

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL
EM DEFESA AGROPECUÁRIA

CLEUZA SANTOS ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BOVINOS
IMUNIZADOS COM VACINA COMERCIAL ANTIRRÁBICA
INATIVADA

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JANEIRO – 2022

CLEUZA SANTOS ALMEIDA

Bacharel em Medicina Veterinária
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2019

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BOVINOS
IMUNIZADOS COM VACINA COMERCIAL ANTIRRÁBICA
INATIVADA**

Defesa de Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Defesa Agropecuária na Área de Ciências Agrárias.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante

Coorientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JANEIRO – 2022**

INSERIR FICHA CATALOGRÁFICA

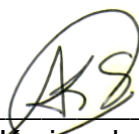
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BOVINOS
IMUNIZADOS COM VACINA COMERCIAL ANTIRRÁBICA
INATIVADA**

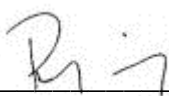
Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de

Cleuza Santos Almeida

Aprovada em 25/01/2022



Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Orientadora



Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador interno

Dra. Ângela Cristina de Oliveira Lima
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinadora externa ao programa



Dra. Lilian Porto de Oliveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano
Examinadora externa

Dedico

À minha amada filha Luna Almeida Santos,
que a todo tempo esteve comigo.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ser o meu refúgio e fortaleza e não me desamparar e me conceder essa Graça. Obrigada pela minha saúde e disposição para concluir esse trabalho. Obrigada por em tempos tão difíceis, de medo, insegurança e luto os quais vivenciamos em 2020 e ainda temos passado em 2021, o Senhor ter me guardado me dado força e fortalecido a minha fé para enfrentar todos os obstáculos e persistir. Nada sou sem Ti Senhor.

Nesses quase dois anos de mestrado, de muito estudo, esforço e empenho, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização desse trabalho. Por tanto, registro aqui a importância que elas tiveram e ainda têm nessa conquista, e a minha sincera gratidão a todas elas.

Primeiramente, agradeço aos meus pais Olava Maria de Jesus Santos Almeida e Antonio Santos Almeida, por todo apoio e incentivo recebido para a realização desse trabalho. Aos meus irmãos Erivaldo Almeida e Ismael Almeida por todos os favores que me fizeram, mas principalmente por fazerem parte da minha vida e me trazerem muitas alegrias, muitíssimo obrigada!

A minha preciosa e amada filha, que se tornou luz durante a minha caminhada nessa jornada, minha Luna, te amo e sou muito grata a Deus por você existir em minha vida, meu amorzinho.

Minha gratidão a minha orientadora e professora Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante, por todos os conhecimentos repassados, pela paciência e compreensão. Obrigada por sua dedicação, que o fez por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. Obrigada por ter acreditado e depositado sua confiança em mim, e uma gratidão ainda mais especial por toda acolhida sem igual nos momentos que mais precisei de apoio, compreensão e de ser abraçada.

Ao professor Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto, pelo apoio e colaboração durante todo o desenvolvimento do trabalho, muito obrigada.

A Rose Nunes, Kelli Carneiro, Cristina, Edinéia e amigos conquistado no Labovet Produtos Veterinários, todos vocês colaboraram muito para meu crescimento profissional e pessoal.

A Dra. Ângela Cristina de Oliveira Lima, agradeço pela oportunidade em desenvolver esse estudo, por ser fonte de apoio e incentivo na realização desse projeto, alguém que além de especial em minha vida por essa e tantas outras

oportunidades, foi mais uma vez fundamental na realização dessa conquista.

Ao professor Dr. Alexandre Moraes Pinheiro, pela colaboração e disponibilidade de compartilhar seus conhecimentos nos momentos difíceis, obrigada por estar sempre disposto a me ajudar.

Aos colegas de turma, Andréa, Davi e Indiana, grata por toda parceria, vocês são demais.

Agradeço ao pessoal do Setor Zootécnico da Fazenda Experimental da UFRB, Danilo, Diego, Emanuel, Rogério e Sr^o Clô, muito obrigada por toda ajuda e colaboração.

A Alessandro Machado, pela disposição em me ajudar e pelo conhecimento repassado, me auxiliando na técnicas de estatística experimental.

Aos meus amigos e parceiros de sempre, os quais perto ou distante posso contar, Ana Clara Benevides, Tatiane Viana e Rubens Silva, muitíssimo obrigada.

Agradeço também aos componentes da Banca de Qualificação de Mestrado, Professor Dr. Robson Bahia Cerqueira, Dra. Ângela Cristina e Dr^a Lilian Porto de Oliveira pelos conselhos e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste estudo.

Por fim e não menos importante, a meu amor Danilo Pereira, a meu primo Sirlando Santos, e ao meu cunhado Antônio Ronaldo, por toda a disposição e apoio para a realização deste projeto, pelo auxílio nas coletas, nas viagens a Cruz das Almas e a Feira de Santana, em uma época atípica vividas por todos nós (Pandemia 2020-2021), e ainda assim vocês estavam comigo e me auxiliaram em tudo que precisei, grata por tudo e por tanto e por vocês se fazerem presente.

ALMEIDA: S. C. **Avaliação da resposta imune humoral de bovinos imunizados com vacina comercial antirrábica inativada.** Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2022.
Orientadora: Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante.

RESUMO

A raiva é uma doença que atinge o sistema nervoso central, uma zoonose de importância na saúde pública devido a sua alta letalidade e os impactos econômicos gerados por ela na pecuária. É uma das doenças neurológicas mais comuns no rebanho bovino brasileiro, ocupando um status de situação endêmica no Brasil, sendo o morcego hematófago, *Desmodus rotundus* o principal vetor do vírus da raiva aos bovinos. A vacinação é uma das estratégias para controle dessa enfermidade com alta letalidade e sem tratamento. Este experimento foi desenvolvido com objetivo de avaliar a resposta imune humoral e acompanhar os parâmetros clínicos de bovinos vacinados com uma vacina comercial antirrábica inativada. No dia D0, foram selecionados 10 animais com sorologia negativa para anticorpos antirrábicos neutralizantes ($\leq 0,5$ UI/mL) e considerados em boas condições de saúde para receberem a vacina, a qual foi administrada em dose única. Os animais foram acompanhados pelo período de um ano após a aplicação da vacina, com coletas realizadas nos dias D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360. Para a determinação dos níveis de anticorpos após a vacinação, foi realizada a técnica de Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência, bem como a realização de avaliações clínicas em todos os animais nos dias D-21, D0, D+21 e D+360, os exames clínicos avaliaram os parâmetros de frequência cardíaca, respiratória, temperatura retal e motilidade ruminal. Vinte e um dias após a aplicação de uma dose da vacina avaliada, todos os animais apresentaram resultados de titulação de anticorpos neutralizantes antirrábico $\geq 0,5$ UI/mL. 100% dos animais apresentaram título considerado adequado pela literatura durante todo o estudo, demonstrando que a vacina induziu níveis de anticorpos neutralizantes antirrábico $\geq 0,5$ UI/mL, de 21 dias após a vacinação até um ano. As análises observacionais por meio dos exames físicos realizados indicaram que os animais mostraram comportamento, saúde e atitude condizentes com a espécie, categoria e condições de manejo estabelecidas para este estudo. Dessa forma, baseando-se nos resultados obtidos no estudo, a administração da vacina comercial antirrábica inativada apresentou-se com níveis de anticorpos neutralizantes adequados para os bovinos quando realizada conforme recomendação da bula, comprovando a duração de títulos a nível de eficácia, por um ano, na espécie bovina.

Palavras-chave: raiva, zoonoses, vacinação, bovinocultura.

ALMEIDA: S. C. **Evaluation of the humoral immune response of cattle immunized with commercial inactivated rabies vaccine.** Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2022.
Advisor: Ana Karina da Silva Cavalcante.

ABSTRACT

Rabies is a disease that affects the central nervous system, a zoonosis of importance in public health due to its high lethality and the economic impacts generated by it on livestock. It is one of the most common neurological diseases in the Brazilian cattle herd, occupying a status of endemic situation in Brazil, with the hematophagous bat, *Desmodus rotundus*, the main vector of the rabies virus to cattle. Vaccination is one of the strategies to control this disease with high lethality and without treatment. This experiment was developed with the objective of evaluating the humoral immune response and monitoring the clinical parameters of cattle vaccinated with a commercial inactivated rabies vaccine. On day D0, 10 animals with negative serology for neutralizing anti-rabies antibodies (≤ 0.5 IU/mL) were selected and considered in good health conditions to receive the vaccine, which was administered in a single dose. The animals were followed for a period of one year after application of the vaccine, with collections performed on days D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270 and D+360. To determine the levels of antibodies after vaccination, the Simplified Fluorescence Inhibition Microtest technique was performed, as well as clinical evaluations in all animals on days D-21, D0, D+21 and D+360, clinical examinations evaluated the parameters of heart rate, respiratory rate, rectal temperature and rumen motility. Twenty-one days after the application of an evaluated vaccine dose, all animals had anti-rabies neutralizing antibody titer results ≥ 0.5 IU/mL. 100% of the animals had a titer considered adequate by the literature throughout the study, showing that the vaccine induced levels of anti-rabies neutralizing antibodies ≥ 0.5 IU/mL, from 21 days after vaccination to one year. Observational analyzes through the physical examinations performed indicated that the animals showed behavior, health and attitude consistent with the species, category and management conditions established for this study. Thus, based on the results obtained in the study, the administration of the commercial inactivated rabies vaccine presented adequate levels of neutralizing antibodies for cattle when performed as recommended in the package insert, proving the duration of titers in terms of efficacy, for a year, in the bovine species.

Keywords: rabies, zoonoses, vaccination, bovine culture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Imagem ilustrativa de um *Lyssavirus* com marcadores típico, mostrando uma visão generalizada do genoma e antígenos virais 17
- Figura 2 – Esquema demonstrando os principais ciclos epidemiológicos da raiva, suas possíveis inter-relações e seus principais vetores 18
- Figura 3 – Fluxo conceitual de recepção, entrada, transcrição, tradução, replicação e saída de *Lyssavirus* de uma célula hospedeira generalizada 27
- Figura 4 – Fluxograma: Grupo, número de animais, dose, via de administração, formulação, exame clínico e sorologia 33
- Figura 5 – Instalações experimentais dos bovinos no setor zootécnico da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus Cruz das Almas – Ba 35
- Figura 6 – Administração da vacina comercial antirrábica inativada testada, por via subcutânea em bovinos 36
- Figura 7 – Realização do exame clínico nos bovinos 37
- Figura 8 – Colheita de sangue em bovinos para realização de análises sorológica 38

LISTA DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Gráfico 1 – Curva da titulação de anticorpos neutralizantes antirrábico em bovinos nos tempos avaliados	44
Gráfico 1a – Curvas individuais dos títulos de anticorpos (UI/mL) dos bovinos machos vacinados contra a raiva com uma dose de vacina comercial testada	45
Gráfico 1b – Curvas individuais dos títulos de anticorpos (UI/mL) dos bovinos fêmeas vacinados contra a raiva com uma dose de vacina comercial testada	46
Quadro 1 – Curso da doença em algumas espécies animais	28
Quadro 2 – Identificação dos bovinos selecionados nas análises experimentais	35
Tabela 1 – Médias \pm desvios padrão dos parâmetros fisiológicos dos bovinos antes e após a aplicação da vacina	40
Tabela 2 – Titulação de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva em bovinos nos tempos avaliados	43

SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

BA - Bahia

BEI - Etilenimina binária

bpm - Batimento por minutos

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

FA - Fosfatase alcalina

FIMT - Microteste de inibição de fluorescência

G - Glicoproteína

GB - Grupo bovino

GGT - Gama glutamiltransferase

HCM - Hemoglobina corpuscular média

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Igs - Imunoglobulinas

IFN- β - Interferon beta

IFD - Imunofluorescência direta

L - RNA – Polimerase

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública

N - Nucleoproteína

M - Proteína da Matriz

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

mpm - Movimento por minutos

mL - Mililitro

mRNAs - Ácido ribonucleico mensageiro

NK - Natural *Killer*

NO - Óxido nítrico

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal

OMS - Organização Mundial da Saúde

P - Fosfoproteína
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PMI - Período médio de incubação
PNCRH - Programa Nacional de Controle da Raiva em Herbívoros
PV - Pasteur Vírus
RRP - Receptor de reconhecimento de padrões
RCB - Receptor de antígeno de linfócitos B
RFFIT - Teste rápido de inibição de focos fluorescentes
RNP - Ribonucleoproteico
RT-PCR - Reversa seguida da reação em cadeia de polimerase
RS - Rio Grande do Sul
SNC - Sistema nervoso central
SI - Sistema imune
SII - Sistema imune inato
SIA - Sistema imune adquirido
SN - Soroneutralização
SFIMT - Microteste simplificado de inibição de fluorescência
TLRs - Receptor *toll-like*
TNF- α - Factor de necrose tumoral alfa
UI - Unidade internacionais
VCM - Volume corpuscular médio
°C - Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	CARACTERÍSTICA DO AGENTE ETIOLÓGICO	17
3.2	EPIDEMIOLOGIA.....	18
3.3	RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL.....	20
3.4	RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR VACINA.....	24
3.5	PATOGENIA	25
3.6	SINAIS CLÍNICOS	28
3.7	DIAGNÓSTICO	29
3.8	PROFILAXIA E PREVENÇÃO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.2.1	Local	33
4.2.2	Animais	34
4.2.3	Manejo dos animais durante a fase experimental.....	34
4.2.4	Vacina	36
4.2.5	Avaliação clínica pré e pós-vacinação.....	36
4.2.6	Exames sorológicos	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS.....	40
5.2	AVALIAÇÃO DA SOROLOGIA.....	42
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma das zoonoses de maior importância mundial, doença aguda do Sistema Nervoso Central (SNC) que pode acometer todos os mamíferos, incluindo os humanos. Provocada pelo *Rabdovírus*, vírus do gênero *Lyssavirus*, levando a um quadro de encefalomielite fatal. O morcego *Desmodus rotundus* é a espécie de morcego hematófago mais abundante e a qual tem nos herbívoros a sua maior fonte de alimento.

É uma enfermidade de grande importância no âmbito da saúde pública, esta zoonose causa grandes impactos econômicos na pecuária. Pesquisas mostram que esta doença mata em torno de 100.000 bovinos/ano em toda a América Latina e gera perdas que chegam de 30 milhões de dólares, os custos também estão relacionados além das perdas de rebanhos a gastos indiretos com tratamento de pessoas pós-exposição que mantiveram contato com animais sobre suspeita da doença. Não existe tratamento, após o início dos sinais clínicos é considerada fatal.

A raiva em herbívoros no Brasil é considerada endêmica, variando a prevalência em alguns estados. O crescimento do rebanho leva a modificações no meio ambiente, como o desmatamento e criações de vias para escoamento da produção, isto gera alteração no ambiente dos morcegos levando-os a busca por novos abrigos e nova fonte alimentar, aproximando assim de produções/animais domésticos e promovendo a possível ocorrência e disseminação desta enfermidade.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 1966, por meio da Defesa Sanitária Animal, instituiu o PNCRH o Programa Nacional de Combate à Raiva dos Herbívoros, com o objetivo de promover a vacinação estratégica de espécies susceptíveis e do controle populacional do principal transmissor da doença, o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, associada também a outras medidas profiláticas e de vigilância, visando efetivo controle da ocorrência da raiva dos herbívoros.

Segundo dados oficiais do MAPA, 2017 levando em consideração a subnotificação a estimativa é que a raiva mate em torno de 45 mil bovinos/ano no Brasil, estes números implicam em uma perda econômica de 15 milhões de dólares para o país. Para maiores controles dessa enfermidade e conhecimento epidemiológico da ocorrência

da doença no país é importante que os casos sejam notificados aos órgãos de defesa e a adoção das medidas de prevenção estabelecidas pelo PNCRH por meio da estratégia de vacinação, pois a ausência de vacinação e a não notificação dos casos pode colocar a saúde pública em risco.

Uma pesquisa divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE 2019 o Brasil alcançou o marco de 214.893.800 de cabeças de gado, situação a qual mantém o Brasil como o segundo maior rebanho bovino do mundo. No que se refere ao estado da Bahia, este em 2019 alcançou o número de 10.214.863 cabeças de gado. Os maiores rebanhos bovinos da Bahia, em 2019, estavam em Itamaraju (172,9 mil cabeças), Itanhém (153,6 mil) e Guaratinga (148,5 mil). O Recôncavo Baiano é um importante território na produção de bovinos, principalmente com o perfil da agricultura familiar, em 2016 alcançou o número de (194,962 mil) bovinos em todo o território.

Com base na avaliação sorológica dos animais vacinados com a vacina comercial testada, indicada pela curva de imunidade humoral, foi possível verificar se a vacina induz resposta com títulos adequados para imunização dos animais, por meio do método de sorologia para quantificação de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva em bovinos, vacinados em dose única, pela via subcutânea, baseados nos títulos de anticorpos neutralizantes antirrábico dos animais por um período de 1 ano.

Estudos que vise avaliar a eficácia e segurança das vacinas comercializadas e a adoção de métodos que estimulem as boas práticas de aplicação dos imunizantes fortalece as estratégias de controle dessa enfermidade estabelecidas pelo programa (PNCRH) bem como os órgãos de Defesa Animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta imune humoral e acompanhar os parâmetros clínicos de bovinos vacinados com uma vacina comercial antirrábica inativada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

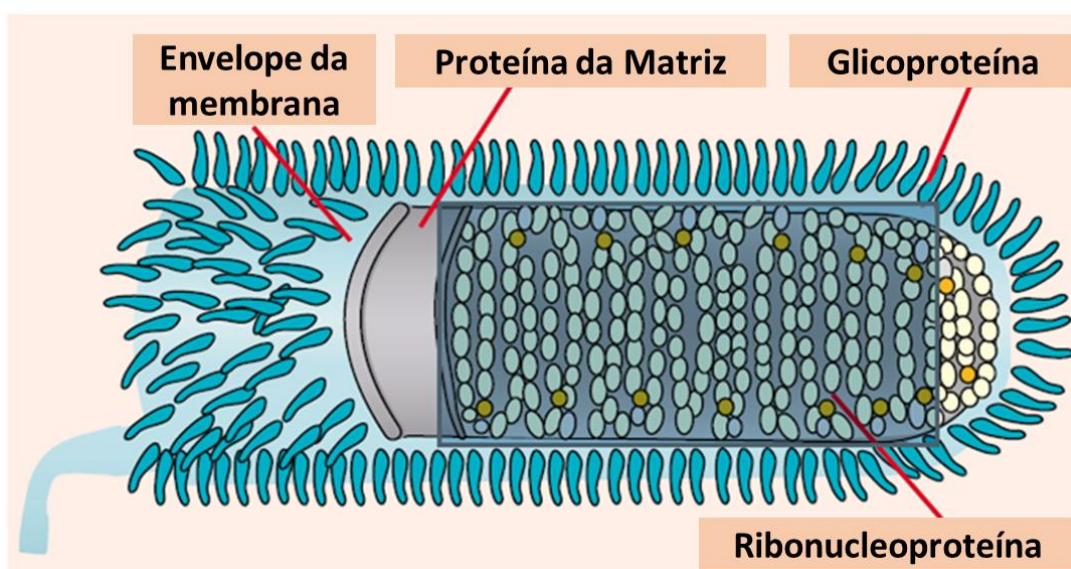
- Determinar os níveis de anticorpos IgG em diferentes momentos após a vacinação utilizando a técnica de Inibição de Focos de Fluorescência Rápida.
- Confirmar a duração da imunidade pelo período de um ano.
- Avaliar os parâmetros clínicos dos animais durante o período experimental.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICA DO AGENTE ETIOLÓGICO

O vírus da Raiva pertence à família *Rabdoviridae*, do gênero *Lyssavirus*. (JOHNSON et al., 2010) é um vírus envelopado RNA negativo, com conformação projétil, que leva a um quadro de encefalite aguda. O genoma é de aproximadamente 12 kb, e codifica cinco proteínas: nucleoproteína (proteína N de 57 a 62 kDa), fosfoproteína (proteína NS ou M1 de 35 a 41 kDa), polimerase (proteína L de 190 kDa), proteína da matriz (proteína M ou M2 de 22 a 25 kDa), e glicoproteína (proteína G de 65 a 80 kDa), o diâmetro da partícula viral varia de 45 a 100 nm (Figura 1) (FAUQUET et al., 2004). Sua transmissão está relacionada a indivíduos susceptíveis por meio de contato com saliva do animal infectado, pela mordedura ou arranhões (KING et al., 2012). Os morcegos são os principais reservatórios para *Lyssavirus*, e estes são os animais que possuem estreita relação com a manutenção do patógeno no meio ambiente (WANG; COWLED, 2015). A raiva possui duas formas epidemiológicas diferentes, a raiva urbana, tendo como principais reservatórios, os cães e os gatos domésticos, e o morcego hematófago como principal reservatório do agente na raiva rural e silvestre (NÚÑEZ et al., 2012).

Figura 1 – Imagem ilustrativa de um *Lyssavírus* com marcadores típico, mostrando uma visão generalizada do genoma e antígenos virais.



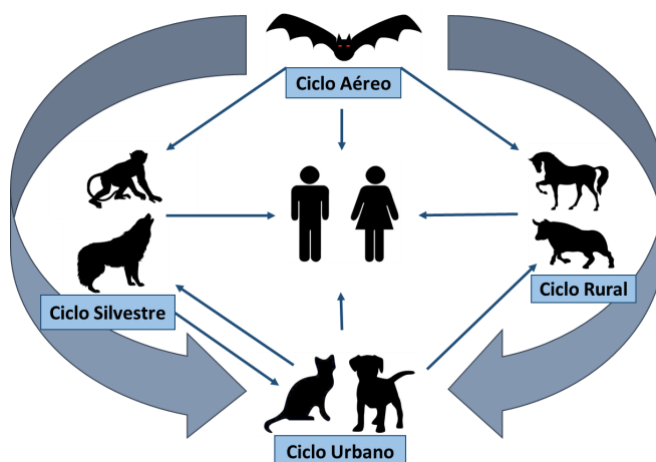
Adaptado de Rupprecht et al. (2002).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A raiva é uma doença infecciosa que apresenta distribuição mundial, esta ocorre de maneira endêmica em diversos países do mundo (TAKAOKA et al., 2003). Na Figura 2 observa-se que o vírus da raiva é mantido no ambiente por meio de quatro ciclos: ciclos urbano, rural, silvestre e aéreo (GOMES et al., 2012). No ciclo rural, este tem como principal reservatório o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) e caracteriza-se pela transmissão da raiva aos herbívoros domésticos de interesse econômico, que são eles: bovinos, equídeos, caprinos, ovinos e suínos. Além dos impactos econômicos à agropecuária, este ciclo como também, o ciclo urbano representa um risco à saúde pública, devido à possibilidade de transmissão aos seres humanos, ao manipular animais infectados (KOTAIT et al., 2009).

No ciclo silvestre, o vírus pode utilizar como reservatórios diferentes espécies, as quais podem variar de acordo a fauna da região, no Brasil os hospedeiros naturais são: raposa cinzenta (*Dusicyon vetulus*), jaritacas (*Conepatus sp.*), guaxinins (*Procyon sp.*) e saguis (*Calithrix sp.*) entre outras diversas espécies de morcegos não hematófagos e cachorros do mato (BRANDÃO, 2010). Faz parte do ciclo aéreo os morcegos hematófagos e não hematófagos. Os quais podem manter o vírus rábico como reservatórios naturais, transmitindo a doença de um para outro, sendo estes hematófagos ou não, pois todas as espécies são susceptíveis à raiva (KOTAIT et al., 2009). Os morcegos, assim como os mamíferos, após apresentarem os sinais clínicos, evoluem para a morte (BABBONI; MODOLO, 2011).

Figura 2 – Esquema demonstrando os principais ciclos epidemiológicos da raiva, suas possíveis inter-relações e seus principais vetores.



Adaptado do Guia de Vigilância Epidemiológica, 2005.

De acordo a OMS, cerca de 55.000 pessoas morrem da doença no mundo por ano (WHO, 2010). No Brasil Anualmente cerca de 400.000 pessoas procuram atendimento médico após suposta exposição aos vírus, sendo que deste total 64% recebem esquema de profilaxia de pós-exposição. Ainda assim, no país, 574 casos humanos ocorreram no período 1990 a 2009 (BRASIL, 2011).

Em 2019, no Rio Grande do Sul, foram registrados 617 coletas em animais possivelmente transmissores do vírus da raiva, dos quais foram examinados o material biológico de 54 caninos, 55 felinos, 132 bovinos, 22 equinos, 1 suíno, 2 bubalinos, 18 primatas, 328 morcegos e 5 outros silvestres (3 gambás e 2 ratão-do-banhado). Destes, 59 testaram positivo para a Raiva, distribuídos em 54 bovinos, 01 equino e 04 morcegos, estes resultados demonstram o aumento sem precedentes dos casos de raiva nesta região. A análises de amostras de morcegos suspeitos como esta realizada no RS, representa uma ferramenta importante para os órgãos de vigilância quanto ao conhecimento epidemiológico da raiva e as variantes circulantes, sendo no RS as mais predominante de morcegos (variante 3, característica de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* e variante 4, característica de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*) (CEVS/RS, 2020).

Segundo o Ministério da Saúde (2011), até as décadas de 80 e 90, o cão (*Canis familiaris*), era o principal agente transmissor da doença, contudo este cenário mudou depois das intensas campanhas de vacinação dos cães domésticos, passando então o status de principal transmissor atualmente para os morcegos, e estes passou a ter maior importância no ciclo de transmissão da raiva, devido ao aumento do número de casos humanos gerados por acidentes no país. A mudança no perfil epidemiológico da doença pode ser explicada por vários fatores, como a expansão das áreas urbanas, o desmatamento, a falta de planejamento da arborização urbana, entre outros fatores ambientais.

Em 2018, no estado da Bahia, até 4 de dezembro, foram diagnosticados pelo LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública, 26 casos de raiva animal: 13 Bovinos, 2 Equinos, 2 Caprinos, 7 morcegos não hematófagos e 2 Raposas (Cachorro-do-Mato - *Cerdocyous thous*). No mesmo ano na BA foram notificadas 44.739 casos de agressão por animais, 32.386 esquemas profiláticos pós exposição foram indicados para raiva em todo o estado. O esquema mais indicado pelas unidades de saúde foi

observação do quadro clínico e vacinação, com 22.718 (70,15%) indicações, sendo que destes 99,9% das pessoas fizeram uso de imunobiológico (vacina e/ou vacina + soro). O último caso de raiva humana transmitida por cão na Bahia ocorreu em 2004, no município de Salvador. Em 2017, ocorreu outro caso, que evoluiu para óbito, em humano, desta vez provocada pela mordedura de morcego (variante 3 *Desmodus rotundum*), no município de Paramirim (DIVEP/BA, 2019).

Atualmente estão disponíveis comercialmente uma variedades de vacinais antirrábica, as quais é bastante utilizadas no Brasil, principalmente nas regiões endêmicas. Porém as normas dos fabricantes não são atendidas na maioria dos casos, a ausência ou implantação de protocolos incorretos de administração indica grande probabilidade da ocorrência dos casos mesmo em rebanhos vacinados (LIMA et al., 2005; FILHO et al., 2010; JOHNSON et al., 2014).

3.3 RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL

O sistema imune (SI) é o responsável pela defesa do organismo frente a microrganismos invasores, sendo composto por diversos mecanismos complexos, que pode ser basicamente dividido em duas principais fases de defesa, o sistema imune inato (SII) e o sistema imune adaptativo (SIA). O SII é o primeiro a ser acionado frente a invasão por algum patógeno e na grande maioria das vezes consegue eliminá-los. O SII não possui memória, portanto toda infecção é tratada como única, independentemente da virulência do patógeno ou frequência com que ele invade o organismo, a resposta inata será sempre na mesma intensidade e duração. Quando a infecção não é eliminada por nenhum dos mecanismos da resposta inata, células e fluídos acumulados nos tecidos são drenados até os nódulos linfáticos locais, onde então se inicia a resposta imune adaptativa. Tendo as células apresentadoras de antígenos como o elo entre o SII e o SIA (TIZARD, 2014; GUTIÉRREZ et al., 2015).

No caso dos microrganismos conseguirem ultrapassar o SII, o SIA entra em ação, este segundo sistema possui respostas altamente específicas frente aos invasores e possui a capacidade de induzir resposta de memória no organismo do indivíduo. Os componentes deste sistema tratam-se de células como os monócitos, fagócitos e as

Natural killers (NK); e também de fatores solúveis, que são o sistema complemento e algumas citocinas (ZINKERNAGEI, 2003). A associação dos componentes do SIA conseguem reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (RRP), como os receptores *Toll-like* (TLRs) (CRUVINEL et al., 2010). Uma vez identificados os PAMPs, é desencadeada uma série de mecanismos: fagocitose, ativação do sistema complemento, resposta inflamatória e eliminação de células danificadas pela ação do patógeno, por meio das células NK (GUTIÉRREZ et al., 2015).

O vírus rábico induz tanto a resposta imune celular e quanto a resposta humoral. Os anticorpos neutralizantes são direcionados principalmente a dois grupos de proteínas antigênicas: a proteína N, específica para o grupo viral, e a glicoproteína G, específica para o tipo viral (WAGNER; ROSE, 1996). A infecção pelo vírus da raiva resulta em uma geração de células T CD4+ e CD8+ vírus-específicos. A proteína G é um dos antígenos que induzem a resposta de Linfócitos T citotóxicos. Este evento indica uma resposta imune celular pois se referem aos linfócitos T. Essas células se diferenciam em dois tipos celulares que possuem funções distintas, os linfócitos T citotóxico ou CD8+, especialista em identificar e destruir células anormais ou infectadas com microrganismos intracelulares; e o linfócito T auxiliador ou CD4+, que coopera na ativação de linfócitos B e T citotóxicos (JANEWAY, 2001).

Os linfócitos T reconhecem pequenos peptídeos que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos, através de Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Antígenos endógenos são apresentados unidos ao MHC classe I, e então identificados pelos linfócitos T citotóxico. Já antígenos exógenos são associados ao MHC classe 2, presentes na maioria das células nucleadas, e identificados pelos linfócitos T auxiliador (GOLDBERG; RIZZO, 2015).

Ao ser apresentado ao antígeno, o linfócito T auxiliador se diferencia em Th1 e Th2. O linfócito Th1 favorece a imunidade celular por meio da ativação do linfócito T citotóxico, com incremento de reações inflamatórias crônicas e ativação de macrófagos e neutrófilos para que fagocitem células com patógenos intracelulares. O linfócito T citotóxico, que reconheceu o antígeno apresentado pela célula apresentadora de antígenos, é ativado e se transforma em célula efetora de alta capacidade citolítica, tendo o auxílio de Th1. Na sequência, o linfócito T citotóxico se

liga à célula infectada com patógeno intracelular e induz a apoptose por meio da liberação de perforinas e granzimas. O linfócito Th2, por sua vez, favorece a imunidade humoral. Ele se liga ao linfócito B que reconhece o mesmo antígeno específico e estimula a sua diferenciação em plasmócito, produzindo assim anticorpos específicos. Ainda, por meio de secreção de interleucinas, o Th2 ativa mastócitos e eosinófilos (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; GUTIÉRREZ et al., 2015).

A resposta imune humoral é específica para microrganismos extracelulares, sendo o linfócito B a principal célula envolvida. Os linfócitos B conseguem identificar antígenos por meio do Receptor de Antígeno de Linfócito B (RCB). A maioria dos antígenos, ao se ligarem ao RCB, não consegue estimular a diferenciação dos linfócitos B sozinhos. Nesse caso, é necessária a ajuda dos linfócitos T auxiliares e, por isso, esse tipo de antígenos é conhecido como “antígenos T-dependentes”. Sem a ajuda dos linfócitos T auxiliares, a resposta imune gerada é fraca e sem memória. Os plasmócitos possuem a função de secretar no meio extracelular as imunoglobulinas (Igs), também conhecidas como anticorpos, que são glicoproteínas capazes de reagir de forma específica com antígenos de agentes invasores do organismo. A IgG é o anticorpo característico da resposta imune adaptativa secundária; enquanto a IgM é produzida nas respostas primárias. Ambos participam da neutralização e opsonização do antígeno e da ativação do sistema complemento (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

O vírus da raiva ultrapassa o SI do hospedeiro por um longo período e apesar de as proteínas do vírus da raiva serem altamente imunogênicas, nenhuma resposta humoral ou celular pode ser observada durante o estágio de movimentação viral do local de entrada até o SNC, provavelmente porque muito pouco antígeno é liberado para o sistema imune, e ao penetrar nos neurônios torna-se protegido pela bainha de mielina da ação dos anticorpos, das células do sistema imune e dos interferons, responsáveis pela imunidade inespecífica. Durante sua propagação passiva pelos nervos não há produção de anticorpos que possa bloquear seu trajeto rumo ao SNC, inibindo assim toda ação do SII e do SIA em bloquear a infecção e eliminar o patógeno (KOTAIT et al., 2009).

A resposta imune celular é o mecanismo mais importante, as células apresentadoras de antígeno entram em contato com o patógeno o fagocitam e processam para apresentação às células imunes. Esta apresentação é fundamental para a ativação

dos linfócitos T, que vão participar da proteção de diferentes maneiras: ativando o SIA, estimulando as células B para produção de anticorpos; como efetoras de imunidade na forma de células T citotóxicas; induzindo a síntese de substâncias com estimulação de diferentes células; e como células de memória. Porém, a estimulação dos linfócitos B só se dá após o aparecimento dos sinais clínicos. Portanto, a possibilidade de neutralização da capacidade infecciosa viral se dá após a invasão do SNC, neste momento a doença adquire uma forma irreversível (MURPHY et al., 1999; KOTAIT et al., 2009).

As principais células imunes do SNC são as microglias, conhecidas como células sentinelas, estas células atuam como apresentadoras de antígenos e agem induzindo a produção de TNF- α (fator de necrose tumoral) e NO (óxido nítrico) no combate a infecção (RANSOHOFF et al., 2012). As células gliais frente a infecção pelo vírus da raiva induzem uma resposta imune viral clássica com a expressão de IFN- β (Interferon beta) e citocinas inflamatórias. A expressão de citocinas pelas células da glia promove um ambiente citocínico no SNC e conseqüentemente a quebra da barreira hematoencefálica, permitindo assim a entrada de células imunes neste sistema. Estas células são atraídas pelos estímulos das citocinas pró-inflamatórias, sendo este um evento habitual do SNC frente à infecção por este agente, porém os níveis altos destas citocinas podem levar a danos neurais, ao invés de proteger e combater a infecção pelo vírus da raiva desempenha um papel danoso (HOOPER, 2005).

Apesar do organismo não produzir anticorpos no estágio inicial da infecção, os vírus são sensíveis a anticorpos exógenos ou aos previamente produzidos por vacinação. A vacinação e a administração de soro antirrábico, após a exposição do indivíduo ao vírus, são eficazes porque o período de incubação do vírus é longo, havendo uma demora entre a replicação inicial nas células musculares e a chegada do vírus ao sistema nervoso (MURPHY et al., 1999). As vacinas são importantes ferramentas contra doenças infecciosas, e principalmente da raiva que é uma doença infecciosa e letal, auxiliando na proteção de animais e na manutenção da sanidade de rebanhos e segurança a saúde única (GERSHWIN, 1998). São reconhecidas ferramentas de maior sucesso na proteção da saúde pública (ZEPP, 2010). A vacinação consiste na imunização ativa de um indivíduo, por meio da inoculação de um antígeno extraído de

um microrganismo patogênico. A intensão é mimetizar uma infecção natural e promover a imunidade no indivíduo ou atenuação de sinais clínicos de determinada enfermidade. Este processo só é possível devido a memória imunológica do sistema imune adaptativo, o qual é capaz de responder frente a uma segunda exposição ao antígeno de forma mais efetiva e rápida com altos níveis de anticorpos e ativação de células T (TIZARD, 2014).

3.4 RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR VACINA

Após Pasteur, em 1885, realizar o primeiro tratamento pós exposição utilizando uma vacina produzida a partir de medula espinhal de coelhos adultos infectados com o vírus da raiva, parcialmente inativado, o foco passou a ser o desenvolvimento de vacinas cada vez mais seguras. Desde 1911, uma variedade de vacinas veterinárias contra a raiva, atenuadas e inativadas, tem sido usadas no Brasil, com a instauração do PNCRH pelo MAPA em 1966, as campanhas de vacinação foram intensificadas (KOTAIT et al., 1998).

Basicamente existem dois tipos de vacinas, as viva atenuadas e as inativadas. As Vacinas vivas atenuada são elaboradas a partir da modificação de um microrganismo patogênico. Basicamente, os processos de atenuação se baseiam-se na passagem do microrganismo por repetidas culturas, em diferentes condições de temperatura, selecionando populações mutantes menos virulentas. A habilidade de replicação é mantida, porém é eliminada a capacidade de gerar doença (JOSEFSBERG; BUCKLAND, 2012). A resposta imune estimulada pela vacina viral viva atenuada é a mesma desencadeada por uma infecção viral natural. O mesmo não acontece com vírus inativados, uma vez que esses são reconhecidos como antígenos exógenos e estimulam apenas resposta de linfócitos Th2 e linfócitos B (BAXTER, 2007).

A vacina contra raiva é do tipo inativada, este tipo de vacina é produzido a partir da inativação do antígeno patogênico em laboratórios, os antígenos das vacinas inativadas não tem capacidade de se replicar no indivíduo vacinado, devido a isso este tipo de vacina deve conter uma maior concentração de antígenos, sendo também necessário reforço vacinal ou aplicações periódicas para promover a imunidade. A resposta induzida pela vacina é feita pela ativação de linfócitos Th2, que estimula a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, procedendo uma resposta baseada em

anticorpos, este processo dura em média de 5 a 14 dias, porém uma segunda exposição a ativação desses linfócitos de memória acontece de forma mais rápida (GUPTA et al., 1993; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; CHRISTENSEN, 2016).

O perfil de resposta das vacinas inativadas é predominantemente humoral e para que estabeleça a imunidade efetiva no indivíduo vacinado são necessários altos títulos de anticorpos, e para obter essas concentrações de anticorpos circulante se faz necessário a administração da vacina periodicamente. Quando comparadas as vacinas vivas atenuadas, as inativadas podem até ser consideradas inferiores, devido a necessidade de revacinação anualmente, porém são mais seguras, pois não há risco de reversão da virulência mesmo em indivíduos com baixa imunidade e sem riscos biológicos para os profissionais técnicos vacinadores (ZEPP, 2010; PASQUALE et al., 2015). Vacinas são importantes ferramentas contra doenças infecciosas, auxiliando na proteção de animais, na manutenção da sanidade de rebanhos e importante ferramenta na proteção da saúde pública (GERSHWIN, 2018).

3.5 PATOGENIA

A principal forma de transmissão do vírus ocorre quando a saliva do animal infectado penetra na pele ou mucosas por mordedura, arranhadura ou lambedura, transmissão aérea também é possível, por meio de aerossóis (JOHNSON et al., 2006). Ao penetrar no organismo do indivíduo susceptível, os vírus se replicam nas células musculares, próximas ao local da inoculação. Após a primeira replicação os vírus alcançam o SNC, a velocidade de deslocamento dos vírus pelas células nervosas é em torno de 2,5 a 10,0 centímetros/dia. O período de incubação está diretamente relacionado com a carga viral e com a proximidade do local de inoculação do SNC (KOTAIT; CARRIERI, 2004).

Quando os vírus penetram nos neurônios, estes se tornam protegidos, pela bainha de mielina, da resposta imunológica humoral do indivíduo susceptível. A estimulação dos linfócitos B para a produção de anticorpos, na infecção natural, só se dá após o aparecimento dos sinais clínicos, que só vai ocorrer, após a invasão do SNC, quando

a doença já alcançou sua forma irreversível (TAKAOKA et al., 2003; KOTAIT; CARRIERI, 2004).

No SNC, os vírus podem distribuir-se de forma uniforme, porém possuem maior tropismo por algumas regiões, como hipocampo, cerebelo, principalmente nos bovinos, e a coluna vertebral na espécie equina. Após nova replicação, por via neurogênica e de forma centrífuga, disseminam-se por todo o organismo, principalmente glândulas salivares. Nestas, a sialorreia é o principal mecanismo de disseminação e perpetuação do vírus na natureza, do início dos sinais clínicos ao óbito decorrem poucos dias evoluindo de forma rápida (SCHEFFER et al., 2007).

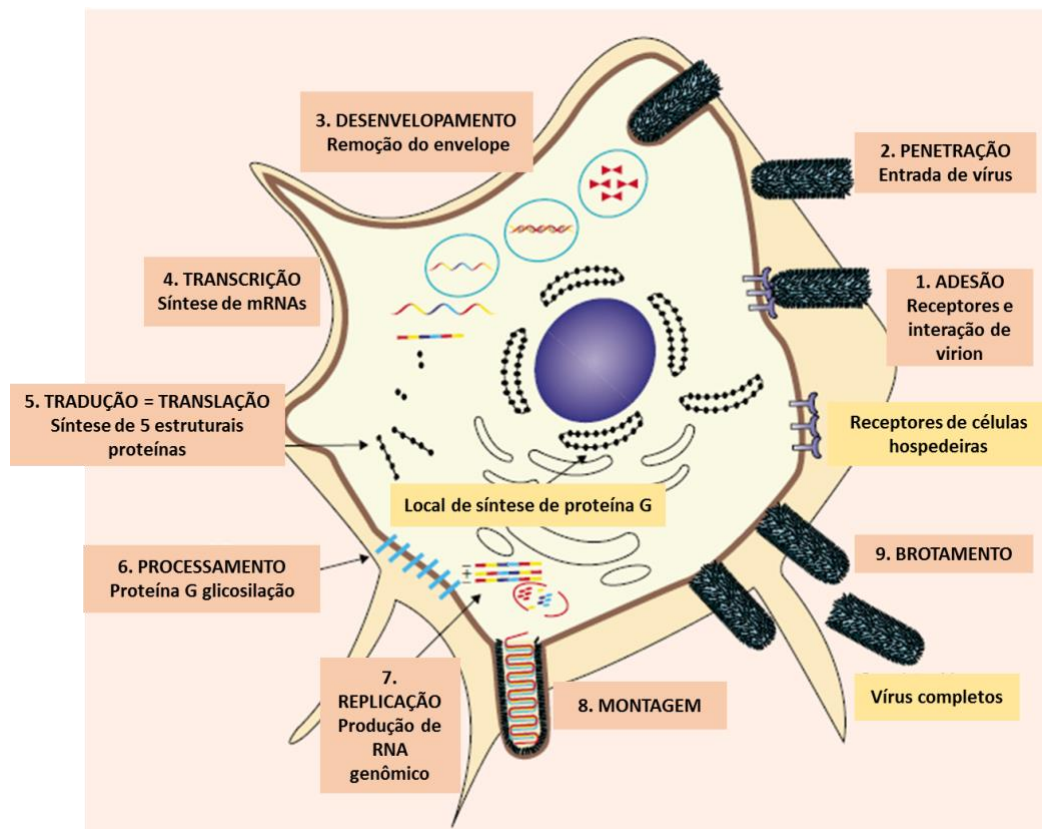
O período de incubação da raiva pode ter variações por diversos aspectos, como já citados anteriormente, bem como este período também pode variar entre as espécies, nos cães e gatos domésticos o período médio de incubação (PMI) é de 15 dias a 2 meses, nos herbívoros domésticos (bovinos, equinos, caprinos e ovinos) PMI pode chegar a 1 mês a 3 meses, com variação de tempo de 25 a 150 dias; para os animais silvestres o PMI ainda é indeterminado (ACHA; SZYFRES, 1986). Um fato importante no curso natural da doença é o seu período de transmissibilidade, caracterizado pelo período em que há eliminação dos vírus antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos. Nos cães e gatos este período foi muito estudado, sendo em geral de dois a quatro dias enquanto para as demais espécies suscetíveis ainda não estão elucidados o período de transmissibilidade (TAKAOKA et al., 2003).

As etapas da interação do vírus da raiva na célula hospedeira são: Adesão, penetração, transcrição, translação, processamento, replicação, montagem e brotamento, no qual se tornam completos e estão prontos para infectar as células adjacentes (RUPPRECHT et al., 2002). A proteína G viral é responsável pelo processo de ligação, levando a fusão e internalização com a célula do hospedeiro. Após o processo de adesão à célula do hospedeiro o vírus penetra na célula por endocitose, passando por um processo de englobamento da membrana celular, que é caracterizado pela formação de vesículas. Lisossomos fundem-se as vesículas contendo o vírus, liberando ribonucleoprotéico (RNP) viral no citoplasma celular iniciando então o processo de replicação. Uma vez no interior da célula, iniciado o processo de transcrição do genoma viral, é necessário que ocorra a replicação do

genoma viral para formar os novos vírus, isso se dá somente após a tradução dos mRNAs (COLL, 1995; TORDO, 1996; THOULOZE et al., 1998;).

O genoma é traduzido nas proteínas N (Nucleoproteína), P (Fosfoproteína), M (Proteína da matriz), G (Glicoproteína) e L (Polimerase), a proteína N no interior do citoplasma regula o evento de passagem do processo de transcrição para replicação, o primeiro passo na replicação é a síntese de cópias de todo o genoma viral, estas cópias servirão de molde para a síntese de novos genomas que irão fazer parte dos novos vírus a serem formados. No processo de montagem, um complexo formado pelas proteínas N, P e L promove a encapsidação dos novos genomas. A proteína M envolve a RNP; esse complexo vai para uma área da membrana plasmática e a M inicia o enovelamento da partícula, a seguir, as partículas ligam-se à membrana celular, que dará origem ao envelope no qual foram inseridas moléculas da glicoproteína G; tendo início o brotamento, que irá liberar novos vírus (SUGAMATA et al., 1992; WHO, 2004) (Figura 3).

Figura 3 – Fluxo conceitual de recepção, entrada, transcrição, tradução, replicação e saída de *Lyssavirus* de uma célula hospedeira generalizada.



Adaptado de Rupprecht et al. (2002).

3.6 SINAIS CLÍNICOS

Há três tipos de raiva nos animais domésticos, sendo elas: furiosa, parálitica e a muda ou atípica, o quadro clínico da doença ainda pode ser subdividido em cinco fases: incubação, prodrômica, neurológica aguda, coma e morte (CORRÊA; CORRÊA, 1992; HANKINS; ROSEKRANS, 2004). É importante ressaltar que os sinais clínicos aparecem somente após a invasão do SNC, após esse quadro a morte ocorre, e esta é inevitável. Além de que antes de apresentar os sinais clínicos, o animal pode estar eliminando vírus pela saliva, sendo importante está atento a contatos e agressões ocorridas também durante este período, pois pode levar à transmissão da doença (DOGNANI, 2014).

A raiva pode apresentar vários sinais clínicos, o que a torna difícil o diagnóstico diferencial. Dentre os sinais clínicos incluem-se alterações de comportamento, depressão, agressão, dilatação da pupila, fotofobia, hidrofobia, descoordenação muscular, salivação excessiva, dificuldade em engolir devido à paralisia da mandíbula, paralisia dos músculos cranianos. Os sinais clínicos da raiva são similares na maioria das espécies, sem grandes variações entre os indivíduos (DUARTE; DRAGO, 2005).

Quadro 1 – Curso da doença em algumas espécies animais.

Espécie	Forma	Período	Sinais clínicos
Canina	Furiosa	Melancólico	Tristeza, reflexos lentos, isola-se evitando luz intensa e ruídos.
		Excitação	Inquietação intensa, acessos de fúria, apresenta-se violento e agressivo, podendo se automutilar, há a paralisia da maxila.
		Depressão	Espasmos dolorosos dos músculos da faringe quando bebem (hidrofobia), progresso degenerativo de medula terminando em paraplegia. A morte pode ocorrer por falha respiratória ou cardíaca e mais comumente ocorre o coma.
	Muda ou Parálitica	*****	Ficam em depressão, tendendo a ficar isolados, há hidrofobia, paralisias surgem prematuramente, assim como a morte.
	Atípica	*****	Ocorrem grandes modificações dos períodos característicos da doença, como paralisias limitadas, ou de uma morte sem paralisia.
Felina	Idem canina	*****	A evolução é muito semelhante à do cão, mas na fase furiosa, o animal é muito mais

			agressivo do que o cão e tem maior tendência para esconder-se em locais isolados.
Equina	*****	*****	Manifesta-se por inquietação, excitação e forte prurido no local da mordedura. Tem atitude agressiva e forte tendência para morder, o que os leva à automutilação. No termo da evolução da doença o animal apresenta paralisia progressiva, dificuldade em engolir e febre.
Ruminantes e suínos	Paralítica	*****	Não há excitação, mas há manifestações próprias de cada espécie. Não tendem a morder. Ocorre elevada salivação, sufocação, ausência de ruminação e paralisia dos membros posteriores.
Selvagens	*****	*****	Principal característica é a perda de medo de seres humanos podendo apresentar-se anormalmente dóceis.

Adaptado de Duarte; Drago (2005).

3.7 DIAGNÓSTICO

A avaliação clínica é importante no diagnóstico da doença, faz-se necessário o conjunto de todas as informações, para o direcionamento de uma técnica diagnóstica mais indicada e para análises epidemiológicas da doença, com a realização de anamnese, avaliação dos sinais clínicos, obtenção de informações sobre possíveis exposições, bem como os fatores de risco e a situação epidemiológica de região (CORRÊA; CORRÊA, 1992). O diagnóstico laboratorial é fundamental para confirmação da raiva em casos suspeitos, bem como para diagnóstico diferencial para outras doenças que cursam com quadro neurológicos e encefalites, tornando-se importante para identificação do vírus no ambiente e controle desta doença letal, tanto para os animais quanto para os seres humanos (KOTAIT et al., 2009).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado *ante-mortem* ou *pós-mortem*. Devido ao fato de não haver sinais clínicos ou lesões *pós-mortem* que podem ser consideradas patognômicas da raiva, o diagnóstico definitivo e confiável é o diagnóstico laboratorial (LIMA; GAGLIARI, 2014). O SNC (cérebro, cerebelo e medula) deve ser encaminhado para o laboratório, conservado preferencialmente em refrigeração em até 24 horas ou congelado após este prazo. Na falta de condições adequadas de refrigeração, conservar em solução salina com glicerina a 50%, em recipientes de paredes rígidas, hermeticamente fechados (BRASIL, 2014).

As principais técnicas utilizadas no diagnóstico *pós-mortem* da raiva, são: A técnica histológica pela coloração de Sellers, a imunofluorescência direta (IFD), isolamento do vírus rábico em camundongos e o isolamento do vírus rábico em cultivo celular (CHAVES, 2010; MORAIS et al., 2011; LIMA e GAGLIARI, 2014).

Para o diagnóstico *ante-mortem*, este pode ser realizado pela detecção de antígeno, pelo RNA viral ou pela detecção de anticorpos, utilizando as técnicas de IFD, isolamento viral em camundongos ou em culturas celulares, a Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) e a Soroneutralização (SN), porém o resultado negativo não exclui a presença da doença no indivíduo avaliado (KOTAIT et al., 2009).

A avaliação de títulos de anticorpos a base de testes *in vitro* utilizando células BHK-21 (Baby Hamster Kidney) para a infecção viral, foram desenvolvidos, como o teste Rápido de Inibição de Focos Fluorescentes (RFFIT), (SMITH, YAGER e BAER, 1973), em 1979 Zalan, Wilson e Pukitis a modificou, chamando de Microteste de Inibição de Fluorescência (FIMT), possibilitando o processamento de um grande número de soros. Baseado nestes dados, o Instituto Pasteur, no Estado de São Paulo, referência nacional no diagnóstico da raiva e nas técnicas com base a soroneutralização, desenvolveu um teste Simplificado de Inibição de Focos Fluorescentes (SFIMT) que vem sendo utilizado na avaliação sorológica para raiva, o qual realiza-se testes *in vitro* que avaliam o título de anticorpos neutralizantes utilizando células BHK-21 (Baby Hamster Kidney) (FAVORETTO et al., 1993).

Resumidamente o princípio da técnica SFIMT é baseado inicialmente na inativação do soro, em microplacas de 96 poços adiciona 100 µL de Meio Essencial Mínimo de Eagle, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 µL de suspensão de células BHK-21 e 50 µL de suspensão de vírus da raiva, cepa PV diluídos previamente 1:60. Para controle negativo, utiliza-se células BHK-21 não infectadas. Passam por 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante das placas devem ser aspirado. As placas são colocadas em banho de gelo e as células fixadas com acetona a 80%, gelada, por 15 minutos. Os conjugados devem ser diluídos de 1:5 a 1:640 em tampão PBS, pH 7,4, com corante azul de Evans, e transferidos 40 µL/poço de cada diluição em 8 poços das microplacas com células infectadas com a cepa PV e em 8 poços com células não infectadas. Os títulos dos conjugados são determinados pela leitura

em microscópio invertido de fluorescência, filtro ultravioleta, com aumento de 100x. São considerado o título a maior diluição que apresente o máxima fluorescência específica. No controle negativo não se observa quaisquer traços de fluorescência. (BRASIL, 2008).

Este é o teste sorológico, mais sensível e específico para avaliação do status sorológico de indivíduos submetidos à vacinação por meio de detecção de anticorpos antirrábicos. A técnica é baseada na mistura de uma quantidade conhecida de vírus em diluições do soro a ser testado, a qual na presença de anticorpos específicos no soro, o vírus é neutralizado. A neutralização viral ocorre quando há perda da capacidade infectante da partícula viral pela reação com um anticorpo específico. Para os indivíduos vacinados, os títulos que apresentar valores $\geq 0,5$ UI/mL são considerados níveis satisfatório para proteção e insatisfatória, os títulos com resultados $< 0,5$ UI/mL (OIE, 2005).

Estudos voltados para epidemiologia da raiva associados com a biologia molecular demonstrou resultados positivos, devido a aplicação de anticorpos monoclonais que possibilita a identificação das características dos padrões antigênicos das diferentes cepas rábicas. A investigação de surtos epidêmicos e reconhecimento das cepas endêmicas promove a descoberta de fontes de infecção de casos isolados em áreas de controle e a diferenciação dos sorotipos do vírus. Sendo a técnica PCR um método alternativo eficiente para estudos diagnósticos e epidemiológicos do vírus da raiva, permitindo identificar as diferenças entre as cepas (GERMANO, 1994; KIMURA, 2006). Casos de raiva em herbívoros domésticos devem ser notificados imediatamente às autoridades dos órgão de defesa agropecuária para o desencadeamento das ações de controle como indicação de vacinação nos rebanhos, captura e combate aos morcegos hematófagos e educação sanitária (BRASIL, 2005).

3.8 PROFILAXIA E PREVENÇÃO

Não há tratamento para a raiva. A profilaxia deve ser realizada por meio de programas de erradicação e controle da raiva urbana; controle da raiva silvestre; medidas de transporte internacional de animais e procedimentos de vacinação prévia e de pré e

pós-exposição em humanos, bem como informações a população sobre a transmissão, conscientizando para que apoie as medidas estabelecidas pelos órgãos de defesa. Além do cuidado especial no manuseio de animais silvestres, principalmente os morcegos e obviamente procurar os serviços de saúde em caso de acidente com esses animais (BRASIL, 2009).

Por ser uma doença sem tratamento, a profilaxia, por meio da vacinação, é a maneira mais adequada de prevenção (ACHA; SZYFRES, 1986). O Capítulo III Artigo 8º do PNCRH destaca que nas áreas de ocorrência de raiva, a vacinação será adotada sistematicamente, em bovídeos e equídeos com idade igual ou superior a 3 meses, sob a supervisão do Médico Veterinário. O controle das populações de morcegos hematófagos são baseados na estratégia de aplicação de uma pasta contendo uma substância anticoagulante, a qual é aplicada topicamente em morcegos capturados e posteriormente liberados para retornar a sua colônia. Como os morcegos têm o hábito de limparem-se mutuamente, principalmente as fêmeas, o anticoagulante aplicado deverá levar à eliminação de vários indivíduos na colônia (BATISTA et al., 2007).

Soluções efetivo para controle da raiva dos herbívoros, requer a ação coletiva de diferentes organização e representações sociais da comunidade. Com utilização de ações educativas dos profissionais envolvidos com o programa e dos profissionais Médicos Veterinários atuante, para incentivar a mudança de comportamento do pecuarista, para que passe a comunicar ao Serviço de Defesa Sanitária Animal mais próximo da sua propriedade sobre a suspeita de raiva ou sobre a espoliação produzida por morcegos hematófagos; vacinar o rebanho, quando necessário; aplicar substância vampiricida ao redor das lesões recentes nos herbívoros, provocadas por morcegos hematófagos; comunicar a morte dos animais aos médicos veterinários dos serviços oficiais, são atitudes fundamentais que faz a diferença no controle da enfermidade (BRASIL, 2009).

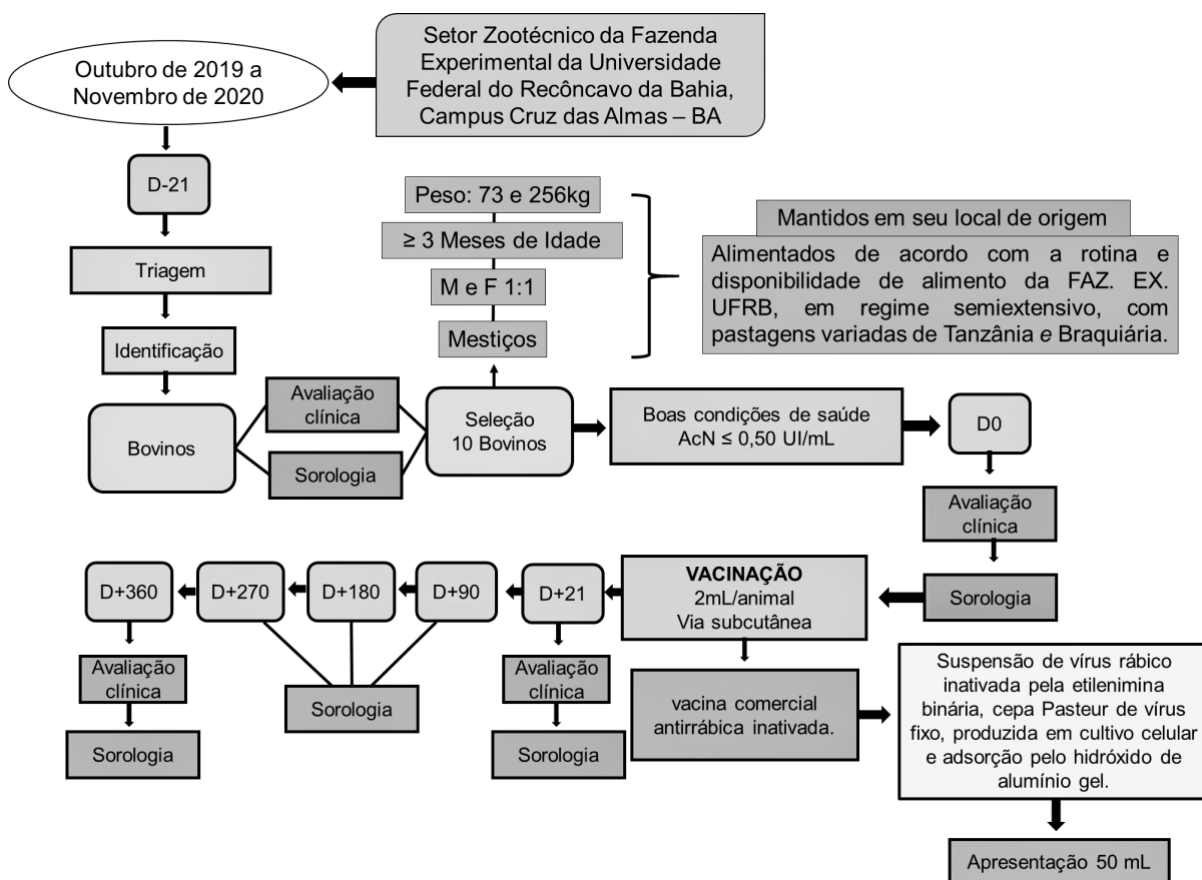
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pela CEUA – UFRB, sob registro de N°. 23007.00016332/2019-69 em 29/08/2019.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 4 – Fluxograma: Grupo, número de animais, dose, via de administração, formulação, exame clínico e sorologia.



4.2.1 Local

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas - BA, de outubro de 2019 a novembro de 2020, a cidade está localizada no território de identidade Recôncavo. Posições

geográficas: Latitude: 12° 39' 11" Sul, Longitude: 39° 7' 19" Oeste. Possui uma população de 63.591 habitantes, com área total de 139,117 km² (IBGE, 2020). Apresenta um clima tropical quente e úmido com temperaturas em torno de 25°C. As chuvas são mais frequentes nos períodos de outono e inverno, registrando uma pluviosidade média de 2 mil milímetros anuais (SEI - BA, 2010).

4.2.2 Animais

Os animais utilizados neste estudo são de propriedade da Fazenda Experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB. Foram utilizados 10 bovinos (*Bos taurus*) mestiços, sendo cinco machos e cinco fêmeas, com idade ≥ 3 meses, com peso entre 73 e 256 kg, em boas condições de saúde, sem indicativo de doença e sorologia negativa para a raiva (anticorpos vacinais $\leq 0,5$ UI/mL) (realizada no dia D-21). Em seguida, os 10 animais foram vacinados. Após o término do estudo todos os animais permaneceram nas instalações da Universidade, de volta a rotina habitual.

4.2.3 Manejo dos animais durante a fase experimental

Os animais foram identificados através de brinco com numeração e permaneceram nos seus locais de origem para não alterar o manejo e não causar nenhuma interferência nos resultados da pesquisa. Foram alimentados de acordo com a rotina e disponibilidade de alimento da Fazenda Experimental da UFRB, onde foram mantidos em pastos e ofertada água *ad libitum* e ração concentrada formulada. O período experimental foi compreendido do dia D-21 ao D+360. Os bovinos foram mantidos em pastoreio de regime semiextensivo, com pastagens variadas de Tanzânia (*Megathyrus maximus*), Massai (*Panicum maximum*) ou Braquiária (*Urochloa brizantha*), compreendendo uma área de 150,0 hectares. Durante o manejo do estudo, os animais estavam soltos para pastejo e foram recolhidos para o curral de alvenaria e madeira, com área de 60m² (30 m x 30 m) para realizações das avaliações objetivadas no estudo (Figura 5). Durante todo o período experimental, os animais passaram por acompanhamento quanto ao bem-estar animal, conforme preconiza o

Guia Brasileiro de Produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica (CONCEA, 2016a, b).

Figura 5 – Instalações experimentais dos bovinos no setor zootécnico da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus Cruz das Almas – Ba.



Quadro 2 – Identificação dos bovinos selecionados nas análises experimental.

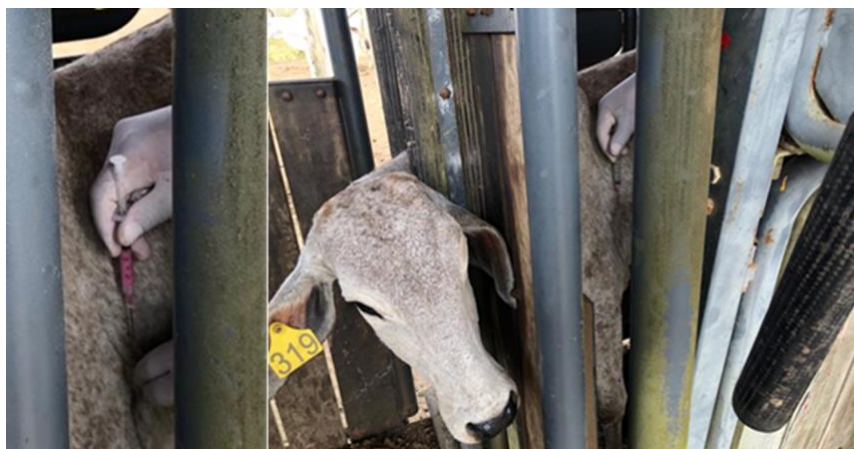
Identificação	Animal	Sexo	Idade	Peso (Kg)	Identificação	Animal	Sexo	Idade	Peso (Kg)
294	1	F	1a 4m	256	319	6	M	7m	73
308	2	F	1a 1m	165	337	7	M	7m	125
295	3	F	1a 4m	242	325	8	M	8m	224
311	4	F	1a 5m	233	327	9	M	4m	146
332	5	F	6m	135	324	10	M	4m	145

M – Macho; F – Fêmea; a – Ano; m – Meses

4.2.4 Vacina

Foi utilizada uma vacina contra a raiva indicada para herbívoros denominada Vacina Antirrábica Inativada LABOVET¹, produzida pelo LABOVET Produtos Veterinários LTDA, BA, Brasil, sendo formada de suspensão de vírus rábico inativada pela Etilenimina Binária (BEI), cepa Pasteur de vírus fixo (PV), produzida em cultivo celular e adsorção pelo hidróxido de alumínio gel. A partida utilizada foi a de nº 011/19, apresentação em 50 mL e data de fabricação em Julho de 2019. Via de administração: Subcutânea (Bovino, Caprino, Ovino) e intramuscular (Equino); Conservar em temperatura de 2°C a 8°C/não congelar (Figura 6).

Figura 6 – Administração da vacina comercial antirrábica inativada testada, por via subcutânea em bovinos.



4.2.5 Avaliação clínica pré e pós-vacinação

Foi realizado exame físico individual (temperatura retal, frequência respiratória e cardíaca, avaliação do sistema linfático, nervoso, dentre outros) em todos os animais antes de cada colheita de sangue, ou seja, nos dias D-21, D0, D+21 e D+360 (Figura 7). Os exames clínicos avaliaram os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (bpm), realizada através de ausculta com estetoscópio, no tempo de um minuto; frequência

¹ Vacina Antirrábica Inativada LABOVET. LABOVET Produtos Veterinários Ltda. Av. Banco do Nordeste, 455 Centro Industrial Subaé. Feira de Santana - Bahia. CEP: 44010665. Telefone: (75) 3612-4700. www.labovet.com.br.

respiratória (mpm), realizada a partir da contagem do número de movimentos torácicos e abdominais realizados pelo animal, no tempo de um minuto; temperatura retal (°C), aferida através de termômetro digital; motilidade ruminal, realizada através da ausculta por 2 minutos e verificação de sintomas compatíveis com intolerância ou intoxicação sistêmica (FEITOSA, 2014). A alteração deveria ser investigada conforme sistema alterado (digestório, cardiocirculatório, respiratório, genito-urinário, nervoso, locomotor e tegumentar).

Figura 7 – Realização do exame clínico nos bovinos.



4.2.6 Exames sorológicos

As amostras de soro obtidas foram mantidas em congelamento a -20°C até as análises (Figura 8). A dosagem sérica de anticorpos neutralizantes para a raiva foi realizada pelo Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência (SFIMT). As provas

sorológicas para detecção de anticorpos no soro dos animais que receberam uma dose da vacina comercial antirrábica inativada foram realizadas pelo Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur, (São Paulo-SP). Foi considerado título protetor os animais que obtiveram anticorpos antirrábicos neutralizantes $\geq 0,5$ UI/mL conforme recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018) e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2008). Para a quantificação das ocorrências do título protetor foi considerado as distribuições de frequências das respostas e as porcentagens de variação entre os períodos de colheitas sorológicas em relação ao momento inicial.

Figura 8 – Colheita de sangue em bovinos para realização da análise sorológica.



4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental foi longitudinal composto por um grupo experimental, avaliado em sete momentos (D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360) em um período, com dez repetições e um animal considerado como unidade experimental. O procedimento estatístico inferencial utilizado foi o teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (GOODMAN, 1964), e como procedimento descritivo distribuição de frequências e tabelas, ao nível de significância de 5%. Os parâmetros relativos às avaliações sorológicas foram definidos pelas análises sorológicas. A eficácia do produto foi determinada com base no título protetor dos animais que obtiverem anticorpos antirrábicos neutralizantes $\geq 0,5$ UI/mL (OMS, 1992).

A curva sorológica determinou o período de imunidade preconizado pela vacina. Os dados das funções fisiológicas foram analisados por estatística descritiva, computando-se os intervalos delimitados por média \pm desvio padrão, e análise estatística com auxílio do programa *Graphpad Prism* 5.00.288, nos momentos D-21, D0, D+21 e D+360. A primeira etapa do cálculo estatístico consistiu em verificar se a distribuição dos dados seguia uma distribuição Gaussiana (normal ou paramétrica) ou não Gaussiana (não normal ou não paramétrica). Para tal, o teste de normalidade de D'Agostino e Pearson *omnibus normality test*. foi aplicado, com nível de significância definido em 5% ($p < 0,05$). Foi realizada a análise estatística nos diferentes tempos de avaliação utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett para dados paramétricos e, para dados não paramétricos utilizou o teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns. A diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi menor do que 5% ($p < 0,05$). Para os parâmetros relativos às avaliações sorológicas, foi realizada estatística descritiva em todos os momentos do estudo D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270, D+360.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS

As análises observacionais por meio dos exames físicos realizados indicaram que os animais mostraram comportamento, saúde e atitude condizentes com a espécie, categoria e condições de manejo estabelecidas para este estudo. Adicionalmente, nenhum evento adverso foi observado. Os exames clínicos realizados nos 10 animais individualmente não apresentaram alterações significantes em relação ao uso da vacina ou em decorrência de quaisquer outra patologia, baseado nos parâmetros fisiológicos avaliados como: frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal (°C) e motilidade ruminal, os principais achados do exame físicos podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 – Médias \pm desvios padrão dos parâmetros fisiológicos dos bovinos antes e após a aplicação da vacina.

AVALIAÇÃO CLÍNICA				
Tempo (dia)	Frequência cardíaca (bpm)	Frequência respiratória (mpm)	Temperatura retal (°C)	Motilidade ruminal (m/2min)
D-21	77,4 ^a \pm 11,0	34,9 ^a \pm 6,5	39,6 ^a \pm 0,4	2,00 ^a \pm 0,8
D 0	76,2 ^a \pm 12,8	24,4 ^b \pm 3,6	37,3 ^b \pm 3,1	1,2 ^b \pm 0,4
D+21	90,2 ^a \pm 15,9	33,6 ^a \pm 9,4	39,2 ^a \pm 0,6	1,9 ^a \pm 0,7
D+360	65,0 ^a \pm 6,2	21,4 ^b \pm 2,7	39,0 ^a \pm 0,5	1,7 ^a \pm 0,5
Valor de referência**	60 – 100	10 – 30	38,5 a 39,5	2 – 4

bpm: batimentos por minuto; mpm: movimentos por minuto, m/2min: motilidade em dois minutos. *Aplicação do teste ANOVA. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste ANOVA ao nível de 5% de probabilidade **FEITOSA, 2014.

Na (Tabela 1), a análise estatística da frequência cardíaca demonstrou que não houve diferença entre as médias para os dias avaliados, o que demonstra que os valores obtidos antes e após a administração da vacina foram semelhantes. Para o parâmetro frequência respiratória, a análise estatística demonstrou diferença entre os tempos, os valores obtidos nos dias D0 e D+360 foram diferentes dos obtidos nos tempos D-21 e D+21. Como os valores do D0 foram obtidos antes da administração da vacina, a diferença observada não tem relação com sua administração. Além disso, a frequência respiratória está sujeita a alterações pela resposta aos exercícios físicos,

medo, excitação, estado fisiológico e fatores ambientais como temperatura e umidade do ar (FERREIRA, 2006).

Quanto a temperatura, a análise estatística demonstrou que apenas os resultados do D0 foram diferentes dos obtidos nos outros dias avaliados. A alteração observada também não indica alteração causada pela vacina, já que os dados foram obtidos antes da administração. Segundo Ferreira (2006), a temperatura da superfície corporal é dependente das condições climáticas do ambiente, sendo influenciada pela temperatura ambiental, umidade relativa do ar, velocidade do ar e pelas condições fisiológicas como vascularização e sudorese. Em relação ao parâmetro motilidade ruminal, também foi observado diferença entre os resultados apenas do D0, antes da aplicação da vacina, o que indica que a diferença observada não pode ser relacionada a sua administração. A frequência respiratória aumentada por um período pode ser induzida por um método fisiológico compensatório de perda de calor, caso esse mecanismo seja exigido por um período prolongado, pode interferir na ingestão de alimentos e na ruminação, proporcionando alterações no grau e no número de motilidade ruminal (ROSSAROLLA, 2007).

Os parâmetros observados no ponto D0 pode estar relacionado ao manejo, visto que todos os parâmetros nesse dia estão mais baixos dos valores de referências estabelecidos no experimento, como já citado anteriormente, essa variação pode estar relacionada a fatores ambientais e não necessariamente a indicativo de doença. Esse tipo de estudo realizado a campo, está sujeito a interferências de algumas variáveis como: clima, manejo e mudança da rotina dos indivíduos. Para realização dos exames físicos dos animais no ponto D0, esses animais encontravam-se estabulados a mais de 12 horas de jejum sólidos e a avaliação clínica foi realizada no turno matutino, período no qual a temperatura ambiental é mais baixa.

Como já descrito por Feitosa, (2014) o jejum prolongado pode alterar os movimentos ruminais, quanto ao número de movimentos e ao grau de intensidade, um outro fator que pode explicar a temperatura abaixo dos parâmetros é que no D0 os animais encontravam-se previamente estabulados e em repouso, não passando por exercício físico intenso gerados pelo deslocamento antes de serem avaliados clinicamente e essa situação de repouso e horários com temperaturas mais amenas pode explicar esses valores obtidos neste ponto.

A média dos valores obtidos na avaliação da FR em D-21 e D+21, pode estar sujeita a alterações devido a fatores climáticos e ao manejo aos quais os animais foram submetidos para a realização dos exames, como, o deslocamento, repercutindo em um intenso esforço físico, as avaliações clínicas foram conduzidas no início da tarde quando ocorre da temperatura ambiental ser mais alta, podendo resultar em variações nos parâmetros de FR desses animais, já que todos na observação geral apresentavam-se saudáveis e livre de lesão aparentes.

Vale ressaltar que o manejo desses animais que são dotados de um temperamento mais agressivo, que não são manipulados rotineiramente, impostos então ao processo de deslocamento, estabulação, contenção, manipulação, realização de exame clínico, coleta de amostra de sangue e vacinação, são eventos que gera uma mudança na rotina a qual estes animais estão adaptados e os mesmos podem ficar mais estressados, bem como se privar da ingestão de água e alimento durante todo o processo de avaliação e colheita de amostra, interferindo nos parâmetros físicos avaliados.

A avaliação dos parâmetros clínicos associados a administração da vacina comercial testada, na população de bovinos que fizeram parte do experimento e dentro das condições as quais estes indivíduos foram submetidos, corroboram com informações para os órgão de defesa animal, indicando que as variações observadas não interferem na acurácia dos resultados encontrados neste estudo, gerando elementos para o planejamento e critérios estratégicos no controle desta enfermidade.

5.2 AVALIAÇÃO DA SOROLOGIA

A fim de facilitar a interpretação dos resultados, estes foram plotados em forma de tabelas e gráficos contendo os resultados sorológicos individuais dos 10 bovinos nos momentos D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360. Os animais que apresentaram título $\geq 0,5$ UI/mL foram considerados com níveis de anticorpos adequados contra o vírus da raiva.

Tabela 2 – Titulação de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva em bovinos nos tempos avaliados

Identificação	Resultado (UI/mL) *						
	D-21	D0	D+21	D+90	D+180	D+270	D+360
Animal 1	< 0,08	< 0,08	85,33	64,00	64,00	32,00	64,00
Animal 2	< 0,08	< 0,08	32,00	10,67	5,33	4,00	4,00
Animal 3	< 0,08	< 0,08	42,67	64,00	21,33	16,00	8,00
Animal 4	< 0,08	< 0,08	5,33	4,00	8,00	4,00	4,00
Animal 5	0,25	< 0,08	32,00	32,00	32,00	32,00	16,00
Animal 6	< 0,08	0,13	4,00	8,00	1,33	2,00	1,33
Animal 7	0,25	0,25	8,00	8,00	2,67	4,00	4,00
Animal 8	0,12	0,08	4,00	0,50	0,67	0,50	0,50
Animal 9	< 0,08	< 0,08	5,33	1,00	32,00	4,00	2,00
Animal 10	0,13	0,25	8,00	16,00	2,67	0,50	0,50

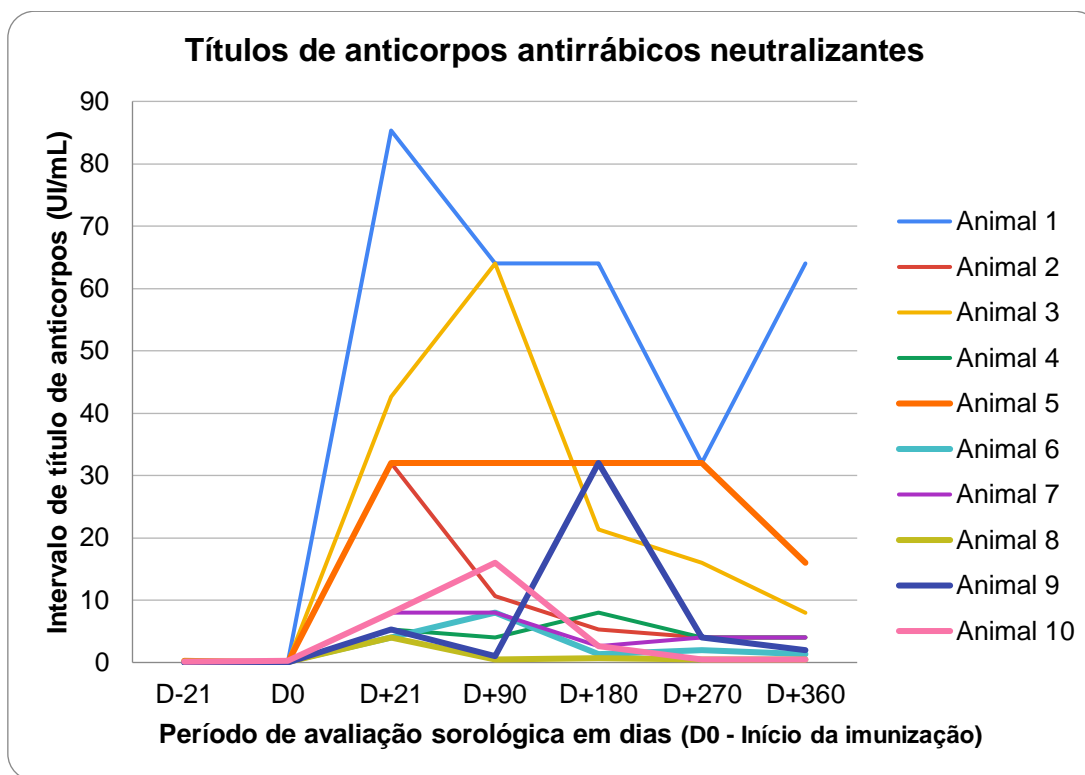
* Título $\geq 0,5$ UI/mL é considerado nível eficaz de proteção (*OIE, 2008; *OMS, 2018).

Os resultados da titulação apresentado na Tabela 2 antes da vacinação, foram condizentes com o esperado para animais não vacinados, todos os animais apresentaram título $\leq 0,5$ UI/mL. Mugale et al. (2013) realizaram um estudo para elucidar a resposta sorológica de cães, bovinos e búfalos atendidos em um Complexo Clínico Veterinário de uma Universidade na Índia. O estudo demonstrou que nenhum animal não vacinado apresentou título de anticorpos específicos para a raiva. Vinte e um dias após a aplicação de uma dose da vacina comercial antirrábica inativada testada, 100% dos animais apresentaram resultados de titulação de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva em nível eficaz de proteção ($\geq 0,5$ UI/mL).

Neste estudo, os animais foram acompanhados pelo período de um ano após a aplicação da vacina, com coletas trimestrais realizadas nos dias D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360. 100% dos animais apresentaram titulação de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva em nível eficaz de proteção ($\geq 0,5$ UI/mL) em todos os tempos avaliados (Tabela 2). Isso demonstrou que a imunidade produzida pela vacina persiste por um ano.

Para melhor compressão da visualização dos resultados estes foram plotados em gráfico onde demonstrada a curva de imunidade humoral de cada indivíduo avaliado (Gráfico 1). Neste, pode-se visualizar a amplitude da resposta (produção de anticorpos), ao longo dos 360 dias após a imunização, de cada animal avaliado.

Gráfico 1 – Curvas da titulação de anticorpos neutralizantes antirrábico em bovinos nos tempos avaliados.

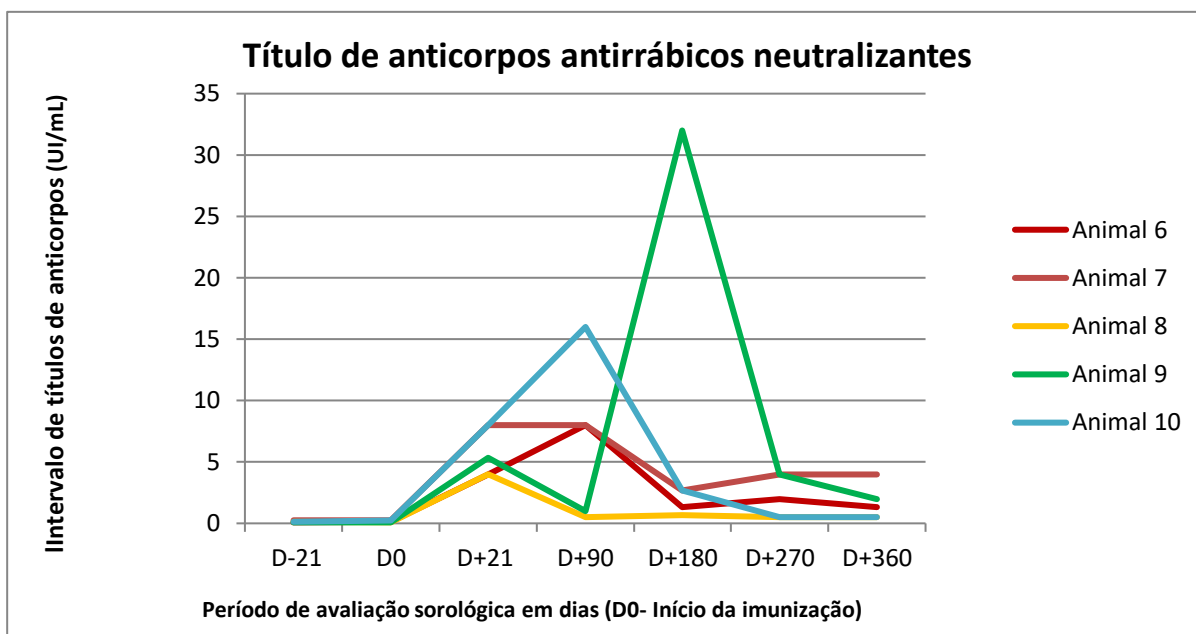


Analisando os resultados dos animais avaliados, observa-se que os resultados obtidos no tempo D+21 variaram entre 4,00 e 85,33 UI/mL, no tempo D+90 os resultados ficaram entre 0,50 e 64,00 UI/mL, no tempo D+180 o valor mínimo de título encontrado foi 0,67 UI/mL e o máximo foi de 64,00 UI/mL. Para o dia D+270, os valores variaram entre 0,50 e 32,00 UI/mL. Ao final do estudo, no tempo D+360, um ano após a aplicação da vacina comercial antirrábica inativada testada, os valores de títulos obtidos ficaram entre 0,50 a 64,00 UI/mL, com 100% dos animais apresentando título considerado adequado durante todo o estudo.

Em relação à idade dos animais avaliados, os machos ao início do experimento tinham idade que variaram entre 4 a 8 meses, neste grupo observou um nível de títulos de anticorpos neutralizantes antirrábico, com títulos de no máximo 32,00 UI/mL e mínimo de 0,5 UI/L (Gráfico 1a). Isto pode ser justificado por uma incapacidade de responder plenamente aos antígenos aos quais estão expostos, fator comum de ser observadas nesta categoria, afinal é nesta fase que esses animais passam pelo desmame, separação e adaptação alimentar sem a presença da mãe, sendo uma fase

estressante a qual os bezerros são submetidos e estes eventos podem implicar em uma menor efetividade de resposta humoral desses indivíduos (RIBAS et al., 2013).

Gráfico 1a – Curvas individuais dos títulos de anticorpos (UI/mL) dos bovinos machos vacinados contra a raiva com uma dose de vacina comercial testada.



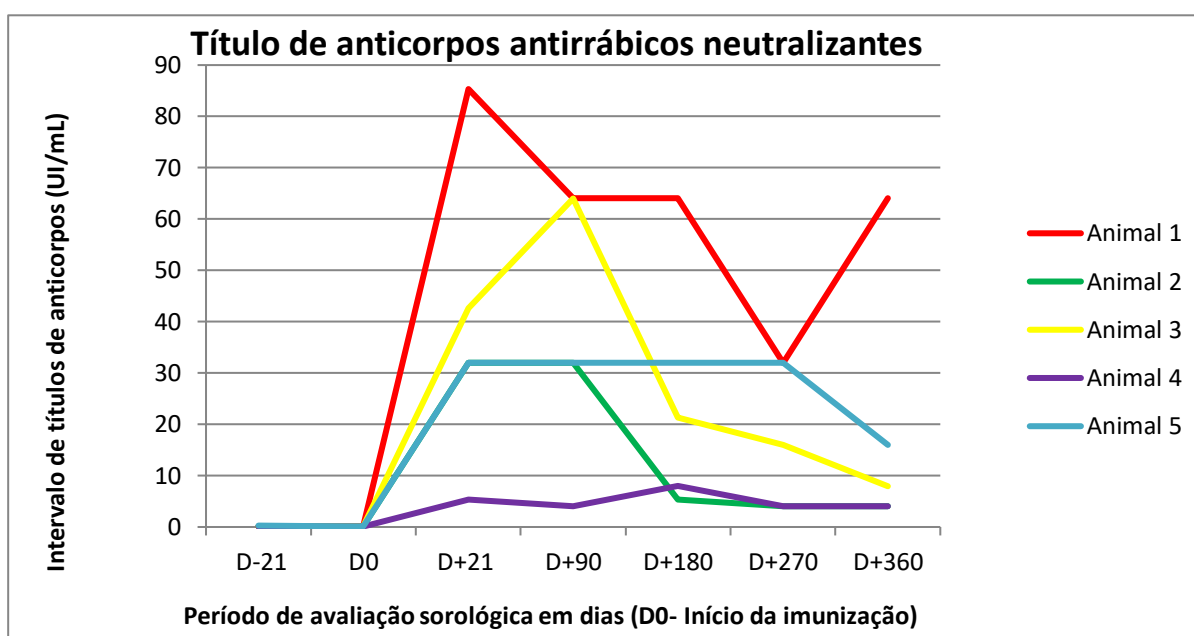
A vacinação profilática é o melhor método no controle da raiva, porém nem todos os animais vacinados estão efetivamente protegidos. Pois vários fatores podem interferir na resposta imune do animal, entre eles, a idade, score corporal, manejo, dieta e presença de anticorpos passivos. Anticorpos colostrais pode inibir o estabelecimento da imunidade ativa, isso ocorre devido ao bloqueio da atividade do receptor da célula B, pela conjugação dos anticorpos específicos com os receptores de fragmento cristalizável de imunoglobulinas das células B, inibindo a produção de mais anticorpos da mesma especificidade podendo impedir o sucesso na vacinação de animais jovens, pois os anticorpos maternos mascaram epítomos dos agentes vacinais impedindo seu reconhecimento pelas células B. Com isso, a resposta imune só se desenvolve quando os anticorpos maternos chegarem abaixo do limiar crítico. Esse período pode durar meses, dependendo da quantidade de anticorpos transferidos para o neonato e da meia vida da imunoglobulina (TIZARD, 2014).

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que apesar de serem títulos menores em relação a maioria das fêmeas de maior idade, estes alcançaram soroconversão com titulação satisfatória $\geq 0,5$ UI/mL de 21 dias após a aplicação da

vacina até o final do experimento, demonstrando que uma única dose da vacina inativada testada é suficiente para induzir níveis de anticorpos adequados os quais foram mantidos por um período de um ano, mesmo nos animais jovens os quais foram submetidos a primovacinação.

Os títulos observados no animal 4 assim como os bezerros machos, foram títulos menores em relação aos demais indivíduos que fizeram parte do experimento, apesar deste animal não fazer parte do grupo de idade ao desmame nem estar passando por eventos que envolve esse ciclo e suas possíveis alterações na resposta imunológica, este apresentou títulos que variaram durante o período experimental entre mínimo de 4,00 UI/mL e máximo de 8,00 UI/mL, vale ressaltar que se tratava de uma fêmea mestiça girolando, ao exame clínico no início do experimento em D-21 apresentou cio, em D+21 foi detectado comportamento de cio novamente, na avaliação observacional em D+90 foi observado uma possível prenhez, e ao final do experimento alcançando o status de lactante (Gráfico 1b).

Gráfico 1b – Curvas individuais dos títulos de anticorpos (UI/mL) dos bovinos fêmeas vacinados contra a raiva com uma dose de vacina comercial testada.



Segundo a literatura eventos como o início da puberdade, cio, prenhez, parto e lactação são fatores que interfere diretamente na resposta imune e é possível que estes eventos tenham interferido na resposta deste animal a vacinação e consequentemente na produção dos níveis de títulos de anticorpos neutralizantes. As

alterações hormonais que ocorrem em preparação para o parto e lactação afetam o sistema imunológico (BURTON et al., 2003).

A prevenção da raiva consiste, em aplicação das principais estratégias do PNCRH, na vacinação dos animais herbívoros domésticos e no controle de reservatórios (*Desmodus rotundus*) (RODRIGUEZ et al., 2007). A vacinação profilática é uma medida de proteção que tem como objetivo interromper o ciclo de transmissão entre animais domésticos e selvagens e conseqüentemente a segurança da saúde humana (OLIVEIRA et al., 2000). Diante disso os estudos de eficácia, soroconversão e segurança em métodos *in vivo* das vacinas comerciais antirrábica, afim de conhecer o grau da resposta imune em uma maior população possível de indivíduos e dentro das particularidades de cada categorias.

Estudos como este de avaliação da resposta imune humoral *in vivo* após vacinação antirrábica em bovinos, reforça sobre a necessidade da vacinação com intervalo de no máximo um ano, para manter os níveis de anticorpos neutralizantes maiores de $\geq 0,5$ UI/mL na maioria dos animais vacinados.

É importante ressaltar como já descrito por Kotait et al., (1998), no momento da vacinação o ideal é que o animal encontre-se hígido para que outros processos metabólicos e patológicos não interfiram na resposta imune. A adoção de técnica na administração da vacinação deve incluir a via de aplicação correta, dose adequada e principalmente, conservação do produto, desde a origem até o momento da vacinação, observando-se a manutenção do resfriamento, lembrando que o congelamento também afeta a qualidade das vacinas, para que se tenham respostas satisfatórias diante de um produto eficaz (ALBAS et al., 2001). O acompanhamento de um profissional técnico qualificado no gerenciamento dessas medidas de prevenção a raiva é fundamental, para garantir a exclusão do maior número possíveis de variáveis que possam interferir de forma negativa na imunização dos indivíduos, quando usado um imunizante de qualidade, afim de assegurar que o animal alcance títulos adequados de proteção.

A baixa eficácia de uma vacina pode demonstrar uma fragilidade na execução do PNCRH, resultando em regiões com elevado risco epidemiológico para disseminação da enfermidade. Sendo a raiva uma zoonose com alta letalidade, resulta em alto risco

para a saúde pública, além de enormes prejuízos econômicos para a pecuária e um desafio para os órgãos públicos de defesa sanitária animal e vigilância epidemiológica (BRASIL, 2002).

6 CONCLUSÃO

A utilização da vacina comercial antirrábica inativada testada no estudo, quando realizada pela via subcutânea em bovinos, em dose única, demonstrou títulos considerado em nível eficaz de proteção aos bovinos contra o vírus da raiva devido à produção de anticorpos antirrábicos a partir de 21 dias após aplicação e manteve os títulos considerados com nível de proteção por até um ano.

De acordo com as condições a que os animais experimentados foram submetidos, pode-se afirmar que durante todo período experimental baseados nas análises observacionais e por meios dos exames físicos realizados nenhum animal apresentou alterações significativas em relação ao uso da vacina ou em decorrência de quaisquer outras enfermidades.

Avaliações dos níveis de anticorpos contra a raiva com base na resposta imune humoral às doses de vacinas comerciais devem ser incentivados. Principalmente em áreas nas quais as populações estão permanentemente sobre risco de contrair a doença.

A avaliação da soroconversão dos animais submetidos a vacinação antirrábica com base nos títulos de anticorpos neutralizantes antirrábico, além de gerar dados do aspecto epidemiológico regional, esse tipo de estudo contribui para os órgão de defesa promovendo a segurança da saúde pública.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Rabia**. In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, pp. 502-526, 1986.

ALBAS, A.; NOGUEIRA, R. M. B.; FONTOLAN, O.L.; ALBAS, K.S.; BREMER NETO, H. Efeito do congelamento sobre imunogenicidade da vacina contra a raiva produzida em tecido cerebral de camundongo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 34, n. 1, pp. 49- 52, 2001.

BABBONI, S. D.; MODOLO, J. R. Raiva: Origem, Importância e Aspectos Históricos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, pp.349-356, 2011.

BARROS C. S. L., DRIEMEIER D., DUTRA I.S. & LEMOS R.A.A. 2006. RABIES, P.21-28. IN: IBID. (EDS), DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO DE BOVINOS NO BRASIL. VALÉE, MONTES CLAROS.

BATISTA H. B. C. R, FRANCO A.C, ROEHE P.M. RAIVA: UMA BREVE REVISÃO. ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE, V.35, N.2, P.125-144, 2007.

BAXTER, D. 2007. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine*, 57(8):552-556.

BRANDÃO, G. C. Avaliação das indicações de profilaxia antirrábica humana em Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil, em 2008. **Dissertação** (Mestrado em Saúde Pública) - Curso de Mestrado em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Campo Grande, 54p, 2010.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Fundação Nacional de Saúde. 5. ed. Brasília: FUNASA, 2002. 842p. ISBN 85-7346-032-6.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.108 p.: il.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2009 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 124 p. 2ª edição. 2009. ISBN 978-85-99851-81-4

BRASIL, Ministério da Saúde. **Normas técnicas de profilaxia da raiva humana**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 60p, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 1.ed. Versão Eletrônica. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 812p, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 2 ed., Brasília: Ministério da Saúde, 705p, 2017.

BURTON, J. L.; MADSEN, S. A.; YAO, J.; SIPKOVSKY, S. S.; E COUSSENS, P.M. 2003. An Immunogenomics Approach to Understanding Periparturient Immunosuppression and Mastitis Susceptibility in Dairy Cows. **Acta Vet. Scand.**, Suppl. 98, 71-88.

CEVS/RS - Centro Estadual de Vigilância em Saúde RS. Secretaria Estadual da Saúde – SES, Relatório Raiva 2019 RS, v. 2. Suplemento 1, 2020.

CHAVES, L. B. Produção de anticorpos monoclonais para caracterização de variantes antigênicas brasileiras de vírus da raiva. **Tese** (Doutorado em biotecnologia). Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia - Universidade de São Paulo. São Paulo, 31p., 2010.

COLL, J. M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. **Archives of Virology**. v. 140, p. 827-851, 1995.

CONCEA. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 7A: Pequenos ruminantes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica** [recurso eletrônico] /coordenador: Bruno Lourenço Diaz; Adriano da Silva Campos... [et al.]. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 39p. 2016a.

CONCEA. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 7B Grandes ruminantes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica** [recurso eletrônico] /coordenador: Bruno Lourenço Diaz; Adriano da Silva Campos... [et al.]. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 39p. 2016b.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**, 2 ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1992.

CHRISTENSEN, D. 2016. Vaccine adjuvants: Why and how. *Human Vaccin Immunother*, 12(10):2709-2711.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. D.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, pp. 434-447, 2010.

DIVEP/BA - Diretoria de Vigilância Epidemiológica – Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. Boletim Epidemiológico da Raiva na Bahia - Ano 1, Nº 01, Janeiro de 2019.

DOGNANI, R. Caracterização Epidemiológica da Raiva dos Herbívoros no Estado do Paraná entre 1977 E 2012. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 53p, 2014.

DUARTE, L.; DRAGO, M. C. A raiva. **Monografia**. (Bacharelado em biologia) - Universidade de Évora, Portugal, 25p, 2005.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U; BALL, L. A. **Virus Taxonomy: the classification and nomenclature of viruses**. The eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; p. 623-631, 2004.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; TINO, M. S.; ZANETTI, C. R.; PEREIRA, O. A. C. Simplified fluorescent inhibition microtest for titration of rabies neutralizing antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 35. n. 2, pp. 171-175, 1993.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico**. Roca Ltda. 3 ed. 644p, 2014.

FERREIRA, F.; PIRES, M. F. A.; MARTINEZ, M. L.; COELHO, S. G.; CARVALHO, A. U.; FERREIRA, P. M.; FACURY FILHO, E. J.; CAMPOS, W. E. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, pp. 732-738, 2006.

FILHO, OA et al. Importância da revacinação antirrábica para uma adequada proteção antirrábica em recém-nascidos bovinos. **Clinical Vaccine Immunology**, v.17, n.7, p.1159-1161, 2010.

GERMANO, P. M. L. **Avanços na Pesquisa da Raiva**. Revista Saúde Pública, São Paulo, Brasil, p. 86-91, 28 out. 1994.

GERSHWIN, L. J.; SCHELEGLE, E. S.; GUNTHER, R. A.; ANDERSON, M. L.; WOOLUMS, A. R.; LAROCHELLE, D. R.; SINGER, R. S. A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. **Vaccine**, v. 16, n. 11-12, pp. 1225-1236, 1998.

GERSHWIN, L. J. 2018. Adverse Reactions to Vaccination: From Anaphylaxis to Autoimmunity. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(2):279-290. ano

GOODMAN, L. A, Simultaneous confidence limits for cross-product ratios in contingency tables, **J. R. Stat. Soc**, Ser. B 26, p.86-102 1964.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants: a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, n. 3, pp. 293-306, 1993.

GUTIÉRREZ, M. M. B.; GUTIÉRREZ, J. A. O.; SIMÓN, M. T. C.; GÓMEZ, A. D.; BERNAL, G. D.; PRIETO, A. G.; FERNÁNDEZ, I. S. **Manual gráfico de imunologia e enfermidades infecciosas do cão e do gato**. Editora MedVet, 1ª ed, 116p, 2015.

GOLDBERG, A. C.; RIZZO, L. V. MHC structure and function– antigen presentation. Part 2. **Einstein**, v. 13, n. 1, pp. 157-162, 2015.

GOMES A. P.; ESPERIDIÃO-ANTONIO, V.; MENDONÇA, B. G.; BENEDITO, H. P. L.; VITORINO, R. R.; PRADO, M. R. M. C.; PRADO JUNIOR, P. P.; HENRIQUES, B. D.; SANTANA, L. A. Raiva humana. **Revista Brasileira Clínica Médica**, v. 10, n.4, pp. 334-340, 2012.

HANKINS D. G.; ROSEKRANS J. A. Overview, prevention, and treatment of rabies, **Mayo Clin. Proc.** v. 79, n. 5, pp. 671-676, 2004.

HOOVER, D. C. The role of immune responses in the pathogenesis of rabies. **Journal of neurovirology**, v. 11, n. 1, p. 88-92, 2005.

IBGE 2016. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Agrícola Municipal**. Disponível: <http://www.seagri.ba.gov.br/sites/default/files/Bovino.pdf/> Acesso em: 26 Nov. 2021.

IBGE 2019. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agropecuária**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>. Acesso em: 26 Abr. 2021.

IBGE 2020. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico 2020**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

JANEWAY, C. A. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 13, pp. 7461-7468, 2001.

JOHNSON, N.; PHILLPOTTS. R.; FOOKS, A. R. Airbone trasmission of Lyssavirus. **Journal of Medical Microbiology**. v. 55, pp. 785-790, 2006.

JOHNSON, N.; VOS, A.; FREULING, C.; TORDO, N.; FOOKS, A. R.; MÜLLER, T. Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3, pp. 151-159, 2010.

JOHNSON, N. et al. Raiva do morcego vampiro: ecologia, epidemiologia e controle. **Viruses**, v. 6, n. 5, p.1911-1928, 2014.

JOSEFSBERG, J. O. e BUCKLAND, B. 2012. Vaccine process technology. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6):1443-1460.

KIMURA, L. M. S. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VIRUS DA RAIVA EM MAMIFEROS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NO BRASIL. 2006. 95 Dissertação (Pós-graduação) - Curso de Vigilância Sanitária, Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

KING, A. M. Q.; LEFKOIT E.; ADAMS, M. J.; ERIC B.; CARSTENS, E. B. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Science. pp. 686-713, 2012.

KOTAIT, I.; GONÇALVES, C. A.; PERES, N. F.; SOUZA, M. C. A. M.; TARQUETA, M. C. **Controle da Raiva dos Herbívoros**. In: Manual Técnico do Instituto Pasteur, 1ª ed. São Paulo, Instituto Pasteur (Manuais,1) 15p, 1998.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L. **Raiva**. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4. ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 651-657, 2004.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. **Raiva – Aspectos gerais e clínica**.in: Manual Técnico do Instituto Pasteur. 49p, 2009.

LIMA, EF et al. Sinais clínicos, sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso central e epidemiologia da raiva no nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.250-264, 2005.

LIMA, F. G.; GAGLIARI, L. H. Raiva: aspectos epidemiológicos, controle e diagnóstico laboratorial. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 11, n. 22, pp. 45-62, 2014.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros, manual Técnico**. 2. ed, 2009. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/as_suntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/MANUAL_RAIVAH_ERBIVOROS2009.pdf. Acesso em: 11 jun, 2020.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão sobre a Raiva**. Disponível em: rio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão sobre a Raiva. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/RevisosobreRaiva2017.pdf/view>. Acesso em: 26 Abr. 2021.

MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. D. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Immune system-part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, pp. 552-580, 2010.

MORAIS, A. C. N.; CABRAL, C. C. C.; DIAS, A. V. A. B.; ARAÚJO, M. G.; MATTOS, G. L. M.; MOREIRA, W. C. A Prova Biológica em Camundongos Lactentes como Método Diagnóstico Precoce da Raiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 38, Florianópolis, Santa Catarina. **Anai... 38º CONBRAVET**, 2011.

MORATO, F., IKUTA, C. Y.; ITO, F. H. Raiva: uma doença antiga, mas ainda atual. **Revista de Educação Continuada Em Medicina Veterinária e Zootecnia Do CRMV-SP**, 9(3), 20–29, 2011.

MUGALE, M.; SANDHU, B. S.; RAI, T. S.; SINGH, C. K.; SOOD, N. K. Serological response to anti-rabies vaccination in animals: Failure to achieve a protective antibody level. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 83, n. 3, pp. 243-246, 2013.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HOZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**, 3. ed. San Diego, EUA: Academic Press, pp. 429-445, 1999.

NOVAIS, B. A. F.; ZAPPA, V. Raiva em bovinos—revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária Da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça**, v. VI, n. 10, jan., 2008.

NÚÑEZ, C.; PÁEZ, A.; HERNÁNDEZ, C.; ESCOBAR, H.; BONELO, A. Transmisión del virus de la rabia entre murciélagos urbanos del departamento del Valle del Cauca, Colombia, 1999-2008. **Infectio: revista de la Asociación Colombiana de Infectología**, v. 16, n. 1, p. 23-29, 2012.

OIE **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE**. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. França. 2005. p. 369-389.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH 2008. WAHID interface. OIE, Rabies Uruguay. 2008.

OLIVEIRA, A. N.; ANDRADE, M. C. R.; SILVA, M. V. D.; MOURA, W. C. D.; CORTEZ CONTREIRAS, E. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, pp. 83-88, jan./fev. 2000.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **WHO Expert Committee on Rabies**. Eighth report, 1992.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **WHO Expert Consultation on Rabies**. Third report, 2018.

PASQUALE, A.; PREISS, S.; SILVA, F.; GARÇON, N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. **Vaccines**, v. 3, n. 2, pp. 320-343, 2015.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D.C.; GAY, C. C. **A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses**. 9. ed. Londres: Bailliere Tindall, 1763p, 2000.

RANSOHOFF, R. M.; BROWN, M. A. Innate immunity in the central nervous system. **The journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, pp. 1164-1171, 2012.

REIS, M. C.; COSTA, J. N.; PEIXOTO, A. P. C.; FIGUEIREDO, L. J. C.; MENEZES, R. V. M.; FERREIRA, M.; SÁ, J. E. U. Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística da Clínica de Bovinos (Oliveira dos Campinhos, Santo Amaro, Bahia), Universidade Federal da Bahia, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999 (Relato de caso). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 4, n. 1, pp. 12-17, 2005.

RIBAS, N. L. K. S, CARVALHO, R. I, SANTOS A. C, VALENÇOELA, R. A, GOUVEIA A. F, CASTRO M. B, MORI A. E, LEMOS R. A. A. **Doenças do sistema nervoso de**

bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.10, p.1183-1194, 2013.

RODRIGUEZ, L.; ROEHE, P. M.; BATISTA, H.; KURATH, G. **Rhabdoviridae**. In: FLORES, E. F. *Virologia veterinária*, Santa Maria: Ed. da UFSM. cap. 27, pp. 691-718, 2007.

ROSSAROLLA, G. Comportamento de vacas leiteiras da raça holandesa, em pastagem de milho com e sem sombra. 2007. 47p. **Dissertação** (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2007.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 6, pp. 327-343, 2002.

SCHEFFER, K. C.; CARRIERI, M. L.; ALBAS, A.; DOS SANTOS, H. C. P.; KOTAIT, I.; ITO, F. H. Rabies virus in naturally infected bats in the state of Sao Paulo, southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, pp. 389-395, 2007.

SEI-BA, **Estatística dos municípios baianos**. Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. Salvador: SEI, 2010. Disponível em: https://www.sei.ba.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=2441&Itemid=. Acesso em: 25 Fev 2021.

SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus neutralizing antibodies. In: MESLIN F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva WHO, 1998. p.181-192.

SUGAMATA, M.; MIYAZAWA, M.; MORI, S.; SPANGRUDE, G. J.; EWALT, L. C.; LODMELL, D. L. Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. **Journal of Virology**. v. 66, pp. 1252-1260, 1992.

SWANEPOEL R. 2004. **Rabies**, p.1123-1182. In: Coetzer JAW, Tustin RC (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. v. 2, 2ª ed. Oxford University Press, Cidade do Cabo.

TAKAOKA, N. Y.; KOTAIT I.; REICHMANN, M. L. M. A. B.; CARRIERI, M. L.; PANACHÃO, M. R. I.; HARMANI, N. M. S.; CUNHA, R. S.; OMOTO, T. M.; BOLZAN, V. L.; COSTA, W. A. **Raiva – Controle e profilaxia Humana**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2003.

THOULOZE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**. v. 72, pp. 7181-7190, 1998.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**: introdução. 9ª edição. São Paulo, Brasil: Editora Roca. 568p, 2014.

TORDO, N. **Characteristics and molecular biology of the rabies virus**. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds). 4. ed. Geneva: World Health Organization, pp.28-51. 1996.

WAGNER, R. R.; ROSE, J. K. **Rabdo***viridae*: The virus and their replication. N: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Fundamental Virology, 3.^a ed. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, pp. 561-575, 1996.

WANG, L. F.; COWLED, C. **Bats and viruses: A new frontier of emerging infectious diseases**. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2015. pp. 47-98.

WHO Expert Committee on Rabies. **WHO technical report series 824**. World Health Organization, 1992. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39308/WHO_TRS_824_eng.pdf. Acesso em: 25/02/2021.

WHO Expert consultation on rabies. **WHO technical report series 931**. World Health Organization, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/ExpertConsultationOnRabies.pdf>. Acesso em: 25/02/2021.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies vaccines**: WHO position paper. WHO, v. 85, n. 32, p. 309-320, 2010.

WIKTOR, T. J.; GYORGIA, E.; SCHLUMBERGER, D.; SOKOL, F.; KOPROWSKI, H.-Propriedades antigênicas dos componentes da raiva. J. Immunol., 110: 269-276, 1973

ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D. A microtest for the quantitative of rabies virus neutralizing antibodies. **Journal of Biological Standardization**, n. 3, p. 213-220, 1979.

ZEPP, F. Principles of vaccine design - lessons from nature. **Vaccine**, v. 28, p. C14-C24, 2010.

ZINKERNAGEL, R. M. On natural and artificial vaccinations. **Annual review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 515-546, 2003.