini aceitou o convite e foi para o Instituto Pasteur. Em 1908, ele levantou de a hipótese da raiva dos herbívoros ser causada por morcego hematófago, após investigar um surto da doença em Santa Catarina. Esta hipótese foi confirmada após Antônio analisar o sistema nervoso central de animais mortos mordidos pelo morcego e encontrar corpúsculos de Negri no citoplasma das células nervosas (São Paulo, 2008).

Atualmente, o Instituto Pasteur é referência nacional no diagnóstico laboratorial da Raiva e centro colaborador da Organização Pan-Americana (OPAS) da Organização Mundial da Saúde (OMS). O IP conta com o setor de virologia, com laboratórios de virologia, cultivo celular, análises biomoleculares, imunohistoquímicas e com um biotério. Também conta com o setor de Imunologia, responsável por fazer a titulação de anticorpos pós vacina antirrábica, produção de insumos para outros laboratórios e diagnóstico em humanos.

2.2 Estação Quarentenária de Cananéia (EQC)

A Estação Quarentenária de Cananéia (EQC) foi criada pelo Decreto Presidencial nº 69.522 em 1971, com a finalidade da realização de quarentenas de animais para exportação. Durante muito tempo ela cumpriu apenas esse objetivo, mas, posteriormente, passou também a realizar quarentenas de importação. A instituição também foi campo de testes para a realização de ensaios biológicos,

como testes de vacinas e passagem de vírus rábico. Em 2002, a Estação foi inativada e, apenas em 2005, um novo projeto de reestruturação foi elaborado. Após reformas e melhorias, foram reativadas as quarentenas a partir de 2009. Nessa nova concepção, a EQC foi preparada para alojar outras espécies animais, tais como suínos e aves ornamentais importados, os quais são mantidos até os dias de hoje (Governo Federal, 2017).

A EQC encontra-se em Cananéia, litoral sul do estado de São Paulo, a 261 km da capital, pela Rodovia BR 116 – Regis Bittencourt, no sentido São Paulo-Curitiba. Esta foi construída em um ponto estratégico, em uma área isolada no sul da Ilha, aproximadamente 6 km da cidade de Cananéia (Figura 2). As edificações existentes somam uma área construída de cerca de 6,5 mil metros quadrados, dividida entre prédios administrativos, alojamentos, oficinas, estábulos, galpões, lavanderia, estação de tratamento de efluentes e outros (Figura 3) (Governo Federal, 2017).

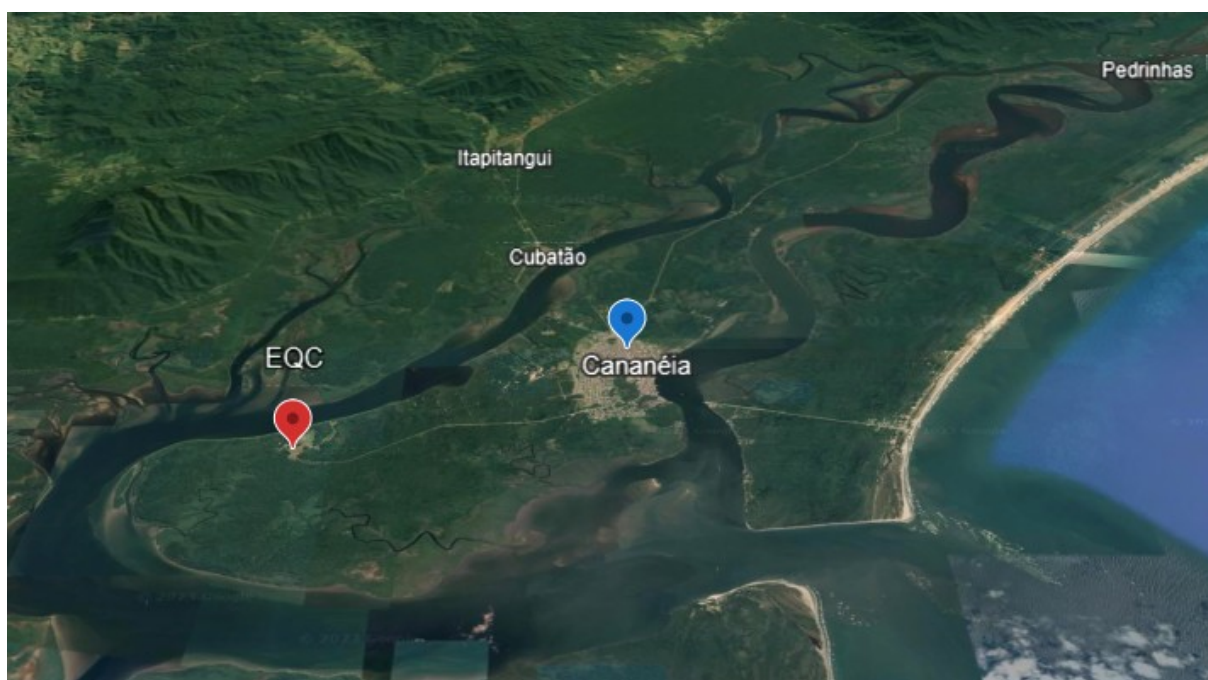


Figura 2. Imagem de satélite da localização Estação Quarentenária (ponto vermelho) na cidade de Cananéia (ponto azul), São Paulo (Google Earth, 2023).



Figura 3: Vista aérea da Estação Quarentenária de Cananéia, SP. (Fonte: www.gov.br)

A EQC conta com 4 unidades para quarentena de suínos com capacidade de 75 kg/m², dividida em baias e gaiolas individuais. As aves possuem 1 unidade, sendo esta dividida em 4 boxes, e sua capacidade varia de acordo com tamanho da espécie e comportamento.

3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

3.1 Instituto Pasteur

3.1.1 Laboratório de virologia

3.1.1.1 Preparo e processamento de amostras

A triagem de amostras de animais suspeitos é feita na área de recepção, onde é verificado se o material enviado corresponde ao informado, registra-se no Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) caso o solicitante não tenha registrado. As amostras são encaminhadas para o Laboratório de Virologia com seu material para processamento, que são etiquetas com o número do GAL da amostra que a acompanham durante todos os processos (Figura 4). Em casos de ausência de profissionais capacitados para fazer a coleta do sistema nervoso central (SNC) no

local de envio, o animal é enviado inteiro e a coleta é feita na triagem e a amostra é colocada em uma placa de Petri descartável (Figura 5).



Figura 4. Etiquetas do sistema GAL de amostra recebida no Instituto Pasteur. (Fonte: arquivo pessoal)

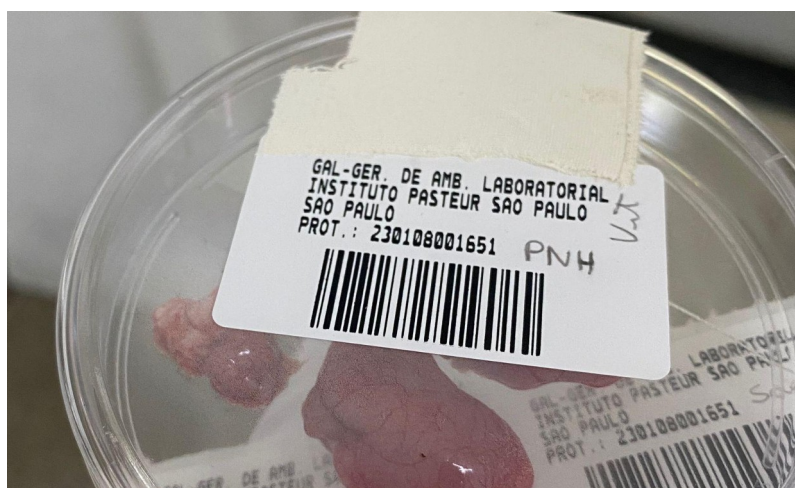


Figura 5. Amostra de SNC de primata não humano (PNH) coletada no Instituto Pasteur. (Fonte: arquivo pessoal)

O processamento é feito em Cabine de Segurança Biológica (CSB) no Laboratório de Virologia e segue as normas de biossegurança laboratorial. São confeccionadas lâminas para Imunofluorescência Direta e suspensões que são encaminhadas aos demais laboratórios.

As lâminas são feitas a partir de fragmentos de diferentes porções do SNC e com eles são feitos os *imprints* em lâminas específicas para a técnica de IFD. É importante usar diferentes fragmentos, pois o vírus da raiva não se multiplica por igual nas estruturas do SNC, principalmente em herbívoros. O *imprint* consiste em encostar ligeiramente o fragmento na lâmina, nos quadrantes superior e inferior, e

secar com papel filtro para que o tapete celular não fique muito espesso. A quantidade de lâminas varia de acordo com a espécie e se o animal é ou não agressor. Posteriormente, as lâminas são colocadas em coplins e submersas em Acetona a 80% por no mínimo 45 minutos a -20°C para fixar o *imprint* na superfície.

O fragmento usado para o *imprint* é colocado em um gral de porcelana e, com auxílio de um pistilo, é feito um macerado. Depois, adiciona-se o diluente para que a suspensão fique na proporção 1:5 (20%). Aproximadamente 0,75 g de amostra são diluídos em 3 ml, exceto para morcegos, que contém menos material encefálico, então o volume de diluente varia entre 1,5 e 2 ml de acordo com a quantidade de amostra. O diluente é composto de tampão fosfato-salino (PBS) e antimicrobiano. O material resultante é transferido para um tubo de ensaio e colocado na geladeira por 30 minutos. Depois os tubos são colocados em uma centrífuga por 30 minutos a 3000 r.p.m. e o sobrenadante é armazenado em microtubos. Amostras sem material de sistema nervoso central são impossibilitadas de serem processadas (Figura 6) e as amostras em estado elevado de decomposição são encaminhadas para ensaios biomoleculares. O fluxograma de encaminhamento de amostras está apresentado na Figura 7.



Figura 6. Morcego recebido no Instituto Pasteur. O processamento para estudo de raiva foi impossibilitado por decomposição avançada da carcaça e ausência de SNC (Fonte: arquivo pessoal).

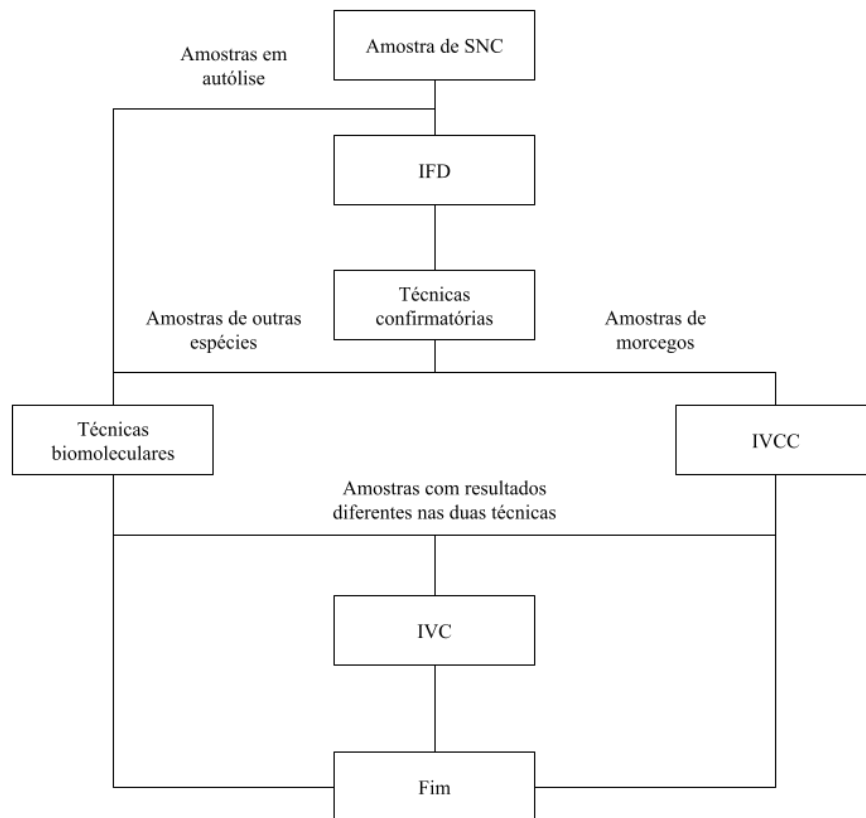


Figura 7. Fluxograma de encaminhamento de amostras no laboratório de Virologia. (Fonte: arquivo pessoal)

3.1.1.2 Imunofluorescência Direta (IFD)

As etapas da técnica de Imunofluorescência Direta estão esquematizadas na Figura 8. As lâminas para IFD são feitas em duplicatas e as melhores são selecionadas para o teste. O conjugado antirrábico (CAR) é diluído de acordo com o título de uso do lote, estabelecido antes da utilização. Ao iniciar uma reação deve-se preparar uma solução de CAR e *Challenge Virus Standard* (CVS) e separadamente uma solução de CAR e PBS.

Em cada lâmina adiciona-se 25 µl da solução de CAR e PBS, e nos quadrantes inferiores 25µl da solução de CAR e CVS, cobrindo todo o *imprint*. Em seguida, as lâminas são colocadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C.

Em cada bateria de lâminas são usados dois controles positivos e um negativo para avaliar a reação. Posteriormente, é feita a lavagem por imersão em PBS duas vezes por 05 minutos e depois em água destilada também em duas vezes por 05 minutos, com subsequente secagem em estufa.

Depois de secas, adiciona-se uma gota de glicerina e lamínula para que seja feita a leitura. A leitura é feita em microscópio de fluorescência no aumento de 400 vezes. Uma amostra é considerada positiva quando na lâmina de IFD são identificados focos de fluorescência compatíveis e corpúsculos de negri. A figura 8 apresenta uma amostra positiva e a figura 9 apresenta uma amostra negativa.

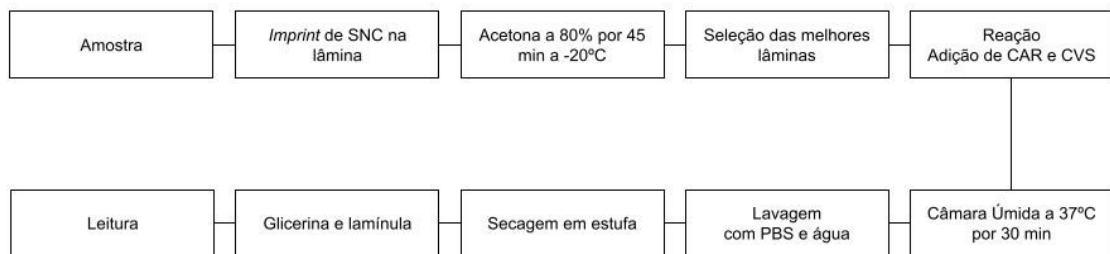


Figura 8. Sequência de etapas da técnica de Imunofluorescência Direta. (Fonte: arquivo pessoal)

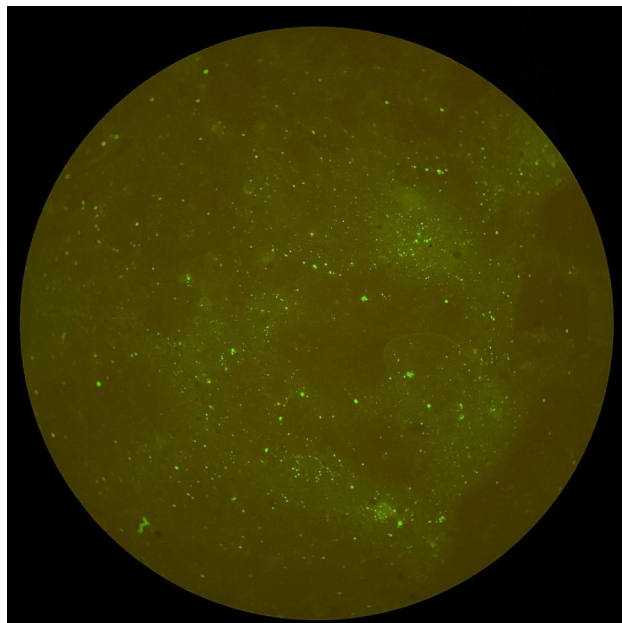


Figura 9. Lâmina de amostra positiva na técnica de Imunofluorescência Direta para o vírus rábico, aumento: 400x (Fonte: arquivo pessoal).

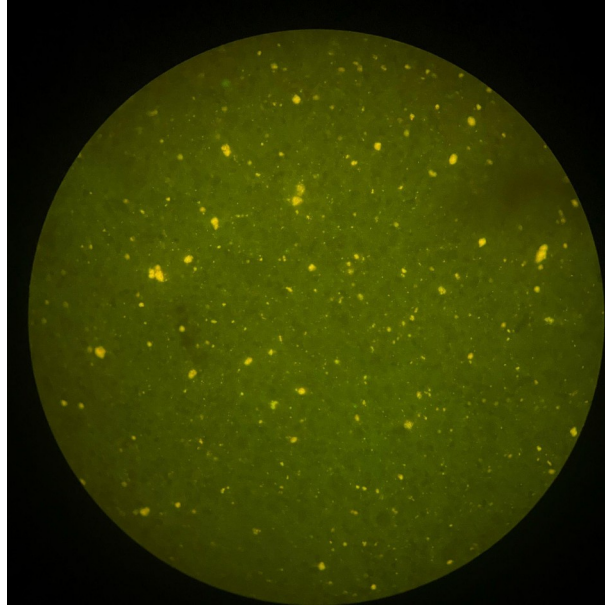


Figura 10. Lâmina de amostra negativa na técnica de Imunofluorescência Direta para o vírus rábico, aumento: 400x (Fonte: arquivo pessoal).

3.1.1.3 Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC)

A técnica de IVCC é utilizada como técnica confirmatória da IFD. As células utilizadas para o IVCC são neuroblastoma 2A de camundongos. As amostras positivas são encaminhadas para o isolamento viral em camundongos (IVC) para servirem de banco de amostras.

São utilizadas placas de 96 poços, cada placa deve conter controle negativo, positivo, CVS e amostra em triplicata. Todo o procedimento deve ser feito sobre gelo e dentro da CSB (Figura 11). Em cada poço, adiciona-se 160 μ l de meio, sendo ele composto por meio essencial mínimo de Eagle (MEM), aminoácidos e antimicrobianos na proporção de 1:2:2, e 40 μ l de amostra ou controle positivo e negativo. Posteriormente, a placa deve ser colocada de 72 a 96 h em estufa a 37°C e após esse período retira-se o sobrenadante e são feitos procedimentos semelhantes a IFD para visualização em microscópio invertido de fluorescência. Da mesma maneira, as amostras são consideradas positivas se apresentam focos de fluorescência e negativas se não apresentarem.

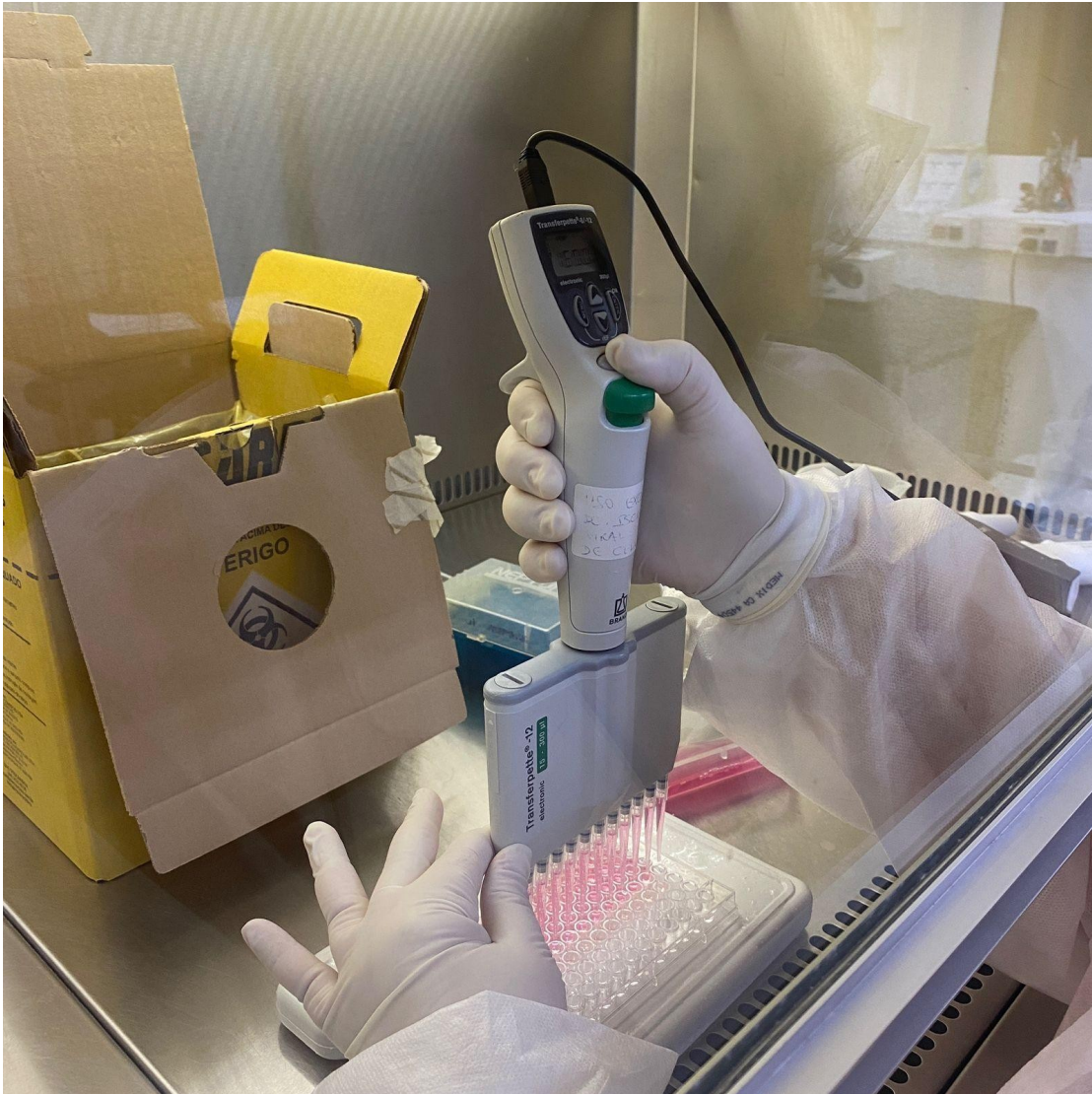


Figura 11. Isolamento Viral em Cultivo Celular sendo feito dentro de uma cabine de segurança biológica e sobre gelo. (Fonte: Arquivo Pessoal)

3.1.1.4 Isolamento Viral em Camundongos (IVC)

O isolamento viral em camundongos utiliza animais da linhagem Wess Webster e duas salas, uma para criação (biotério) e outra onde ficam os animais inoculados por amostras (infectório). Na sala de criação as caixas dos animais possuem um circuito de ar com ventilação de pressão positiva e no infectório a pressão é negativa, para segurança do colaborador. No biotério, as caixas são mantidas com um casal e seus filhotes até 21 dias que é quando ocorre o desmame.

O IVC consiste em inocular 30 μ l das suspensões de amostras no cérebro de cinco camundongos, previamente sedados com medicação pré-anestésica (MPA) e anestesiados com isoflurano. Depois disso, os animais são colocados em caixas ligadas ao sistema de ventilação e observados por até 30 dias. As amostras positivas geram sinais clínicos nos camundongos como emagrecimento, paralisia de membros, agitação, pelos eriçados, dificuldade de locomoção e sinais neurológicos. Após identificados os sinais clínicos característicos, os animais são eutanasiados. Após 30 dias de observação, se os animais não apresentaram sintomatologia, eles são eutanasiados. Ao identificar sinais clínicos a amostra é considerada positiva e se os animais não tiverem sinais a amostra é considerada negativa.

3.1.1.5 Técnicas biomoleculares

São encaminhadas para as técnicas biomoleculares: amostras para confirmação (exceto morcegos), amostras para tipificação do vírus, amostras em autólise ou com pouco material de SNC, amostras de herbívoros e amostras que deram resultados diferentes em duas técnicas. Atualmente, as amostras são encaminhadas para reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real, com exceção das amostras para tipificação ou em autólise, que passam pela RT-PCR.

A extração de RNA é feita dentro da CSB. Após retirar o plástico e o alumínio que veda as placas, as amostras devem ser bem homogeneizadas com auxílio de vórtex ou ressuspendidas com o auxílio de pipeta antes de serem transferidas para a placa de extração. Posteriormente, adiciona-se 300 μ l de cada amostra nos poços das colunas 1 e 7. As amostras encaminhadas diretamente para extração, devem ser maceradas e seccionadas e depois esse material é colocado no orifício correspondente. O controle positivo (CVS) e negativo (água livre de RNA) devem ser colocados em seus poços já nesta etapa. Depois, pipeta-se 10 μ l de proteinase K (20 mg/ml) nos poços das colunas 1 e 7 e aguarda 30 minutos.

No extrator automático Extracta 32 devem ser colocadas duas tiras plásticas, para evitar contaminação do equipamento, e posiciona-se as placas dentro do extrator. Após isso, é executado o protocolo de extração no aparelho e ao fim do procedimento, as amostras purificadas encontram-se nas colunas 6 e 12 da placa. O

conteúdo de cada poço dessas colunas é transferido para um microtubo. Os produtos da extração são mantidos a -20°C até o seu processamento. A sequência de procedimentos está demonstrada na Figura 12.

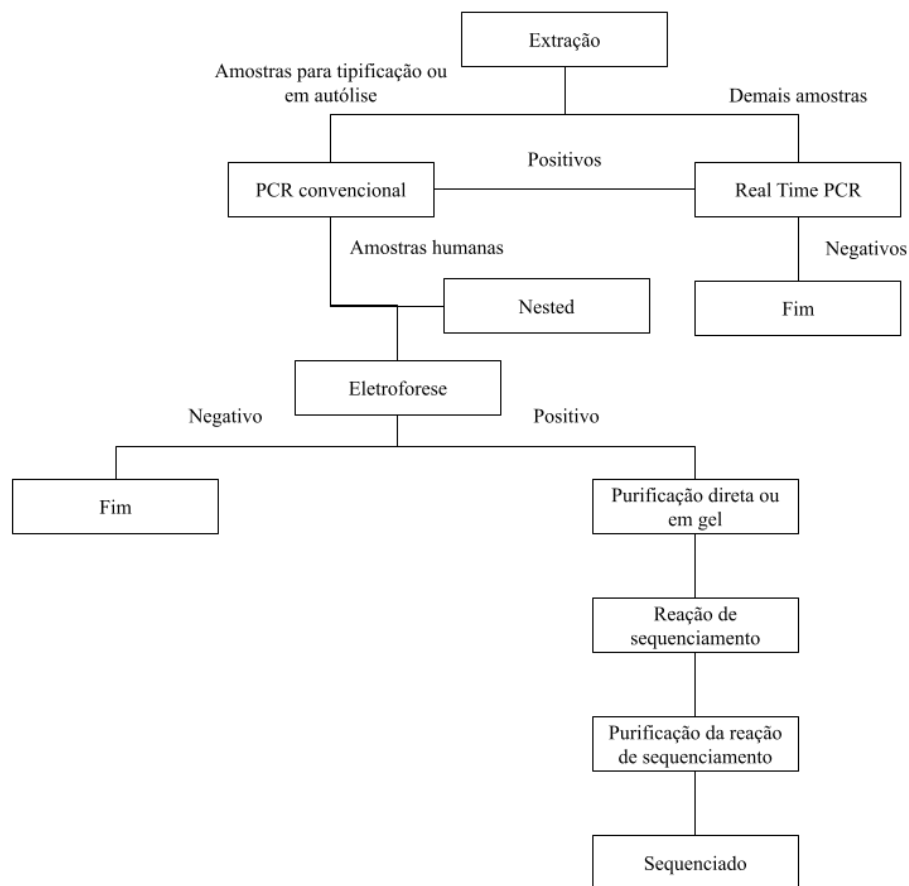


Figura 12. Fluxograma de procedimentos das técnicas biomoleculares. (Fonte: arquivo pessoal)

3.1.1.6 Identificação de morcegos

Os morcegos são armazenados a -20°C e se forem positivos para o vírus da raiva são submetidos à identificação morfológica e morfométrica de espécie. Esta é feita com o uso de Chaves de identificação de Vizzoto e Taddei (1973) adaptada.

3.1.2 Laboratório de imunologia

3.1.2.1 Preparo e processamento de amostras

As amostras de pacientes para titulação de anticorpos pós vacina antirrábica ou pacientes suspeitos para raiva chegam com cadastro no GAL. Na triagem elas são conferidas e é preparado o material para processamento, ou seja, etiquetas que acompanham a amostra, identificando-a.

Os soros recebidos são transferidos para microtubos e colocados em banho-maria por 30 minutos à 57°C para inativação das proteínas do sistema complemento. Estas podem auxiliar na neutralização e assim atrapalhar a determinação de título de anticorpos neutralizantes presentes na amostra. Amostras hemolisadas ou lipêmicas são identificadas e se essas alterações atrapalharem o resultado da técnica é solicitada a repetição da coleta. Amostras de líquido não passam pela inativação.

3.1.2.2 Cultura celular

As células utilizadas para as técnicas de *Simplified Fluorescence Inhibition Microtest* (SFIMT) e *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* (RFFIT) são da linhagem BHK-21, que são fibroblastos de camundongos. O meio para cultura celular é feito com MEM, 10% de soro fetal bovino e antimicrobianos. As células são armazenadas em frascos para cultivo celular em estufa a 37°C com CO₂ a 5%.

Os frascos são mantidos na horizontal e assim as células multiplicam-se e aderem à superfície dele em 2 a 3 dias. A superfície dos frascos tem área conhecida, sendo assim é possível estimar o número de células presente no frasco. Para utilização nos testes é necessário ressuspender as células que estão aderidas para que assim sejam adicionadas na placa de 96 poços. A ressuspensão consiste em descartar o meio de cultura, lavar o frasco com PBS, e adicionar tripsina por 30 segundos para desprender as células da parede do frasco. A seguir, a tripsina é descartada, o MEM é adicionado e homogeniza-se a solução até que não haja

agregados de células, o que é verificado em um microscópio invertido. A quantidade de PBS, tripsina e MEM depende do tamanho do frasco a ser ressuscitado e a escolha do tamanho do frasco deve ser feita com base no volume de células que será utilizada para a realização da técnica.

Para congelamento as células são ressuscitadas e é adicionado no frasco de cultura celular um meio com Dimetilsulfóxido DMSO (crioprotetor), MEM, soro fetal bovino e tripsina. Os volumes dependem do tamanho do frasco. Depois de homogeneizado, o frasco deve ser mantido por 2 horas à -20°C, depois à -80°C por no mínimo 24 horas e no máximo 30 dias. Após esse processo pode ser armazenado em nitrogênio líquido.

3.1.2.3 Simplified Fluorescence Inhibition Microtest (SFIMT)

A técnica de SFIMT é utilizada para a detecção de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva pós vacinação. O protocolo vacinal deve ser feito em pessoas com risco de infecção, como médicos veterinários, trabalhadores rurais, biólogos e outros. Após a imunização, o indivíduo deve fazer a titulação de anticorpos a cada 06 meses ou 1 ano.

A primeira etapa do teste de SFIMT consiste no preparo das amostras. Dentro da CSB, as placas são identificadas, os soros problema e os controles são organizados conforme a sequência do protocolo. Depois, adiciona-se 20 µl de soro padrão humano (SPH), soros problema, controle positivo humano e controle negativo humano na coluna 1 e 7 seguindo a sequência do protocolo. O MEM é acrescentado no volume de 180 µl nas colunas com amostra e nos demais poços adiciona-se 100 µl. Posteriormente, são feitas seis diluições seriadas e os 100 µl finais são desprezados. É importante homogeneizar os poços em todas as etapas.

Na técnica de SFIMT é usado o vírus padrão (PV) que deve ser armazenado a -80 °C. O vírus é diluído conforme a titulação de trabalho do lote e sempre deve ser trabalhado sob gelo. Adiciona-se 50 µl de vírus em todos os orifícios, exceto nos 6 últimos poços, sendo quatro para titulação do vírus (TV) e os dois últimos para análise do crescimento celular (CC). Nos poços de TV adiciona-se 50 µl de MEM e 100 µl do vírus no primeiro poço, depois é feita uma diluição seriada com 50 µl até o

quarto orifício e despreza-se os 50 µl finais. Em seguida, levar as placas para neutralização em estufa por 1h a 37°C com CO₂ a 5%. Após a incubação, as células devem ser adicionadas e para isso devem ser ressuspensas, sendo usado 5 ml por placa no cálculo do volume necessário. 50 µl de células previamente ressuspensas em cada poço e nos dois últimos poços de CC são adicionados, além de 50 µl, 150 µl de MEM. Por fim, incubam-se as placas por 24 horas em estufa a 37°C com CO₂ a 5%.

Na segunda etapa, o primeiro passo é fixar as células na placa. Para isso, aspira-se o sobrenadante; as placas são colocadas sobre o gelo com camada fina de água e adiciona-se 150 µl de acetona 80% gelada por 15 minutos. A acetona é então descartada e as placas são secas com ar quente. Após secas, as placas são coradas com solução de 40 µl de CAR diluído em Azul de Evans na diluição de trabalho do lote e incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, são feitas três lavagens com PBS e três lavagens com água. As placas são secas novamente para adicionar 50 µl de glicerina a 10% em cada poço e por fim a leitura é realizada em microscópio de fluorescência no aumento de 100 vezes.

O resultado é a diluição na qual ocorre 50% de fluorescência nas células daquele poço. Se 50% de fluorescência aparenta estar entre duas diluições, por exemplo entre a diluição 3 e 4, o resultado é $\frac{3}{4}$. A leitura é feita por duas pessoas e o resultado é a menor diluição entre elas. O cálculo do resultado é feito por meio de uma comparação entre o SPH e o soro problema.

3.1.2.4 Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)

A técnica de RFFIT pode ser utilizada para detecção de anticorpos neutralizantes assim como o SFIMT, porém por ser mais complexa sua leitura, na rotina laboratorial é utilizada a técnica de SFIMT. Humanos com suspeita de raiva devem enviar amostras de líquido e soro sanguíneo e com a técnica de RFFIT é possível fazer o diagnóstico delas.

Os procedimentos da técnica de RFFIT e SFIMT são semelhantes, porém na primeira etapa da RFFIT utiliza-se CVS em vez de PV; são 25 µl de amostra em cada poço, 37,5 µl de meio na primeira coluna e a diluição seriada é feita com 12,5

µl; a placa deve ser mantida por 90 minutos para neutralização; usa-se 100 µl de suspensão celular e a incubação deve ser de 20 horas em estufa. Na segunda etapa, a diferença é o volume utilizado de glicerina, sendo 40 µl de glicerina para leitura. Na terceira etapa, a leitura é feita no aumento de 200 vezes e observam-se 18 campos em cada orifício da placa, com isso, quantifica-se os campos com focos fluorescentes de cada poço. Os títulos são feitos de acordo com Reed-Muench Spearman-Karber por comparação com o SPH e o cálculo dos resultados é feito no Programa Karber.

3.2 Estação Quarentenária de Cananéia (EQC)

A Estação Quarentenária de Cananéia é responsável por quarentenar suínos e aves ornamentais importadas de interesse comercial. Com isso, a EQC é uma barreira sanitária do país, tendo como função impedir a entrada de doenças exóticas e de controle oficial. Em casos excepcionais, os importadores podem fazer quarentenas em quarentenários particulares, se permitido pelo Departamento de Saúde Animal.

3.2.1 Biossegurança

A Estação Quarentenária é dividida em 04 áreas. A área 1 é do primeiro portão até a guarita da segurança, a área 2 é a partir da guarita e inclui o prédio administrativo, alojamentos, refeitórios e mais guaritas de segurança, a área 3 conta com a lavanderia, fumigador e vestiários para a área 4, a área 4 é onde ficam as unidades dos animais quarentenados. A área 1 é de acesso restrito à pessoas autorizadas, a área 2 é de acesso restrito e registrado; a entrada de pessoas e veículos é controlada pela equipe de segurança contratada, sendo necessário o envio de um formulário de entrada para permissão de acesso. A área 3 é de acesso mais restrito e registrado. As pessoas entram na área 3 para ter acesso à área 4, então não é feito um novo registro.

A entrada na área 2 é pela guarita da segurança, onde há um pedilúvio para desinfecção das rodas dos carros. Para a entrada na área 3 é necessário entrar pelos vestiários, tomar um banho de pelo menos 3 minutos, lavar o nariz e vestir roupa íntima descartável, macacões e botas disponibilizados e limpos pela EQC, sendo que cada unidade possui uma cor de macacão específica. Após entrar na área 3, as pessoas caminham até a área 4, fazem a lavagem de suas botas e passam pelo pedilúvio (Figura 13), repetindo os processos antes de entrar nas unidades. A entrada das unidades se dá pelos vestiários, onde devem deixar a roupa da área 3, tomar banho novamente e depois vestir as roupas e botas disponíveis. O fluxo é contínuo e sem retorno, ou seja, depois de tomar banho encaminha-se para o próximo cômodo e não deve ter acesso às roupas anteriores. Ao sair da unidade todo o procedimento deve ser repetido. Dentro das unidades dos suínos, existem lavanderias onde são lavadas as roupas usadas naquela unidade, depois elas seguem para a lavanderia da área 3, onde são autoclavadas. Na unidade de quarentena de aves, os macacões usados são descartáveis.



Figura 13. Passagem pelo pedilúvio. (Fonte: arquivo pessoal).

Os animais entram diretamente para a área 4, por um portão de acesso com arcolúvio com aspersores de desinfetante nos veículos. Os equipamentos utilizados na área 4 devem passar na entrada e saída pelo fumigador para limpeza e desinfecção.

3.2.2 Quarentenas de suínos

A quarentena de suínos é determinada pelo Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006. A EQC conta com 4 unidades de suínos, com capacidade de 75 Kg/m², sendo que uma delas, a unidade I, não possui filtro e é usada como unidade emergencial, por questões de biossegurança. As unidades possuem baias (Figura 14) e gaiolas, onde os animais são agrupados por peso, sempre deixando uma ou duas baias para enfermaria e observação de animais com sinais de apatia, claudicação, entre outros. Além disso, a administração de anti-inflamatórios e outros fármacos deve ser comedida para não impedir possíveis sinais clínicos



Figura 14. Suínos da raça Duroc em baia da Unidade II da Estação Quarentenária de Cananéia. (Fonte: Arquivo Pessoal)

O calendário das importações de suínos é anual e é planejado no ano anterior à chegada dos animais, sendo finalizado em novembro. As empresas solicitam o período em que pretendem importar e o calendário é montado com o auxílio da Associação Brasileira de Empresas de Genética de Suínos seguindo a ordem de prioridade descrita no “Manual de Procedimento Operacional Padrão para a utilização das Unidades de Quarentena de Suínos na Estação Quarentenária de Cananéia (EQC)”, disponível no site do Departamento de Saúde Animal. Depois de montado o calendário, quando chega mais próximo da data da quarentena, a empresa envia um formulário de solicitação para cada unidade desejada com o número de animais e a data de chegada, e o Quarentenário faz um termo de permissão de uso das instalações para a quarentena. Concomitantemente a isso, as empresas enviam um requerimento ao estado de destino dos animais no Brasil, a superintendência do estado verifica junto à EQC se a quarentena está agendada e se estiver tudo certo a EQC emite uma declaração. O estado de destino solicita o certificado zoosanitário internacional da origem dos animais, com pré-requisitos próprios do estado (Santa Catarina, por exemplo, é livre de febre aftosa sem vacinação, sendo assim, seus pré-requisitos são mais rígidos do que um estado que não possui essa certificação). Geralmente, no certificado zoosanitário é emitido o atestado negativo para tuberculose e brucelose e de tratamento para leptospirose, para que não sejam introduzidos novos sorovares e patógenos no Brasil, mais o exigido por estado. Depois, a Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS) autoriza ou não a importação, avaliando o ganho em genética com a introdução de cada animal. Após todos os trâmites e aceites a importação é autorizada e quando os animais chegam, é feito um documento de abertura da quarentena na EQC. Todos os procedimentos para importação estão descritos no manual.

A quarentena de suínos deve ter no mínimo 30 dias, com os animais sendo observados todos os dias pelos tratadores e, pelo menos, uma vez por semana pelos auditores-fiscais federais. Os animais chegam no aeroporto de Campinas-SP, são transferidos para caminhões e seguem viagem para a EQC. Os indivíduos que vierem a óbito no trânsito do país de origem para o Brasil ou no trânsito do aeroporto para Cananéia, são levados até a estação quarentenária para destinação correta das carcaças. Os animais que vierem a óbito durante a quarentena passam por necrópsia e se não for identificada a causa da morte, são coletadas amostras para exame histopatológico. Há a possibilidade de durante a quarentena realizar

treinamento de monta e coleta de sêmen dos animais (que deve ser descartado), contanto que a atividade obedeça às condições e critérios da equipe de auditores.

Depois de no mínimo 14 dias de quarentena, é feita a coleta de sangue e fezes de todos os animais na unidade, com o auxílio dos tratadores que fazem a contenção dos animais. Estas amostras são enviadas para um laboratório credenciado que realiza testes para as seguintes doenças: Peste Suína Clássica, Doença de Aujeszky, Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGE), Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos e Diarreia epidêmica dos Suínos. Em caso de resultados positivos, é feita a coleta e teste confirmatório a partir de PCR do soro, no caso de TGE é feita a PCR a partir das fezes, e se o teste confirmatório for positivo é feito o abate sanitário de todos os animais da unidade. Quando os animais obtêm resultado negativo, eles são liberados após permanecerem no mínimo 30 dias. Para isso, é feito o termo de liberação da quarentena e a Guia de Trânsito Animal (GTA) para trânsito dos animais até o seu destino. Em caso de mais de um destino, deve ser emitida uma GTA para cada um.

Depois da saída dos animais, é feita a limpeza dos equipamentos e instalações, o que leva cerca de 5 dias. Depois da limpeza, é feita uma vistoria pré-vazio sanitário para inspeção da limpeza realizada. Caso haja alguma não conformidade, devem ser feitas as adequações e depois uma nova vistoria. Quando autorizado o vazio sanitário, aplica-se desinfetante na unidade e a mantém fechada por no mínimo 5 dias. Por esse motivo, quando é feito o calendário anual de importações, o espaço entre as quarentenas deve ser de aproximadamente 15 dias, para que tenha uma margem de segurança e seja possível fazer a limpeza e vazio sanitário com a duração preconizada.

3.2.3 Quarentenas de aves

A EQC conta com uma unidade de quarentena de aves ornamentais que é dividida em 4 boxes. Sua capacidade varia de acordo com o porte e comportamento da espécie trabalhada.

A quarentena de aves ornamentais importadas é determinada pela Instrução Normativa N° 49, de 29 de outubro de 2018. O calendário de importação das aves é

semestral, com fechamento do semestre seguinte em março e setembro. Os procedimentos para importação devem seguir o “Manual de Procedimentos Operacionais Padrão para a utilização das Unidades de Quarentena de Aves na EQC”, disponível no site do Departamento de Saúde Animal. O importador deve solicitar a quarentena e informar o despachante responsável por meio de um formulário. Após feito isso, a EQC autoriza a quarentena, informa os prazos e o importador entra na fila. O importador deve encaminhar um formulário em caso de cancelamento ou de adiamento.

A quarentena de aves tem duração de 21 dias e todas as aves devem passar por quarentena de 21 dias no país de origem. As aves chegam no aeroporto de Guarulhos e depois são transportadas em caixas de transporte em veículos até a Estação. Os animais que vierem a óbito no trânsito são levados para a EQC para destinação correta das carcaças. Os animais que vierem a óbito durante a quarentena são necropsiados e se necessário são coletadas amostras para exame histopatológico. Depois de 7 dias de quarentena, é feita a coleta de swabs cloacais ou de fundo de gaiola dos animais. O tipo de coleta depende do tamanho do animal, por exemplo, para canários é feita a coleta de fundo de gaiola passando alguns Swabs estéreis no piso de cada gaiola e pelas fezes dos animais. Já aves maiores como pombos, é feita a coleta de cloaca, introduzindo um Swab estéril na cloaca de cada animal. Posteriormente, as amostras são enviadas para um laboratório credenciado que faz RT-PCR para as doenças de Newcastle e Influenza. Em caso de resultado positivo, todo o lote de animais é eutanasiado. Nos resultados negativos, após completar 21 dias, é feito o termo de liberação da quarentena e GTA para cada destino dos animais.

4 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O estágio no Instituto Pasteur possibilitou bom aprendizado sobre o vírus da raiva; sua epidemiologia; hospedeiros susceptíveis; áreas de ocorrência; variantes em circulação no Brasil; forma de coletar amostras e seu acondicionamento; sensibilidade, especificidade e limitações de cada técnica; experiência prática em processamento de amostras, montagem de lâminas e placas; leitura de lâminas/placas e interpretação de seus resultados; práticas de biossegurança;

experiência prática com biotério e rotina laboratorial; e organização e identificação de amostras. Além de crescimento pessoal ao trabalhar habilidades de comunicação, pontualidade, resolução de problemas, tomada de decisões e trabalho em equipe.

O estágio na Estação Quarentenária proporcionou um enorme aprendizado acerca de práticas de biossegurança; implantação e execução de procedimentos operacionais padrão; trâmites de importação; medidas sanitárias do país; doenças exóticas e de controle para suínos e aves; manejo, particularidades e forma de coletar amostras de aves e suínos; e raças e espécies de interesse comercial para importação. Proporcionou também enorme crescimento pessoal, autonomia e busca de conhecimentos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, as atividades desenvolvidas durante o período do estágio contribuíram decisivamente para o desenvolvimento pessoal e profissional da graduanda, preparando-a para a inserção nas diferentes áreas de pesquisa e conseqüentemente no mercado de trabalho.

6 REFERÊNCIAS

DECRETO nº 5.741, de 30 de março de 2006. Regulamenta os arts. 27-A, 28-A e 29-A da Lei nº 9171, de 17 de janeiro de 1991, organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, e dá outras providências.

GOVERNO FEDERAL. Estação quarentenária de Canenéia. 4 de janeiro de 2017. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/cgtqa/sqo/eqc>>. Acesso em: 8 dezembro 2023

GOVERNO FEDERAL. Wikis da Agricultura. Manual de Procedimentos Operacionais Padrão para a utilização das Unidades de Quarentena de Aves na EQC. Disponível em: <https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Sa%C3%Bade-Animal/EQC_aves>. Acesso em: 8 dezembro 2023

GOVERNO FEDERAL. Wikis da Agricultura. Manual de Procedimentos Operacionais Padrão para a utilização das Unidades de Quarentena de Suínos na EQC.

Disponível em: https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Sa%C3%Bade-Animal/manual_suinosa. Acesso em: 8 dezembro 2023.

INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 49, de 29 de outubro De 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/imagens/INSTRUONORMATIVAN49DE29DEOUTUBRODE2018.pdf>. Acesso em 10 dezembro 2023.

SÃO PAULO. Vigilância em Saúde 20 anos do SUS-SP: Um pouco da História do Instituto Pasteur. 19-35 p. 2008.

SCHNEIDER, Maria Cristina et al. Fifty Years of the National Rabies Control Program in Brazil under the One Health Perspective. **Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1342, 2023.

TEIXERA, LA. Ciência e Saúde na terra dos bandeirantes: a trajetória do Instituto Pasteur de São Paulo no período 1903 – 1916 [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1995. 180 p. ISBN 85-85676-14-0.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, VALDIR A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. 1973.

II- ASSUNTO DE INTERESSE

Diagnóstico da raiva em animais no estado de São Paulo em agosto de 2023

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose causada por um vírus da família Rhabdoviridae que provoca uma encefalite aguda progressiva e está distribuída em todos os continentes com exceção da Antártida (Rupprechet et al., 2008). Afeta predominantemente mamíferos domésticos e selvagens, e tem como principal característica o comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC) sob a forma

de encefalite, com sinais nervosos de agressividade ou paresia e paralisia (Babboni, Modolo, 2011). Essa virose é uma das doenças infecciosas mais letais já conhecidas, com uma taxa de letalidade próxima a 100% (Baynard, Tordo, 2018). Por ano, o vírus da raiva causa cerca de 59.000 mortes humanas no mundo, a maioria causada por mordida de um cão infectado (Hampson et al., 2015).

A Organização Mundial da Saúde classifica a raiva como doença tropical negligenciada, pois prevalece principalmente em áreas tropicais e afeta mais as comunidades em situação de vulnerabilidade e, desproporcionalmente, mulheres e crianças. Isso está associado a fatores socioeconômicos, falha de notificação e vigilância, desinformação ao lidar com mordeduras de animais, falta de conhecimento sobre profilaxia pré ou pós-exposição e sobre os sintomas da doença (Folks, 2018; Schneider et al., 2023).

A América Latina obteve progresso na eliminação da raiva canina, graças ao envolvimento dos sistemas de saúde humana nas campanhas de vacinação canina em massa planejadas através das Reuniões de Diretores dos Programas de Raiva nas Américas (REDIPRA) (Fahrion et al., 2023). No Brasil, a vigilância da raiva engloba o Ministério da Saúde (MS) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os quais reúnem informações de casos de raiva em humanos e em animais (Brasil, 2020). O controle da raiva exige diversas medidas, dentre elas a vigilância e o diagnóstico são consideradas essenciais pois definem estratégias de profilaxia e previnem casos em animais e humanos por meio da identificação de áreas com circulação viral (Lima, Catarino, 2018). O presente trabalho teve como objetivo o levantamento acerca do diagnóstico da raiva em animais em agosto de 2023 no estado de São Paulo, Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A raiva é causada por m vírus da ordem Mononegavirales, Família Rhabdoviridae e gênero *Lyssavirus*. Esses vírus têm genoma baseado em RNA de fita simples negativa, envelopado, em formato de projétil, com uma extremidade plana e a outra arredondada. Seu comprimento médio é de 180 nm e o diâmetro

médio é de 75 nm (Zandi et al., 2021; Brasil, 2008). A transmissão se dá pelo contato com a saliva de um animal infectado, principalmente por mordedura, mas também por arranhadura e lambedura de mucosas (Oliveira, Gomes, 2019).

O vírus migra da ferida da mordida para o sistema nervoso periférico e depois segue para o sistema nervoso central (SNC), via centrípeta, replica-se e depois dissemina-se por vários tecidos, via centrífuga, incluindo as glândulas salivares, onde o ciclo de transmissão se repete (Liu, Cahill, 2020; Potratz et al., 2020). De modo simples, a raiva pode ocorrer de duas formas: raiva encefalítica, com hiperexcitabilidade e hidrofobia; ou raiva paralítica, com fraqueza progressiva dos neurônios motores inferiores (Chaudhary et al., 2021). Nos humanos, o período de incubação varia entre 20 e 90 dias, com média de 45 dias (Jackson, 2018), nos cães 40 a 120 dias, nos herbívoros de 25 a 90 dias e nos quirópteros não se tem informação (Brasil, 2017).

Esta doença é discutida desde a antiguidade. No século XX a.C na Mesopotâmia, havia um decreto que definia as penalidades para os donos de um cão raivoso cuja mordida resultasse na morte de alguma pessoa (Babboni, Modolo, 2011). Os romanos descreveram a capacidade infecciosa da saliva dos cães raivosos, chamando o material infeccioso de veneno, “vírus” em latim. A descrição da história natural da raiva se manteve da mesma maneira ao longo do tempo sendo uma das formas de transmissão a saliva dos cães infectados e a utilização da palavra vírus para definir o material infeccioso (Schneider, Burgoa, 1994). A raiva possui quatro ciclos epidemiológicos de transmissão: urbano, rural, silvestre terrestre e silvestre aéreo (Figura 15).

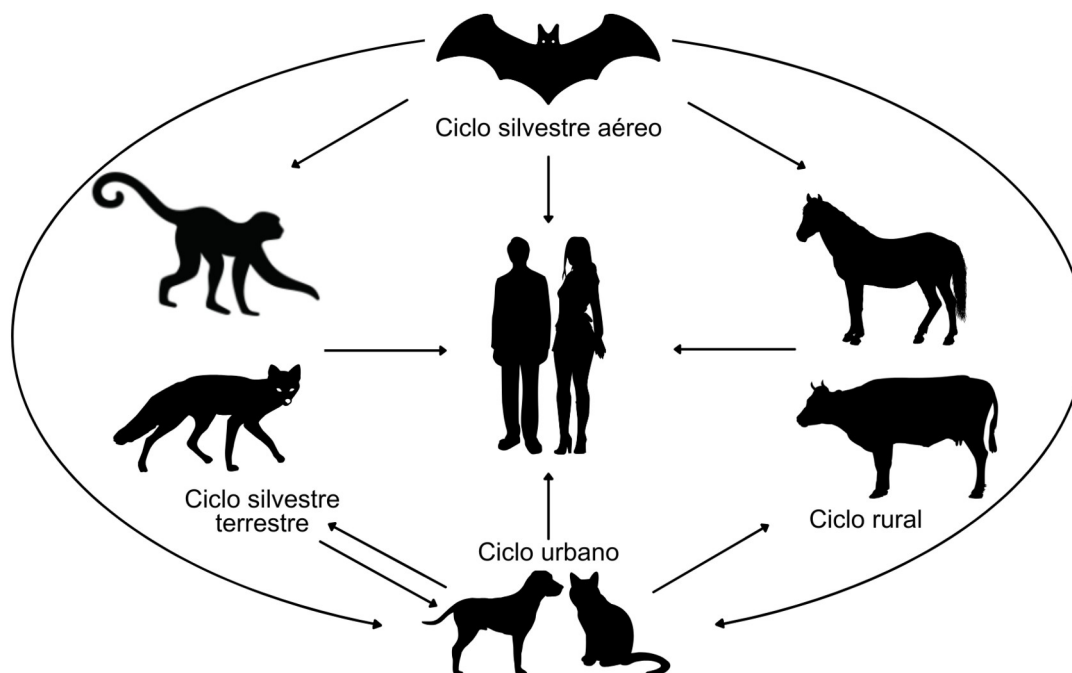


Figura 15. Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva. Adaptação de: Guia de Vigilância em saúde, volume 3. Brasil, Ministério da Saúde, 2017.

A transmissão pelo ciclo urbano está relacionada com cães e gatos. Essa transmissão é considerada uma das mais relevantes para a saúde pública, pelo estreito contato dos cães e gatos com os seres humanos (Silva et al., 2022). O cão é considerado o maior transmissor da raiva para os humanos ao redor do mundo, principalmente em lugares onde a raiva não foi bem controlada (Araújo et al., 2020). Em países onde as variantes virais predominantemente encontradas nos cães foram razoavelmente controladas e as variantes veiculadas por animais silvestres são ainda preocupantes, os gatos podem ser importantes na transmissão da raiva aos humanos já que são mais territorialistas e possuem o instinto de caça, são maiores as chances de interação com outros gatos ou com espécies silvestres (Oliveira, Tavela, Wagner, 2023).

O ciclo rural é constituído pela doença em herbívoros domésticos, como bovídeos e equídeos, e o principal transmissor é o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) (Gomes et al., 2012). Essa hipótese foi levantada por Antonio Carini, diretor do Instituto Pasteur em 1911, quando foi convidado a investigar o surto de raiva em Santa Catarina que dizimou 3000 bovinos e 1000 equinos, verificando indícios de ataque de morcegos aos herbívoros (Teixeira, Sandoval, Takaoka, 2004).

O ciclo silvestre terrestre ocorre principalmente entre canídeos silvestres e com diversas variantes antigênicas. As espécies envolvidas neste ciclo variam de

acordo com a região. Na África, são os chacais, na Ásia, os mangustos e as raposas vermelhas e na Europa, o cão-guaxinim. Na América do Norte, guaxinins e gambás participam, além dos coiotes e raposas; e na América do Sul, raposas (*Lycalopex* spp.) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) são reservatórios do vírus (Vargas, 2018; Meske et al., 2021). O nordeste brasileiro apresenta uma particularidade em relação a esse ciclo, pois saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) também podem ser um reservatório do vírus nesta região (Kotait et al., 2007).

O ciclo silvestre aéreo refere-se à raiva em morcegos. Morcegos potencialmente infectados com o vírus em áreas sinantrópicas são um problema sério, pois são uma fonte de infecção perigosa, particularmente pela possibilidade de passar despercebida devido aos morcegos assintomáticos (Batista, Franco, Roehe, 2007).

No Brasil, foram encontradas sete variantes antigênicas do vírus da raiva clássica. As variantes 1 e 2 (AgV1 e AgV2) foram isoladas de cães; a variante 3 (AgV3), isolada de morcego hematófago *Desmodus rotundus*; as variantes 4 e 6 (AgV4 e AgV6), isoladas de morcegos insetívoros das espécies *Tadarida brasiliensis* e *Lasiurus cinereus*, e duas variantes foram encontradas em *Cerdocyon thous* (cachorro do mato) e *Callithrix jacchus* (sagui de tufo branco) (Alvarenga, Sales, Sampaio, 2023). Em casos de diagnósticos positivos, deve ser feita a identificação da variante do vírus rábico, para determinar a origem da infecção, aprimorando a vigilância epidemiológica das doenças (Lima, Catarino, 2018).

O vírus rábico possui 7 genótipos pelo mundo. O genótipo 1 é o vírus da raiva clássica e é o mais frequente causador da doença em animais e humanos. Os genótipos: 2 vírus *lagos*, 3 vírus *mokola* e 4 vírus *duvenhage* são africanos. Os genótipos 5 (EBL1) e 6 (EBL2) são de morcegos europeus e o genótipo 7 de morcegos australianos. Estes vírus são mais restritos geograficamente, causando menos mortes por raiva, com exceção do genótipo 2, que não provoca doença humana. Porém, é possível que à medida que ocorra deslocamentos humanos para novos habitats, podem emergir casos com esses genótipos (Bradane et al., 2021; Valente, 2023).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Métodos de diagnóstico

Os laboratórios credenciados devem seguir os métodos de diagnóstico da raiva recomendados pela Organização Mundial da Saúde Animal (OMSA). A OMSA orienta os seguintes testes: imunofluorescência direta, imuno-histoquímica, RT-PCR, como testes primários, e isolamento viral em camundongos (IVC), isolamento viral em cultura celular (IVCC) e testes moleculares, como testes confirmatórios. O uso destes resulta em um diagnóstico confiável em 98-100% dos casos (WOAH, 2023).

3.2 Coleta de dados

O Instituto Pasteur é responsável por reunir os dados mensais e anuais do diagnóstico da raiva em animais no estado de São Paulo, feito no Instituto Pasteur e em outros laboratórios credenciados do estado. São reunidos os seguintes dados: espécie, cidade de origem e resultados positivo, negativo ou impossibilitado. O resultado é considerado positivo ou negativo após o teste primário e o teste confirmatório. Uma amostra é considerada impossibilitada quando está em elevado nível de autólise e/ou sem a presença de material do sistema nervoso central. Esses dados foram disponibilizados para a aluna pelo setor de Vigilância do IP.

3.3 Caracterização espacial dos dados coletados

Após a obtenção de dados acerca da vigilância e ocorrência da raiva em animais em municípios do Estado de São Paulo, as coordenadas desses locais foram processadas pelo software QGIS 3.38.3.

3.4 Análise estatística

A partir dos dados de ocorrência da raiva foi calculada a taxa de prevalência nos grupos de animais com resultado positivo. A prevalência foi calculada pelo resultado da divisão do número de casos positivos pelo número total de diagnósticos.

4 RESULTADOS

O estado de São Paulo possui 645 municípios (IBGE, 2022) e deles, 119 (18,44%) enviaram amostras de animais para diagnóstico da raiva para laboratórios credenciados em agosto de 2023. Em relação ao resultado, 16 (2,48%) municípios tiveram casos positivos e 103 (15,97%) obtiveram resultados negativos no período analisado. A distribuição dos casos e o envio de amostras estão demonstrados na Figura 16.

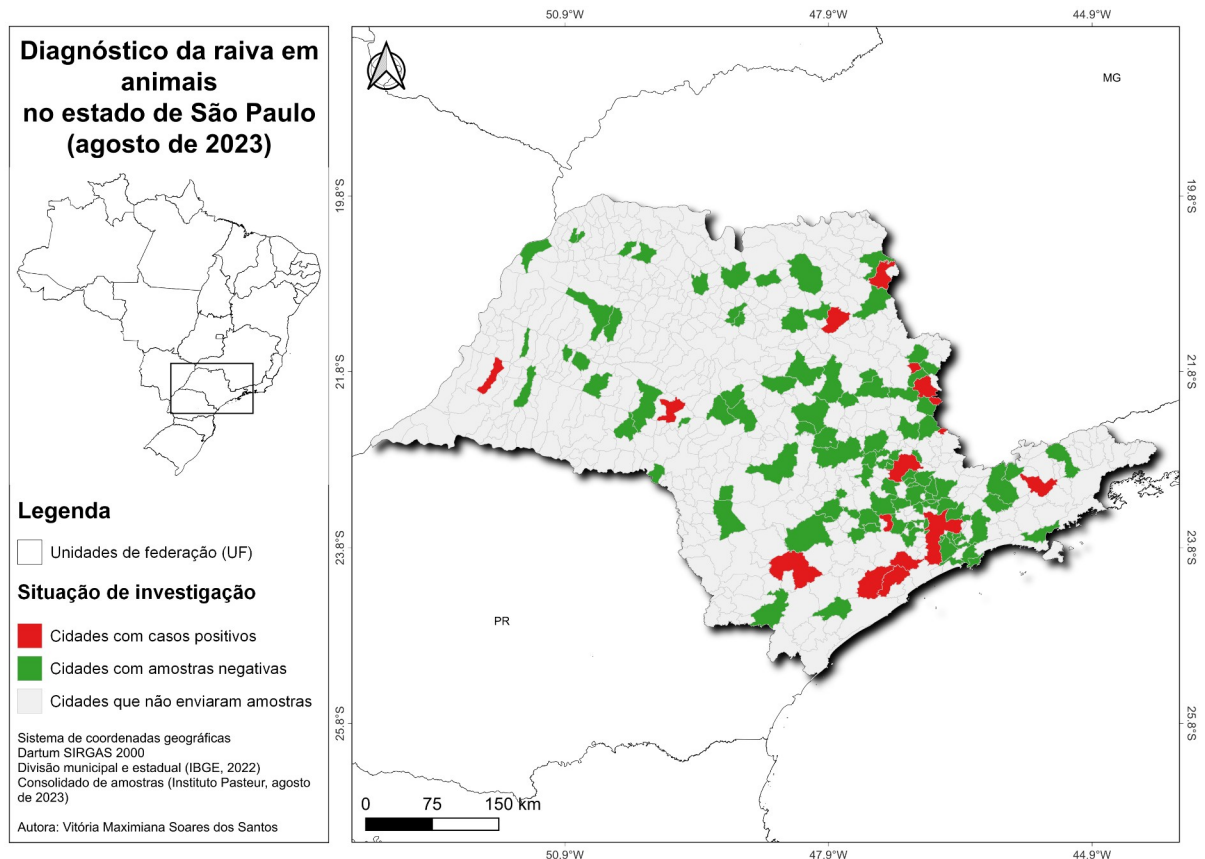


Figura 16. Localização da área de estudo, distribuição dos municípios e a respectiva situação de diagnóstico da raiva.

Na tabela 1 está apresentado o número de amostras de cada grupo ou espécie animal em ordem decrescente e seu respectivo número de amostras de acordo com o resultado.

Tabela 1. Número de amostras encaminhadas para diagnóstico da Raiva, em ordem decrescente, classificadas por espécie ou grupo animal e com respectivo número de casos positivos, amostras de negativas e impossibilitados. Estado de São Paulo, agosto de 2023.

Animais	Total de amostras	Resultado		
		Positivo	Negativo	Impossibilitado
Morcegos	382	8	338	36
Cães (<i>Canis familiaris</i>)	145	1	143	1
Gatos (<i>Felis catus</i>)	96	0	96	0
Macacos (Primates não-humanos)	56	0	56	0
Vacas (<i>Bos taurus</i>)	27	10	15	2
Gambás (<i>Didelphis spp.</i>)	23	0	23	0
Ouriços (Eretizontídeos)	8	0	8	0
Cavalos (<i>Equus caballus</i>)	7	3	4	0
Capivaras (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>)	4	0	4	0
Veados (Cervídeos)	3	0	3	0
Ovelhas (<i>Ovis aries</i>)	2	0	2	0
Anta (<i>Tapirus terrestris</i>)	1	0	1	0
Cachorro-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	1	0	1	0
Caxinguelê (<i>Sciurus aestuans</i>)	1	0	1	0
Mão-pelada (<i>Procyon cancrivorus</i>)	1	0	1	0
Onça parda (<i>Puma concolor</i>)	1	0	1	0
Ratão do banhado (<i>Myocastor coypus</i>)	1	0	1	0
Tamanduá (Mirmecofagídeo)	1	0	1	0
Tatú (Dasipodídeo)	1	0	1	0
Total	762	22	701	39

Sendo assim, das amostras totais recebidas para diagnóstico de raiva, 50,13% (382/762) foram de quirópteros; 19,03% (145/762) foram de cães; 12,60% (96/762) foram de gatos; 7,35% (56/762) foram de macacos; 3,54% (27/762) foram vacas; 3,01% (23/762) foram gambás; 1,05% (8/762) foram de ouriços; e o restante de cada grupo animal representou menos de 1% das amostras recebidas.

A prevalência de Raiva foi de 2,09% (8/382) nos Quirópteros, 0,69% (1/145) nos cães e pela variante AgV3, 37,04% (10/27) nas vacas e 42,86% (3/7) nos

cavalos, como apresentado no gráfico abaixo (Figura 17). Os demais animais não tiveram casos positivos.

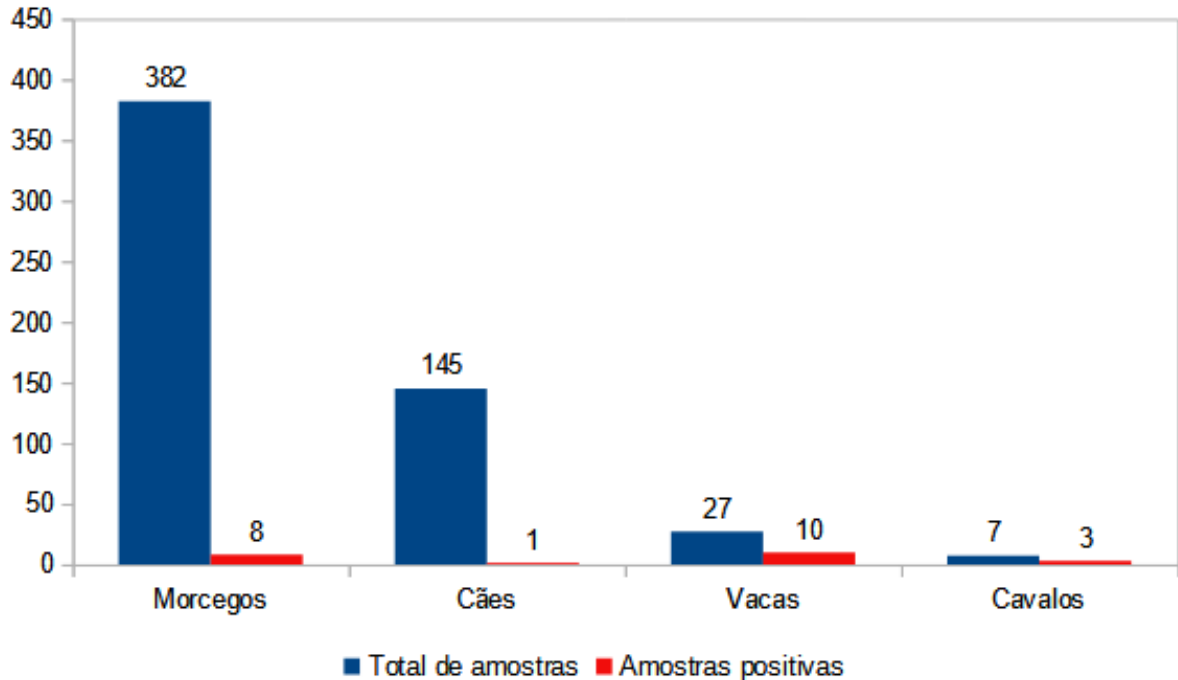


Figura 17. Gráfico comparativo entre número total de amostras enviadas e o número de casos positivos no mesmo grupo animal.

O resultado obtido nos quirópteros foi comparado com os valores de positividade encontrados pelos autores Albas, Queiroz, Rodrigues e Scheffer na tabela 3.

Tabela 3. Positividade encontrada em quirópteros em regiões do Estado de São Paulo, por diferentes autores.

	Autores				
	Presente estudo	Albas et al., 2005	Queiroz et al., 2009	Rodrigues et al., 2017	Scheffer et al., 2007
n	382	1113	4035	4464	4393
Região	Estado de São Paulo	Oeste do Estado de São Paulo	Noroeste do Estado de São Paulo	Campinas, SP	Estado de São Paulo
Período	Agosto de 2023	2006 a 2008	1993 a 2007	2004 a 2014	2002 a 2003
Positividade encontrada	2,09%	1,60%	1,20%	2,17%	1,90%

Em relação aos morcegos, os espécimes positivos diagnosticados pelo Instituto Pasteur passaram por identificação morfológica e morfométrica e as espécies estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Número de espécies positivas, respectivo município de origem, espécie identificada e hábito da espécie.

Número de amostras	Município de origem	Espécie	Hábito e fonte
1	Campinas	<i>Eptesicus furinalis</i>	Forma pequenas colônias (1 a 20) Pacheco et al., 2010
3	Ribeirão Preto	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Forma grandes colônias (3 a 3000) Silva et al., 2007
1	São João da Boa vista	<i>Lasiurus blossevilli</i>	Forma pequenas colônias (1 a 4) Pacheco et al., 2010
1	Garça	-	-

5 DISCUSSÃO

Uma grande parcela (81,56%) das cidades do estado de São Paulo não enviaram amostras para diagnóstico da raiva. Com isso, não podemos concluir se há ou não a circulação do vírus da raiva nessas regiões.

O Ministério da Saúde, a partir de 2008, recomenda a meta anual de envio de amostras de 0,1% da população canina estimada do município para vigilância e monitoramento da circulação do vírus rábico (Mello, 2021). Sendo assim, é preciso averiguar se os municípios que não enviaram amostras no mês estudado estão atingindo a meta anual estabelecida.

A positividade em morcegos relaciona-se com o ciclo epidemiológico de transmissão aérea da raiva. Alguns fatores podem ser responsáveis pela variação da prevalência em diferentes autores (Tabela 3), como o hábito dos morcegos analisados, e a captura de animais sintomáticos e/ou de assintomáticos, pois a prevalência é maior em animais que estão apresentando sintomatologia (Scheffer et al., 2007; Queiroz et al., 2009).

A positividade em vacas e cavalos está relacionada com o ciclo epidemiológico de transmissão rural do vírus rábico. A prevalência encontrada na

presente análise em vacas foi de 37,04%, enquanto o estudo de Albas em 2005 (n=205) obteve apenas 7,8% e Queiroz em 2009 (n=646) encontrou 13,00% de positividade, valores menores. A prevalência encontrada em cavalos foi de 42,86% e ao todo foram recebidas apenas 7 amostras. Em outros trabalhos, a incidência de casos é menor nessa espécie quando comparado com outros animais (Pierezan, 2009), porém a importância desta doença em cavalos vem aumentando no Brasil (Sodré, Rossi, Mathias, 2023).

A infecção de herbívoros na grande maioria dos casos, se dá pelo contato com morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) a partir do repasto sanguíneo do morcego (Gomes et al., 2012), sendo assim a variante comumente envolvida é a AgV3 (Alvarenga, Sales, Sampaio, 2023). A doença nesses animais pode ocorrer por fatores de receptividade e/ou vulnerabilidade. Os fatores de receptividade são características da área que possibilitam a manutenção e difusão do *D. rotundus*, sendo elas: presença de bovinos, tipo de criação (intensiva ou extensiva), afloramentos de rocha calcária, declividade do terreno, presença de matas permanentes e localização de abrigos naturais permanentes, temporários, artificiais e potenciais. Já os fatores de vulnerabilidade estão envolvidos com a capacidade de ingresso do *D. rotundus* em uma nova área como a construção de usinas hidrelétricas, novas ferrovias e rodovias, desmatamento e novas áreas de pastagem, retirada abrupta de fonte alimentar, inundações e outras alterações ambientais (Dias et al., 2011).

O governo federal do Brasil recomenda, para o controle da raiva em herbívoros, as seguintes medidas de controle: monitoramento e controle de morcegos hematófagos através da aplicação de pasta anticoagulante, vacinação obrigatória em áreas de alto risco e voluntária em áreas de baixo risco, notificação obrigatória de casos suspeitos de raiva ou detecção em abrigos de morcegos hematófagos, investigação de casos suspeitos, diagnóstico laboratorial da doença e programas de educação em saúde animal e humana (Sodré, Rossi, Mathias, 2023).

A prevalência obtida em cães foi 0,69% e a variante encontrada foi a AgV3, porém ela não está relacionada apenas com o ciclo tradicional de transmissão urbana da raiva. A partir de 1999, observou-se um novo perfil da raiva urbana no estado de São Paulo, quando a variante encontrada nos carnívoros domésticos passou a ser a AgV3, variante mantida por quirópteros. Nesses casos a raiva se

manifesta principalmente na forma paralítica, sem sinais de agressividade (Vasconcellos, 2020).

De acordo com Rodrigues (2015) a cobertura vacinal para raiva em cães no município de Campinas-SP, caiu de 82% para 59% de 2004 a 2014. Uma das hipóteses para o fato seria a queda no número de casos de raiva por décadas, o que levou a população à falsa percepção de que a vacina não seria mais importante para a manutenção do baixo número de casos. Além disso, durante o período avaliado pelo estudo aconteceram diversas variações nas campanhas de vacinação, isto é, existiram anos em que elas não foram feitas ou foram realizadas em diferentes meses do ano.

Atualmente as campanhas de vacinação no estado de São Paulo estão suspensas desde 2020 e a vacinação de rotina está mantida, visto que o estado não identifica a circulação da AgV2 há mais de duas décadas e a variante encontrada nos animais acarreta a forma paralítica (Mello, 2021). No cenário atual, é preciso aprimorar as ações de vigilância para o ciclo urbano, com identificação correta da variante do vírus, diagnóstico em animais silvestres, bem como reforçar a importância da profilaxia humana e assim, prevenir casos humanos (Castilho et al., 2018).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos reforçam a necessidade de encaminhar o maior número possível de amostras para análise laboratorial, uma vez que o vírus da raiva está presente no estado. Além disso, são necessários mais estudos acerca da prevalência da raiva em animais domésticos e silvestres no estado de São Paulo.

7 REFERÊNCIAS

ALBAS, A., SOUZA, E. A. N. D., PICOLO, M. R., FAVORETTO, S. R., GAMA, A. R. D., & SODRÉ, M. M. Os morcegos e a raiva na região oeste do Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44, 201-205. 2005.

ALVARENGA, C. S., SALES, C. M. M., & SAMPAIO, P. B. Raiva canina no Brasil: um estudo epidemiológico dos casos recentes. **Revista Brasileira De Pesquisa Em Saúde**, 24(3), 46–55. 2023.

ARAÚJO LL, OLIVEIRA TM, DINIZ SA, SILVA MX. Análise epidemiológica dos atendimentos da profilaxia antirrábica humana associados a acidentes com gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 72(3):814-22. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10413>.

BABBONI S D; MODOLO, J R. Raiva: origem, importância e aspectos históricos. **UNOPAR Científica**. Ciências Biológicas e da Saúde, p. 349-356. 2011.

BADRANE H, BAHLOUL C, PERRIN P, TORDO N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal Virology**. 75(7):3268-76. 2001. doi: 10.1128/JVI.75.7.3268-3276.2001.

BANYARD AC, TORDO N. Rabies pathogenesis and immunology. **Revue scientifique et technique**; 37(2):323-330. 2018. English. doi: 10.20506/rst.37.2.2805. PMID: 30747145.

BATISTA, HBCR; FRANCO, AC; ROEHE, PM. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva. 1.ed. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: Editora MS. 106 p. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Raiva. In: **Guia de Vigilância em Saúde**: volume 3. 1ª edição. Brasília-DF: Ministério da Saúde. p. 645–70. 2017.

BRASIL. Semanas Epidemiológicas: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 15, 2020. **Boletim Epidemiológico**, Secretaria de Vigilância em Saúde| Ministério da Saúde, v. 51. 2020.

CASTILHO, J. G., ACHKAR, S. M., DE NOVAES OLIVEIRA, R., MORI, E., CARNIELI JR, P., & MACEDO, C. I. Analysis of rabies diagnosis in dogs and cats in the state of São Paulo, Brazil. **Archives of virology**, 163(9), 2369-2376. 2018.

CHAUDHARY SC, KHANDELWAL A, TANDON R, SAWLANI KK. RABIES ENCEPHALITIS. **BMJ Case Reports**.;14(4):e239249. 2021. doi: 10.1136/bcr-2020-239249. PMID: 33906884; PMCID: PMC8076939.

DIAS, R. A., NOGUEIRA FILHO, V. D. S., GOULART, C. D. S., TELLES, I. C. O., MARQUES, G. H. F., FERREIRA, F., ... & FERREIRA NETO, J. S. Modelo de risco para circulação do vírus da raiva em herbívoros no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, 30(4), 370-376. 2011.

FAHRION, Anna Sophie et al. Rabies, a long-standing One Health example-progress, challenges, lessons and visions on the way to 0 by 30. **Frontiers in veterinary science**, v. 10, p. 1220327, 2023.

FOOKS AR. Conclusions Rabies. **Revue scientifique et technique**. 37(2):761-769. 2018. doi: 10.20506/rst.37.2.2839. PMID: 30747110.

GOMES, A P et al. Raiva humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 4, p. 334-40. 2012

HAMPSON, Katie et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003709, 2015.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. XIII Recenseamento Geral do Brasil. 2022.

JACKSON AC. Rabies: a medical perspective. **Revue scientifique et technique**. 37(2):569-580. 2018. English. doi: 10.20506/rst.37.2.2825. PMID: 30747124.

KOTAIT E, CARRIERI ML, CARNIELI JR, P. CASTILHO, J. G. OLIVEIRA RN, MACEDO, C. I.; SCHEFFER, K. C.; ACHKAR SM. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**; 4(40):2-8. 2007.

LIMA F, CATARINO L. Diagnóstico laboratorial de raiva no Distrito Federal, Brasil. **Revista Gestão & Saúde**, v. 9, n. 2, p. 234-246. 2018.

LIMA, E. F., RIET-CORREA, F., CASTRO, R. S. D., GOMES, A. A. B., & LIMA, F. D. S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 25, 250-264. 2005.

LIU C, CAHILL JD. Epidemiology of Rabies and Current US Vaccine Guidelines. **R I Medical Journal** (2013).103(6):51-53. PMID: 32752569. 2020.

MELLO, L. C. D. Vigilância epidemiológica da raiva na região noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2019. 2021.

MESKE M, FANELLI A, ROCHA F, AWADA L, SOTO PC, MAPITSE N, TIZZANI P. Evolution of Rabies in South America and Inter-Species Dynamics (2009-2018). **Tropical Medicine Infectious Disease**. 6(2):98. 2021 doi: 10.3390/tropicalmed6020098. PMID: 34207822; PMCID: PMC8293400.

OLIVEIRA, B C M; GOMES, D E. Raiva-Uma Atualização Sobre A Doença. **Revista Científica Unilago**, v. 1, n. 1. 2019.

OLIVEIRA, F. M., TAVELA, A. DE O., & WAGNER, K. J. P. Associação entre fatores socioeconômicos e demográficos e vacinação antirrábica de cães e gatos domésticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, 31(2), e31020063. 2023. <https://doi.org/10.1590/1414-462X202331020063>.

PACHECO, S. M., SODRÉ, M., GAMA, A. R., BREDT, A., CAVALLINI, E. M., MARQUES, R. V., & BIANCONI, G. Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera neotropical**, 16(1), 629-647. 2010.

POTRATZ, Madlin et al. Neuroglia infection by rabies virus after anterograde virus spread in peripheral neurons. **Acta neuropathologica communications**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2020.

QUEIROZ, L. H., CARVALHO, C. D., BUSO, D. S., FERRARI, C. I. D. L., & PEDRO, W. A. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42, 9-14. 2009.

RODRIGUES, R. C. A., ZUBEN, A. P. B. V., LUCCA, T. D., & REICHMANN, M. D. L. A. B. Campanhas de vacinação antirrábica em cães e gatos e positividade para raiva em morcegos, no período de 2004 a 2014, em Campinas, São Paulo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 26, 621-628. 2017.

RUPPRECHET, CE; BARRETT, J.; BRIGGS, D.; CLIQUET, F.; FOOKS, AR; LUMLERTDACHA, B.; MESLIN, FX; MULDER, T.; NEL, LH; SCHNEIDER, C.; e outros. Can rabies be eradicated? **Developmental Biology**, 131, 95–121. 2008.

SCHEFFER, K. C., CARRIERI, M. L., ALBAS, A., SANTOS, H. C. P. D., KOTAIT, I., & ITO, F. H. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 41, 389-395. 2007.

SCHNEIDER MC, BURGOA CS. Tratamiento contra la rabia humana: un poco de su historia. **Revista Saúde Pública**; 28(6):454-63. 1994.

SCHNEIDER MC, MIN KD, ROMIJN PC, DE MORAIS NB, MONTEBELLO L, MANRIQUE ROCHA S, SCIANCALEPORE S, HAMRICK PN, UIEDA W, CÂMARA VM, LUIZ RR, BELOTTO A. Fifty Years of the National Rabies Control Program in Brazil under the One Health Perspective. **Pathogens**. 11;12(11):1342. 2023. doi: 10.3390/pathogens12111342. PMID: 38003806; PMCID: PMC10674250.

SILVA, A S Et al. Aspectos epidemiológicos da raiva: Estudo descritivo. *PubVet*, v. 16, p. 197. 2022.

SILVA, M. V. D., XAVIER, S. D. M., MOREIRA, W. C., SANTOS, B. C. P. D., & ESBÉRARD, C. E. Vírus rábico em morcego *Nyctinomops laticaudatus* na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: isolamento, titulação e epidemiologia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40, 479-481. 2007.

SODRÉ, Débora Naihane Alves et al. Epidemiology and Control of Rabies in Cattle and Equines in Rondônia State, a Brazilian's Legal Amazon Area. **Animals**, v. 13, n. 18, p. 2974, 2023.

TEIXEIRA, L. A., SANDOVAL, M. R. C., & TAKAOKA, N. Y.. Instituto Pasteur de São Paulo: cem anos de combate à raiva. **História, Ciências, Saúde-manguinhos**, 11(3), 751–766. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702004000300011>.

VALENTE, G. D. S. R. T. Raiva humana na era da globalização. 2023.

VARGAS, A. Perfil epidemiológico da Raiva Humana no Brasil, 2000 – 2017. 2018. 60 f., il. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva), Universidade de Brasília, Brasília. 2018.

VASCONCELLOS, S. A. Situação atual da Raiva no Estado de São Paulo. *B. APAMVET*, 9-14. 2020.

WOAH, World Organisation for Animal Health. Terrestrial Manual 2023. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). Chapter 3.1.18., p 1-15. 2023.

ZANDI F, GOSHADROU F, MEYFOUR A, VAZIRI B. Rabies Infection: An Overview of Lyssavirus-Host Protein Interactions. **Iranian Biomedical Journal** 25(4):226-42. 2021. doi: 10.52547/ibj.25.4.226. PMID: 34217155; PMCID: PMC8334389.