

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

José Arturo de Oliveira Carvalho

**Status imunológico de cães vacinados contra o vírus da Raiva em
Fortaleza, Ceará.**

Fortaleza-Ceará

Dezembro/2009

José Arturo de Oliveira Carvalho

Status imunológico de cães vacinados contra o vírus da Raiva em
Fortaleza, Ceará.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva
Teixeira

Fortaleza

2009

José Arturo de Oliveira Carvalho

Status imunológico de cães vacinados contra o vírus da Raiva em
Fortaleza, Ceará.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a) Dr. (a) Maria Fátima da Silva Teixeira

Orientadora– UECE

Dra. Phyllis Catharina Romijn

Examinador PESAGRO-RJ

Prof. (a) Dr. (a) Lucia de Fátima Lopes dos Santos

Examinador-UECE

Dedico esse projeto à pessoa que mais me incentivou a cursar esse mestrado, minha mentora acadêmica, conselheira pedagógica e da vida: Verônica Queiroz de Carvalho, sem os seus incentivos, dedicação e amor não chegaria até aqui sou eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, nosso pai e criador da vida e maior responsável por nossos caminhos

A professora dra. Maria Fátima da Silva Teixeira, pela dedicação e aprendizado, muito mais que uma orientadora, uma educadora persistente e que realmente ama o que faz.

A coordenação pela presença constante e pela excelente organização durante todo o curso

Ao PPGCV pela oportunidade em realizar um curso de tamanha qualidade.

Ao LABOVIR, pelos grandes conhecimentos adquiridos e pelas amizades de todos: D'ávila, Valeska, Tânia, Edmara, Igor, Cynthia, Gabriele, Esmale, etc.

Aos professores pelas excelentes aulas valiosas pra formação do profissional qualificado

Aos amigos médicos-veterinários, Neilson, Nélío e JoséFilho pela amizade, pelo incentivo de cursar esse mestrado e pelos exemplos de profissionais que são.

Ao estudante de medicina-veterinária Alfredo pela valiosa ajuda nas coletas dos animais para a realização do experimento.

Ao CCZ de São Paulo por nos fornecer toda a estrutura necessária para a realização desse projeto.

A Prefeitura de Fortaleza, SERIII, por nos oferecer todo apoio necessário para a realização da pesquisa.

A Dra Luzia Martorelli pelos ensinamentos, pela acolhida no CCZ de São Paulo e por nos ensinar todos os passos de como realizar as soroneutralizações.

Ao meu pai, Arturo Sandrey, pelo amor, obstinação e pelo esforço para me dar uma boa educação.

A minha esposa, Isadora Carvalho, pelo carinho, paciência e compreensão a mim dedicados.

Minha mãe, Rosalina Luiza, por ter me colocado no mundo e por todo carinho e afeto.

Minha avó, Lis Torres, pelos incentivos incessantes e pelas orações.

À CAPES pela bolsa fundamental para conclusão dos experimentos.

RESUMO

A raiva é uma enfermidade zoonótica, viral, invariavelmente fatal e que acomete todos os mamíferos. É uma das doenças mais graves da saúde pública. Esta enfermidade encontra-se disseminada em todo o mundo, sendo erradicada em poucos países como no Japão. O Brasil apresenta estágios diferentes do controle da raiva, algumas áreas endêmicas e outras áreas livres. A região Nordeste é a mais acometida em número absoluto de casos. O estado do Ceará apresentou por diversos anos seguidos o maior número de ocorrências da América Latina. Atualmente, o panorama é diferente, uma vez que Fortaleza há quatro anos não apresenta casos da Raiva, nem humanos e nem animais. Esta cidade realiza duas campanhas anuais de vacinação animal, entretanto não faz nenhum controle de raiva silvestre, o que demonstra que esse quadro pode no futuro reverter-se. Estudos comprovam que a vacinação animal pode apresentar falhas, ligada a uma má resposta do sistema imune do animal, por imperícia do vacinador, por má conservação ou a partir do uso de um imunobiológico de qualidade duvidosa. Estudos demonstraram que em amostras de soro de cães vacinados que foram submetidas à soro neutralização, a maioria desses animais não apresentaram títulos de anticorpos suficientes para garantir-lhes proteção (acima de 0,5 U.I./mL, de acordo com a OMS). Baseado nesses estudos prévios, o objetivo desse trabalho foi verificar o percentual de cães em Fortaleza, na Secretaria Executiva Regional III, que não apresentam títulos de anticorpos seguros. Para isto, 100 animais selecionados nos 15 postos da SER III tiveram sangue coletados. Foram formados 2 grupos: não-vacinados e vacinados. Os animais vacinados anteriormente à pesquisa foram imunizados com a vacina Fuenzalida e Palácios e no presente ano, 2009, em que foi realizada essa pesquisa foi introduzida um novo imunobiológico na campanha de vacinação animal: a vacina Rabiffa®, de cultivo celular. A coleta foi dividida em duas fases: antes da inoculação do imunobiológico e 60 dias após. Os soros obtidos foram armazenados no LABOVIR-UECE e o exame de titulação de anticorpos foi realizado no CCZ de São Paulo. Os resultados da primeira coleta mostraram que somente 03 dos animais do grupo 1 tinham titulação que garantisse proteção. Já no grupo 2, 12 animais estavam protegidos contra a doença. Na segunda coleta, no grupo 1, um total de 85% dos animais estavam protegidos e no grupo 2, 100% deles estavam protegidos. Com isso, conclui-se que o atual estado imunitário dos cães da Secretaria Executiva Regional III, da cidade de Fortaleza é satisfatório.

Palavras-chave: Raiva. Imunobiológico. Coleta. Titulação

ABSTRACT

The rabies is a zoonosis viral, invariably fatal and that affects all mammals. It is one of the diseases of most concern for the public health. This disease is widespread throughout the world, being eradicated in a few Countries, like Japan. Brazil has different internships of rabies management. In some areas the disease is frequent and others areas are free. The Northeast region is the most worrying in absolute number of cases. The state of Ceara presented for several years running the largest number of cases of rabies in Latin America. Nowadays, the panorama is different, since Fortaleza have no cases of rabies during the last four years, neither humans or animals cases. This city holds two annual campaigns of animal vaccination, however do not realize control of wildlife rabies, which shows that this picture may become negative again in future. Many studies show that the animal vaccine can have several failures, linked to a bad immune response of the animal, whether by malpractice of the vaccinator, or by poor conservation or the use of a immunobiological of dubious quality. Several authors showed that in serum samples of vaccinated dogs that were submitted for serum neutralization most of these animals did not present antibody titles sufficient to ensure that they were protected (above 0.5 IU / mL, according to WHO). Based on these previous studies, the objective of this study was to verify through collections and subsequent tests of serum neutralization the percentage of dogs in Fortaleza, the Regional Executive Secretary III, that presents antibody titles insurance. For this, 100 animals in 15 selected stations in the SER III were collected. Two groups were formed: no vaccinated and vaccinated. Animals vaccinated before research were immunized with the vaccine Fuenzalida and Palacios and in this year that we conducted this research a new immunobiological vaccine was introduced in the animal campaign : the vaccine Rabiffa, of cell culture. The collection was divided into two phases: before inoculating the vaccine and 60 days after. The serum were stored at the Labovir-UECE and the antibody titration was performed in the CCZ of Sao Paulo. The results of the first collection showed that only 03 animals belonging to group 1 had sufficient antibodies. In the animals of group 2 only 12 were protected against the disease. In the second collection, in the group 1, 85% of animals were protected and in the second group 100% were protected. Based on these results we can conclude that the immune state of dogs belonged to the III Executive Secretary , in the city of Fortaleza is satisfactory.

Keywords: Rabies. Immunobiological. Titration

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Inclusão intracitoplasmática, denominada de Corpúsculo de Negri...	16
FIGURA 02	Distribuição mundial da Raiva.....	21
FIGURA 03	Callitrix jacchus ou mico estrela.....	22
FIGURA 04	Vírus da Raiva.....	24
FIGURA 05	Genótipos do gênero Lyssavirus.....	26
FIGURA 06	Visualização no microscópio invertido de amostra com ausência de anticorpos neutralizantes.	44
FIGURA 07	Visualização no microscópio invertido de amostra com poucos de anticorpos neutralizantes.	44
FIGURA 08	Visualização no microscópio invertido de amostra com anticorpos neutralizantes.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CVS- Vírus da raiva padrão

OIE – Organização Internacional de Epizootias

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPAS- Organização Panamericana de Saúde

PNCR- Plano Nacional de Controle da Raiva

RFFIT- Teste Rápido de Imunofluorescência Indireta

RT- Transcriptase Reversa

SNC- Sistema Nervoso Central

U.I – Unidades Internacionais

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. HISTÓRICO.....	13
2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.3. ETIOLOGIA.....	22
2.4. PATOGÊNESE.....	25
2.5. PERÍODO E INCUBAÇÃO E SINAIS CLÍNICOS.....	26
2.6. DIAGNÓSTICO.....	27
2.7. CONTROLE.....	29
3. JUSTIFICATIVA.....	33
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	34
5. OBJETIVOS.....	35
5.1. OBJETIVO GERAL.....	35
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
6. ARTIGO CIENTÍFICO.....	37
7. CONCLUSÕES.....	49
8. PERSPECTIVAS.....	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
10. ANEXOS.....	57

1.INTRODUÇÃO

A inserção do médico-veterinário na saúde pública é cada vez mais crescente e necessária, devido ao ressurgimento de zoonoses como a Leishmaniose Visceral e a Raiva. A Raiva é um agravo de notificação compulsória. Esta enfermidade é uma encefalomielite viral aguda, zoonótica e de distribuição cosmopolita, que invariavelmente leva à morte do animal afetado (TORDO et al., 1998).

O vírus da Raiva é mantido na natureza em quatro ciclos epidemiológicos: urbano, rural, silvestre e aéreo. Dentre estes, o ciclo urbano é o que oferece maior risco à saúde humana, pois é transmitido por animais domésticos de companhia, como o cão e o gato, que têm uma maior proximidade com a família, favorecendo a transmissão da doença (TORDO et al., 1998). Ocorrem, segundo a Organização Mundial de Saúde (O.M.S) 55 mil casos humanos de raiva no mundo, 99% deles na China, sendo que 60 a 90% das transmissões ocorrem através do cão.

No Brasil, de acordo com o Programa Nacional de Controle da Raiva (P.N.C.R), instituído em 1973, o animal ou ser humano são considerados protegidos quando a titulação de anticorpos é superior a 0,5 UI/mL. Para que se atinjam esses níveis de anticorpos considerados protetores são realizadas campanhas de vacinação anuais, destinadas a animais domésticos (cão e gato). Em municípios onde a doença não está controlada ou apresentou casos recentes, são feitas duas campanhas anuais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005)

Outro item incluso no programa da Raiva é a obrigatoriedade do envio anual de uma amostra de material (cérebro, cerebelo e medula) de 0,1 % da população canina de cada região. O Instituto Pasteur é referência da Organização Panamericana da Saúde (OPAS) para o Brasil possuindo a técnica padronizada pelo CDC / Atlanta / EUA para identificação da espécie animal da fonte de infecção. Dos casos de Raiva canina e felina ocorridos nos últimos três anos no Brasil, nas amostras em que foi possível realizar essa tipificação viral, em apenas um caso o vírus era próprio da espécie canina, sendo os demais de morcego hematófago. Isto significa que a Raiva urbana, própria de espécies de estimação, está sob controle, mas este fato somente será reconhecido se os municípios enviarem material suficiente para o diagnóstico laboratorial do agravo. A Raiva urbana está controlada no Brasil, no entanto o aparecimento de um caso da

enfermidade em humanos em um município é a prova da ineficácia de sua vigilância epidemiológica e ambiental (GOMES, 2005).

Apesar de não registrar casos caninos ou humanos do agravo, a cidade de Fortaleza vem realizando vacinação animal semestralmente. Estas campanhas têm sua qualidade questionada por vários pesquisadores (Marilene, 1999) devido às possíveis falhas que ocorrem na campanha, tais como: imperícia do vacinador, falta de treinamento adequado do profissional, conservação da vacina, falha na cobertura (< 80% da população canina, ideal é superior a 80%), erro na dose e via de aplicação (a Fuenzalida são 2 mL e a de cultivo celular somente 1 mL, pela via subcutânea). Os animais aglomeram-se no dia da campanha, aproximando cães de maior porte aos de pequeno porte e estes por sua vez dos gatos, gerando um fator de grande estresse aos animais. Esse estresse ocasiona uma queda no sistema imunológico do indivíduo causando o aparecimento de doenças subjacentes.

Devido à grande aglomeração de animais doenças infecto-contagiosas como a cinomose, parvovirose e outras são facilmente propagadas no dia da campanha de vacinação animal. Apesar da campanha prevenir a Raiva humana e animal, alguns estudiosos afirmam que a campanha seria muito mais benéfica à saúde humana do que à saúde animal, pois durante a realização da mesma, ocorre uma propagação na veiculação de doenças contagiosas entre os animais, devido às grande aglomerações de cães e gato nos dias da campanha (MORENO, 2002).

Devido ao grande número de possíveis falhas vacinais, questiona-se a eficácia da vacinação. Pesquisadores guiados por essa dúvida fizeram titulação em cães vacinados, na cidade de Campo Grande, no estado do Mato Grosso do Sul e constataram que 51% dos cães vacinados apresentaram titulação para raiva inferior ao 0,5 UI/mL recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), demonstrando uma ineficácia da vacina ou dos métodos de vacinação (RIGO et al, 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Histórico

O surgimento da Raiva no mundo data de mais de mil anos atrás. A hidrofobia, como também é denominada ficou muito conhecida, pois invariavelmente levava ao óbito. O simples pronunciamento da palavra Raiva ou cão raivoso estremecia e deixava assustada a população. As causas originárias da Raiva canina não tinham correlação com o vírus da Raiva, o povo leigo associava o surgimento da doença com a ingestão de alimentos muito quentes, a privação de água, falta da libido sexual, excitações nervosas intensas e outras causas variadas. (CÔRREA e CÔRREA, 1992).

No século XXIV a.C. na Mesopotâmia, os primeiros relatos da doença no homem, constam no código ESHUNNA. Este continha penalidades para o dono do animal que o mantivesse solto e transmitisse Raiva aos seres humanos e relatava a sintomatologia na espécie humana. Aristóteles também fez descrição da doença em seu tratado sobre a história natural dos animais. Demócrito descreveu os primeiros casos clínicos e determinou a transmissão da doença através da mordedura de cães (SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994).

No século I a.C, Cornélio Celsius testou os primeiros tratamentos contra a doença, através da sucção das feridas, onde ocorrera a possível inoculação e também através da cauterização das mesmas com ferro incandescente. Segundo as crenças populares, o tratamento mais eficaz era por meio do fogo. Uma vez contaminado, o paciente devia ir o mais rápido possível à oficina de um ferreiro para que a ferida fosse queimada com um ferro quente. Amarrada, dominada por fortes assistentes e na presença de curiosos horrorizados, a vítima era submetida ao tratamento pelo ferreiro, que cauterizava a mordida o mais profundamente possível (SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994). Quem primeiro descreveu a Raiva como doença incurável foi o italiano Girolamo Fracastoro, somente no século XVI. Nessa época eram raras as ocorrências de casos humanos da enfermidade, pois a população humana era bem dispersa e o número de cães domiciliados era inferior ao dos dias atuais. A transmissão se dava principalmente por animais silvestres, em especial, raposas e morcegos (SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994).

O primeiro relato de caso canino documentado, data do ano de 1026, na Grã-Bretanha. Em 1433, vários lobos raivosos eram vistos nas ruas da cidade Paris e eram até então, os principais transmissores da raiva. As pessoas que conseguiam matá-los recebiam generosas recompensas, pois era considerado um grande feito e um bem à comunidade. Os lobos mordiam os cães que se infectavam e se tornavam novos transmissores da doença. O povo antigo achava que a mordida dos lobos era venenosa como a das cobras, a morte era associada com algum veneno e não com o vírus da Raiva. Já o primeiro surto em cães ocorreu em 1500, na Espanha. Na Itália em 1708 ocorreu a primeira grande epizootia da doença. Após esse episódio, ocorreram epizootias em outros países e foi necessária a adoção de medidas de controle urgentes. O primeiro país a adotar medidas de controle de animais e eliminação de cães errantes foi a Inglaterra em 1750 (INSTITUTO PASTEUR, 2003).

Na América do Sul, o primeiro surto do agravo, ocorreu em 1803, no Peru, onde 42 pessoas morreram e o sacrifício de cães em Lima, evitou o risco de uma epizootia. Um ano após esse surto, Zinke comprovou a infecciosidade da saliva do cão raivoso. Em 1880, Victor Galtier, catedrático da Universidade de Lyon, descreveu de forma sucinta a evolução clínica da doença nos cães: "Após uma mordida virulenta e um período de incubação mais ou menos longo (15 a 60 dias), surgem, sinais visíveis nas alterações do comportamento do cão, os primeiros sintomas da doença. Ele se torna triste, melancólico ou muito alegre e carinhoso. Ainda obedece e não tenta morder, mas já é perigoso, uma vez que a saliva contém o mal. (...) Depois sua agitação aumenta; se a doença assumir a forma furiosa, haverá acessos de alucinação; o animal fica parado, late, abocanha moscas inexistentes, rasga almofadas, tapetes e cortinas, arranha o chão e come terra. O som do latido torna-se rouco e abafado, a nota final é bastante aguda e a boca não se fecha totalmente. Tais modificações no latido constituem um sinal bem grave. Em certos casos, o cão tem tendência a fugir, abandonando a casa do dono. (...) É nessa época que o animal se torna mais perigoso. Depois surgem fenômenos de paralisia: as pernas posteriores ficam enfraquecidas e o andar incerto. O cão pára na beira do caminho e ainda é perigoso nos momentos de alucinação; posteriormente a fraqueza se acentua, a respiração torna-se irregular, ele se deita e a morte ocorre quatro ou seis dias contados do início dos sintomas".

Nos anos de 1910 e 1911 ocorreu um surto de Raiva em herbívoros em Santa Catarina, Brasil. O diagnóstico na ocasião desse surto foi feito pela demonstração de

corpúsculos de inclusão nos neurônios e pela reprodução experimental da doença (ELKHOURY, 1998). Em 1913, Gruner e Salm, demonstraram a infecciosidade da saliva dos herbívoros. Já em 1921, Magendie e Breschet comprovaram a infecciosidade da saliva de humanos e verificaram que a Raiva do homem e a do cão era ocasionada pelo mesmo agente etiológico, apesar de diferir clinicamente. Enquanto Duboé (1879) determinou que a passagem dos vírus ocorre dos nervos periféricos para o sistema nervoso central, ou, fluxo retrógrado axoplasmático (SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994).

Histórico da evolução mundial das vacinas.

Um dos maiores marcos históricos da doença ocorreu no ano de 1885, quando o grande cientista, Luis Pasteur, utilizou uma vacina desenvolvida em animais de laboratório e tratou com sucesso uma criança de nove anos, que havia sofrido mordeduras múltiplas de um cão comprovadamente raivoso, esse fato determinou o início da Era Pasteuriana da Raiva. Após salvar a vida do garoto, Pasteur atendeu centenas de pacientes agredidos por animais raivosos. Finalmente comprovando a eficácia de sua vacina, recebeu recursos para pesquisa e foi construído o primeiro Instituto Pasteur. Babbes, em 1889 estudou a propriedade do soro no tratamento anti-rábico. Enquanto a lesão patognomônica, inclusão intracitoplasmática, foi denominada de Negri (figura 1), levando o mesmo nome do pesquisador que o visualizou a primeira

vez em 1903 (SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994).

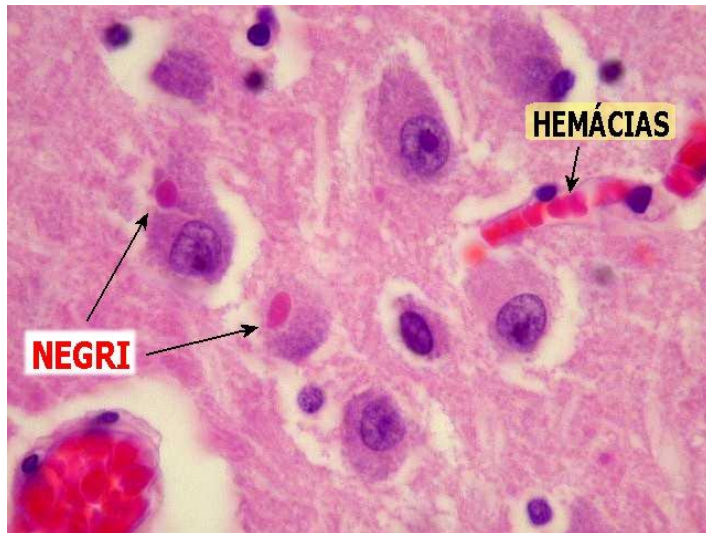


Figura 1. Inclusão intracitoplasmática, denominada de Corpúsculo de Negri.

Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/lamneuro6.html>

Outro importante marco no controle dessa doença foi em 1956, quando os pesquisadores chilenos, Fuenzalida e Palácios, desenvolveram uma vacina, produzida a partir de cérebros de camundongos lactentes, que comparada às vacinas produzidas anteriormente foi considerada mais inócua e eficaz. Essa vacina é utilizada até hoje nas campanhas de vacinação animal no Brasil, em todos os estados (ELKHOURY, 2002).

No estado do Ceará, a campanha anual de vacinação ocorre em duas etapas, a primeira no mês de abril e a segunda no mês de novembro. Em abril de 2008 a primeira etapa foi realizada com a vacina Fuenzalida. Na segunda etapa, ocorrida no dia 22 de novembro de 2008 o antigo imunobiológico foi substituído. Foi utilizada a vacina Rabiffa®, um imunobiológico de nova geração. De maneira pioneira, o estado cearense foi o primeiro no País a utilizar uma vacina de cultivo celular, considerada mais eficaz, pois garante uma proteção mais prolongada e mais segura que a anterior, a vacina Fuenzalida & Palácios, visto que essa era produzida através da inoculação em cérebros de camundongo e continha conservantes muito tóxicos como o timerosol e o fenol. Em 2009, os demais estados nordestinos irão utilizar a nova vacina e, até 2010 os demais estados brasileiros. O produto foi importado pelo Ministério da Saúde e passou por

todos os controles de qualidade no exterior e no Brasil. Todos os lotes da vacina fornecidos ao Ceará foram aprovados para uso em cães e gatos pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), responsável pelo controle de produtos biológicos destinados a animais no país (Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, 2008). Em 2009 a campanha anti-rábica no estado do Ceará ocorreu no dia 26 de setembro. Foi realizado somente em uma única etapa, pois devido à melhor qualidade, confere altos títulos de anticorpos protetores, eliminando a necessidade da realização de duas etapas e minimizando os custos (Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, 2009).

Tratamento do vírus rábico

Recentemente, no ano de 2004, ocorreu um dos maiores marcos da história da doença. Na cidade americana de Milwaukee foi registrado o primeiro caso de cura de raiva humana no mundo. A paciente era uma jovem americana de 15 anos. O protocolo utilizado nessa paciente diferiu dos demais, onde o paciente somente era submetido à sedação e à terapia de manutenção. O protocolo criado pelo médico Rodney Willoughby, em homenagem a cidade de origem recebeu a denominação de Protocolo de Milwaukee, não se sabe precisamente todos os seus diferenciais, mas uma das peculiaridades é o uso do medicamento amantadina, considerado de baixo custo e utilizado para tratamentos contra gripes virais e que possui ação no sistema nervoso central, outro fármaco utilizado foi a biopterina, que é um cofator de hidroxilação da fenilalanina em tirosina e também em outras reações envolvendo neurotransmissores (EPIDEMIOLOGIA BRASILIA, 2009).

. Esse protocolo foi repetido até hoje várias vezes no mundo em outras pessoas acometidas com a enfermidade, mas somente três alcançaram a cura virológica, os demais morreram. O primeiro tratamento ocorreu nos Estados Unidos, um segundo na Colômbia e um terceiro no Brasil. O caso brasileiro, de grande repercussão histórica, aconteceu na cidade de Recife, em Pernambuco, onde um rapaz de 15 anos foi mordido por um morcego e após sessenta e sete dias apresentou os sintomas da doença, salivação excessiva e agitação. Os médicos brasileiros seguiram o protocolo americano, com algumas adaptações. Foram realizados vários exames de saliva e constataram que o paciente obteve a cura virológica, não havendo mais vírus da Raiva em seu organismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

2.2 Epidemiologia

Segundo a literatura a Raiva é composta por quatro ciclos. Como a Raiva urbana ocorreu possivelmente devido à ação antrópica, através do desmatamento e queimadas, a Raiva silvestre é considerada o ciclo original da doença e mantenedor dos demais. É conveniente ressaltar que todos os mamíferos, podem portar o vírus, adoecer e transmitir a doença, com exceção de aquáticos, como a baleia e o golfinho (CARTER et al, 2005)

Na Raiva urbana os principais transmissores são o cão e o gato, sendo de maior importância na transmissão da doença o cão domiciliado, visto que tem um maior contato com o ser humano. O gato se torna de menor importância por se tratar de um animal semi-domiciliado (PALÁCIO, 2003).

No ciclo rural da Raiva, os animais de maior importância são os herbívoros, como equinos e bovinos, que geralmente adquirem o agravo através da mordedura dos morcegos, os quais compõem o ciclo aéreo da enfermidade. Já o ciclo silvestre, é composto por carnívoros, como canídeos, felídeos e mustelídeos, dependendo da fauna local. Essa diversidade de ciclos da Raiva é que torna deveras complicado o seu controle, pois fica impossível monitorar e controlar todos os fatores de risco e todos os reservatórios da doença. Os morcegos têm grande importância na epidemiologia da doença, visto que, faz a ligação entre os ciclos da enfermidade e é o maior mantenedor do vírus na natureza (PALÁCIO, 2003).

Na Europa, o papel epidemiológico mais importante cabe aos carnívoros selvagens (raposa, lobo) e ao texugo. Nos Estados Unidos, os carnívoros selvagens são de grande importância nos estados de norte e do leste, porém a oeste é atribuída maior importância aos mustelídeos do gênero “Mephitis” e “Mustela”. Na América Central e na Índia ocidental, o sacarrabos do gênero “Herpestes” é o principal transmissor. Na América latina os morcegos hematófagos são os principais transmissores dos vírus nos bovinos e ovinos. De um modo geral, pode-se dizer que, nos países onde se conseguiu controlar a raiva urbana, o problema epidemiológico deslocou-se para a raiva selvagem (Ministério da Saúde, 2008). Estirpes do vírus da raiva isoladas a partir de casos naturais são designados por “vírus da rua” e estirpes atenuadas em laboratório são designadas por “vírus fixo”. Estas estirpes podem diferir nas suas propriedades biológicas em laboratório, por exemplo, virulência, duração do período de incubação, patologia, e as

variações antigénicas entre estas podem ser distinguidas pela utilização de anticorpos monoclonais. Em certas áreas geográficas é importante a escolha da estirpe para a produção de vacinas (MORENO, 2002).

O Programa Nacional de Controle da Raiva (P.N.C.R) foi implantado no Brasil em 1973 e vem apresentando bons resultados, principalmente no controle da Raiva urbana, transmitida por cães e gatos. Nos anos de 1990 a 2003, o Brasil liderou os números de casos absolutos de óbitos da doença, na América Latina, 412 óbitos. Em 2004, pela primeira vez na série histórica da doença os casos humanos transmitidos por quirópteros foram superiores aos de cães (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2005).

Devido à complexidade epidemiológica da Raiva, sua letalidade é de 100%. A Raiva atualmente é a enfermidade mais grave e preocupante em toda saúde pública, sendo prova de ineficiência da vigilância epidemiológica de uma cidade quando ocorre um caso humano de Raiva, visto que houve falha no controle animal e na prevenção humana. De acordo com a OMS, 55 mil casos de Raiva humana ocorrem no mundo, e esses números ainda são subestimados devido às falhas na notificação e alguns casos que não são repassados do sistema de saúde privado para o público. Desse total de casos, 99% ocorrem nos continentes asiáticos e africanos. Essa alta concentração de casos na Ásia se deve à deficiência ou ausência de um controle de zoonoses e a fatores demográficos, geográficos e culturais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

A doença tem uma distribuição mundial (figura 02), tendo sido erradicada em algumas ilhas como: Japão, Reino Unido e Havaí. A enfermidade encontra-se em todos os continentes, exceto na Oceania. O principal transmissor da Raiva e o ciclo de maior importância epidemiológica diferirão de um local para o outro. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

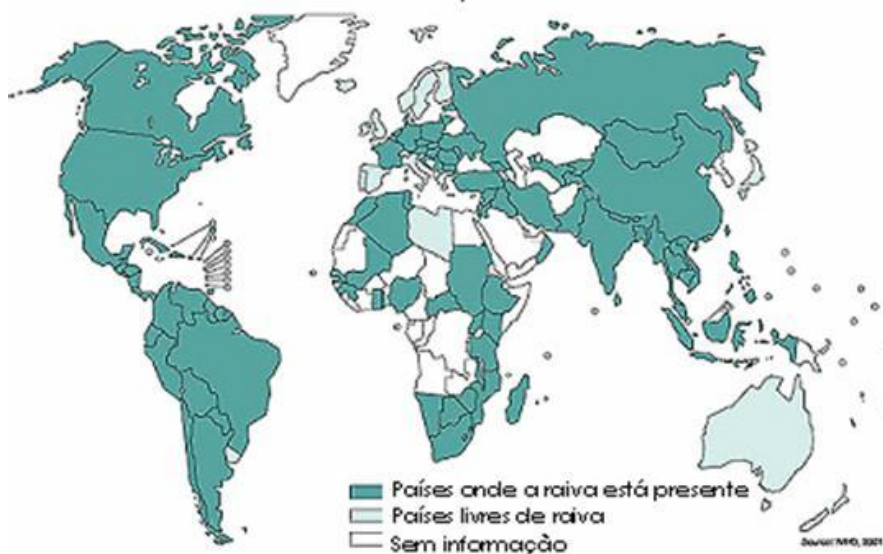


Figura 02. Distribuição mundial da Raiva.

Fonte <http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2004/Raiva.pdf>

Das cinco macrorregiões brasileiras, a região Nordeste é indubitavelmente, a líder em registros de casos de Raiva humanos e animais no decorrer dos anos. Porém tem sido registrado nos últimos anos casos em todas as regiões (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2004).

Dos estados Nordestinos, os mais preocupantes são Pernambuco, Ceará, Maranhão e Bahia. Atualmente estes quatro estados possuem a maior concentração de Raiva canina, como também a maior incidência da Raiva humana transmitida por cães no Brasil, constituindo-se em uma área de alto risco para a Raiva (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2005).

O Estado do Ceará liderou os casos de Raiva humana no Brasil no período de 1980 a 1985, sendo o cão responsável por 87% da transmissão dos mesmos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). No período de 1990 a 2003, o estado do Ceará, e sua capital Fortaleza, notificaram respectivamente 40 e 15 óbitos por Raiva humana, destes, 27 (67,5%) e 15 (100%) respectivamente foram transmitidos por cães. Através destes resultados, Fortaleza se destacou como a cidade que apresentou a maior porcentagem de Raiva humana transmitida por cães na América Latina (ROLIM, 2006).

O estado do Ceará, diferentemente do que ocorreu em outras regiões do Brasil, apresentou nos últimos anos como segundo transmissor da Raiva o *Callithrix jacchus*, ou mico estrela (figura 04). O último registro de casos de raiva humana por cães ou gatos, no Ceará, foi observado em 2003. No ano de 2005 ocorreu somente um caso de raiva no estado, no município de São Luís do Curu, transmitido pelo mico estrela. No ano de 2008, o único caso registrado até o mês de fevereiro ocorreu na cidade de Pedra Branca, ocasionado por mordedura do *Callithrix sp* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).



Figura 03. *Callithrix jacchus* ou mico estrela. Animal silvestre segundo maior transmissor Da Raiva no estado do Ceará.

Fonte: <http://www.naturezaselvagem.hpg.ig.com.br/biografias/mico-lestrela.jpg>

A cidade de Fortaleza há mais de quatro anos não registra casos humanos, nem caninos de Raiva. Apesar do estado cearense não ter eliminado os casos humanos da doença, os números melhoraram bastante, do ponto de vista histórico e epidemiológico da enfermidade. De acordo com a OMS são necessários dez anos sem apresentar nenhum caso de Raiva humana ou animal para determinada área ser considerada livre da Raiva. Partindo desta premissa Fortaleza necessita permanecer mais seis anos sem apresentar nenhum caso, para ser considerada livre da doença (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE FORTALEZA, 2007).

Os casos do agravo em animais também apresentaram uma grande diminuição. No ano de 2003 foram registrados sessenta e cinco casos, enquanto no ano seguinte ocorreu redução de 81% dos casos. No ano de 2005 somente nove casos foram notificados. Nesse mesmo ano, uma possível epizootia de Raiva de herbívoros teria ocorrido no município de Cariré, Ceará, 150 animais morreram, mas somente cinco óbitos foram

confirmados: 03 bovinos, 01 equino e 01 caprino (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2005).

Apesar de Fortaleza não registrar nos últimos anos casos de Raiva, humana ou animal, é necessário uma vigilância constante, pois a circulação viral continua ocorrendo, principalmente em animais silvestres, como morcegos, raposas e micos-estrelas. Além disso, municípios que fazem fronteira com esta cidade vêm apresentando casos de Raiva animal e registros de silvestres positivos, como observado nos municípios de Caucaia, Maracanaú e Maranguape. Estas cidades limítrofes com a capital cearense, não apresentam um controle eficaz da doença (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE FORTALEZA, 2007).

2.3 Etiologia da Raiva

A Raiva é causada por um vírus (figura 02), formado por RNA, fita simples, de polaridade negativa e envolvida por uma complexa ribonucleoproteína, pertence ao gênero *Lyssavirus*, da família *Rhabdoviridae* e da ordem *Mononegavirales*. Esse vírus acomete todos os mamíferos, incluindo o homem (Murphy, et al 1999) (Classe V de Baltimore) (Flint, et al 2004)

A Raiva é uma zoonose. É uma infecção viral que acomete o sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, irremediavelmente fatal. Apesar disso, as espécies de mamíferos variam bastante na sua suscetibilidade. A maioria dos casos clínicos deve-se à infecção pelo vírus da Raiva, Genótipo 1. Vários outros lissavírus neurotrópicos, estreitamente relacionados com o vírus da Raiva, produzem sinais indistinguíveis da doença (CARTER, 2005).

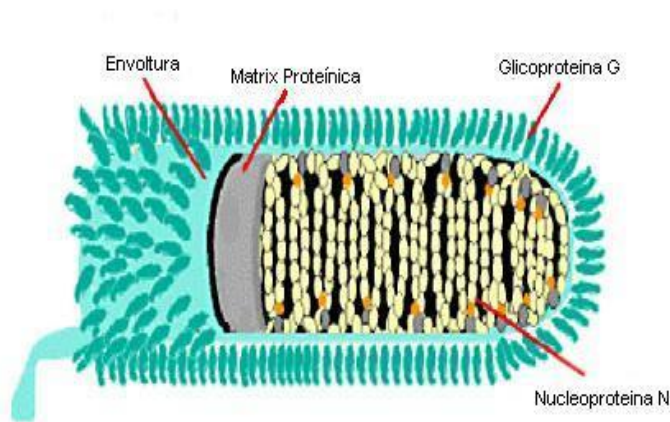


Figura 04. Vírus da raiva. O vírus apresenta forma de projétil

Fonte: <http://br.geocities.com/amorhumano/raivavirus.jpg>

O vírus da raiva é dividido em vírus fixo e vírus de rua (CARTER, 2005). O vírus fixo é obtido em laboratório após sucessivas passagens intracerebrais em camundongos, tem um período de incubação variável de 04 a 06 dias, não ocorre a produção de corpúsculos de Negri, nem ocorre transmissão pelas glândulas salivares, e a patogenicidade ao homem é rara. É um vírus atenuado e bem menos letal que o vírus de rua. O vírus natural ou de rua, tem um período de incubação que varia entre um mês a mais de um ano, ocorre invasão de glândulas salivares, formação de corpúsculos de Negri e tem uma patogenicidade para o homem de aproximadamente 100% (CORREA & CORREA, 1992).

A partícula viral do rhabdovirus apresenta forma de projétil ou cone nos vertebrados e baciliforme nas plantas, é termolábil e sobrevive até 24 horas na saliva. O vírus é inativado, por pH menores que 4 e maiores que 10, agentes oxidantes, solventes orgânicos, detergentes, enzimas proteolíticas, pasteurização, raio-X e radiação ultravioleta (INSTITUTO PASTEUR, 2003). O glicerol e o frio são excelentes conservantes do vírus. Nos cadáveres em putrefação o vírus pode permanecer por até 45 horas (Organização Internacional de Epizootias, 2005)

A família Rhabdoviridae inclui no total 06 gêneros: Vesiculovirus, Lyssavirus(Raiva), Ephemerovirus, Cytorhabdovirus, Novirhabdovirus e Nucleorhabdovirus. Os gêneros Vesiculovirus, Lyssavirus e Ephemerovirus são vírus que infectam vertebrados (INSTITUTO PASTEUR, 2003).

O sequenciamento genético e os estudos antigênicos têm sido usados para classificar o gênero *Lyssavirus* em sete genótipos (Figura 05). Cada genótipo é determinado pelo estado da espécie individual. O genótipo 1, vírus clássico da Raiva, ao contrario do que se relatava, este não se constitui apenas em uma unidade antigênica, pois apresenta variantes conforme a espécie animal, a região ou país proveniente (TORDO et al., 1998).

O genótipo 1, denominada CVS, possui 12 cepas variantes, é endêmica nos continentes, com exceção da Austrália e da Antártica. E os demais genótipos são: Genótipo 2, Lagos Bat, isolado de morcegos frugívoros na África, também isolado posteriormente em animais domésticos com encefalite; Genótipo 3, Mokola, isolado inicialmente em musaranhos na África, também isolado em animais domésticos, e com relatos de infecção em humanos; Genótipo 4, Duvenhage, isolado originalmente em um ser humano mordido por morcego insetívoro e não relatado em animais domésticos, África; Genótipo 5, European Lagos bat (EBL-1), isolado em morcegos insetívoros na Europa, com relatos de infecções em humanos; Genótipo 6, European Lagos Bat (EBL-2), isolado em humano com sintomas da Raiva, presente em morcegos insetívoros, em animais domésticos não há relatos, Europa e Genótipo 7: Australian Lagos Bat (ABL), identificados em morcegos insetívoros e frugívoros na Austrália, com relatos de casos humanos (CARTER, 2005).

O genótipo 1, possui distribuição mundial, enquanto os demais sorotipos somente foram encontrados na África e na Ásia.

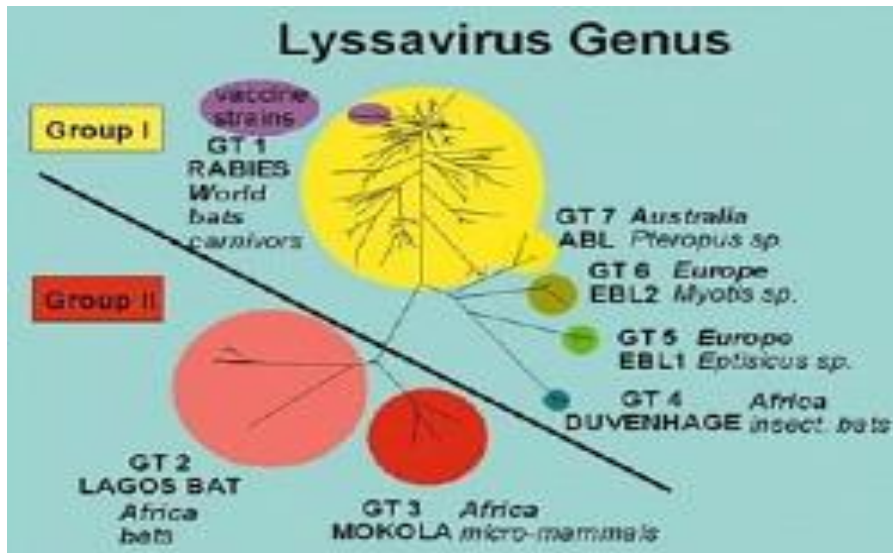


Figura 05. Genótipos do gênero Lyssavirus

Fonte: <http://www.fundepecpr.org.br/imagens/grafico01.jpg>

2.4 Patogênese

Inicialmente o vírus penetra no tecido por meio de mordida, arranhadura ou lambedura de um animal infectado, na pele ou em mucosas. No entanto há evidências de infecções devidas a: exposições ao tecido nervoso do animal raivoso, exposições respiratórias – transmissão por aerossóis, no caso dos morcegos, vacinas defeituosas, e transplantes de córnea (único exemplo de transmissão direta humano-humano, visto que não se conduzem testes de raiva em órgãos destinados para transplante. O contato da pele intacta com urina, sangue ou fezes de um animal não constitui fator de risco, exceto nos morcegos. Em zonas onde há morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus* como na América do Sul, estes são os principais disseminadores da doença em rebanhos (NILSSON, 1975).

Após a exposição viral, o vírus da Raiva pode seguir uma das duas vias: ir diretamente para os nervos periféricos ou ser amplificado nas células do tecido muscular estriado perto do local de inoculação pode persistir nos tecidos musculares locais por

Formatado: Fonte: Negrito, Itálico

horas ou dias, sendo a replicação iniciada em células musculares estriadas próximas ao local da inoculação (ROLIM, 2006). O agente entra nas terminações nervosas periférica, ocorrendo replicação viral que pode estar limitada localmente em miócitos ou em outras células teciduais. O vírus é transportado ao SNC por fluxo axoplásmico retrógrado e torna-se amplamente disseminado no tecido nervoso pela propagação intra-axônica. Os sinais clínicos desenvolvem-se após a lesão neuronal causada pela replicação viral, posteriormente assume sentido centrífugo, disseminando pelo corpo. O vírus infecta vários tecidos não nervosos, inclusive glândulas salivares. A presença do vírus na saliva, especialmente em carnívoros, é um fator importante na transmissão da Raiva. Como o vírus é neurotrópico, embora seja capaz de multiplicar-se em células não nervosas, em condições naturais não utiliza a via sanguínea para a sua disseminação (CARTER, 2005).

Embora o antígeno viral da Raiva seja altamente imunogênico a detecção imunológica é demorada, já que o transporte intracelular previne o contato com as células do sistema imunológico nos estágios iniciais da infecção (CARTER, 2005).

2.5 Período de incubação e Sinais Clínicos

O período de incubação é variável e pode durar até seis meses. É influenciado por diversos fatores, tais como: a espécie do hospedeiro, suscetibilidade individual, a linhagem do vírus, a quantidade do inóculo, local da introdução viral e a quantidade de mordidas. Grandes concentrações virais perto do tronco cerebral estão associadas a um curto período de incubação (ROLIM, 2006). No cão oscila entre os 15 e 90 dias, no Homem entre 20 e 60 dias e no cavalo entre 21 a 90 dias, podendo prolongar-se até 4 meses. Nos ovinos, caprinos, suínos entre 21 e 90 dias, nos bovinos 20 a 80 dias e nos felinos 14 a 60 dias. Os primeiros sinais geralmente aparecem entre 30 a 90 dias após a infecção e a morte ocorre rapidamente, em aproximadamente 7 dias (NÉLIO, 1998).

A fase clínica em carnívoros, que geralmente dura poucos dias, pode incluir fase prodrômica, fase furiosa e fase parálitica. Na fase inicial (prodrômica) os animais afetados ficam confusos e desorientados, podendo ser observado os animais alterando seu horário de alimentação, animais silvestres atravessando estradas na luz do dia, morcegos voando em plena manhã e animais selvagens podendo perder o medo de seres humanos (MORENO 2002). A fase furiosa caracteriza-se por aumento da agressividade

em animais domésticos e silvestres. Essa fase é mais observada em gatos do que em cães. Na Raiva paralítica as características usuais são: fraqueza muscular, dificuldade de deglutição de líquidos, salivação intensa e mandíbula caída. O termo hidrofobia é um sinônimo para raiva em humanos, relaciona-se à inabilidade em deglutir água devido a uma paralisia faríngea (NILSSON, 1966).

No homem, tal como nos animais infectados por raiva, o período prodromico, dura, aproximadamente, entre 2 a 10 dias, e é caracterizado pela não especificidade dos sintomas que podem ser confundidos com os de uma constipação ou gripe comuns. Tal inclui dor de cabeça, febre, fadiga, garganta inflamada, náusea, vômitos, tosse e desconforto gastrointestinal. Ocasionalmente o indivíduo sente dor, torpor ou sensação de repuxar no local da mordidela. Nos humanos os sinais clínicos da raiva são semelhantes ao da poliomielite, aos de outras infecções do Sistema Nervoso Central e do tétano. Contudo, nesta fase é quase impossível diagnosticar o vírus sem tomar medidas invasivas, como biópsia para pesquisar corpúsculos de Negri ou antígenos virais (Rolim, 2006).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da Raiva canina pode ser feito através da observação clínica do cão e pelo surgimento dos sinais e sintomas específicos da doença. Entretanto, outras enfermidades que determinam encefalite podem ter quadro clínico semelhante à Raiva. A diferenciação se dará somente através de exames laboratoriais (MACHADO, 1965). A cinomose em alguns casos apresenta agressividade (NILSSON, 1964).

Os principais diagnósticos laboratoriais pós-morte para Raiva são a pesquisa de corpúsculo de Negri, o isolamento viral ou a prova biológica, a pesquisa da imunofluorescência de antígeno da raiva e as provas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A pesquisa de Corpúsculo de Negri é feita em impressões ou esfregaços de pequenos fragmentos do cérebro, bulbo, cerebelo corado pelos métodos de Seller, Faraco ou outros. Sua sensibilidade varia de 75 a 90%. Ressalta-se que nem todo animal raivoso clinicamente apresentará corpúsculos de Negri (MACHADO, 1965).

A prova biológica é realizada através da inoculação de material nervoso de animal suspeito em camundongos neonatos. Observam-se os camundongos por até um mês, quando estes ficarem paralíticos ou morrerem é retirado material e feito a pesquisa de corpúsculos de Negri, quando forem encontradas as inclusões o diagnóstico para a Raiva estará concluído (MACHADO, 1965). Ao invés da pesquisa de inclusões nos camundongos para confirmação da enfermidade poderá ser realizado o Teste de Imunofluorescência Direta (IFAT) para confirmar a presença do vírus nos camundongos infectados. A pesquisa do antígeno através de técnicas de imunofluorescência é um dos métodos de maior sensibilidade. Não é necessário que o material contenha inclusões, basta que contenha delicadíssimos pontos fluorescentes antigênicos. O vírus pode estar morto ou inativado, mas o conjugado (anticorpo + fluoresceína) o demonstra especificamente (DINIZ, 1975). Por outro lado, a reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR) é utilizada para detecção de RNA viral em amostras de cérebro. Esse teste tem também função de distinguir o vírus da Raiva (genótipo 1) de outros lyssavirus relacionados à Raiva. A RT-PCR é um teste muito sensível, essa sensibilidade pode ser aumentada através da combinação desta técnica com ELISA, que ajuda a detectar produtos amplificados (WHITBY et al, 1997).

Geralmente os testes laboratoriais feitos para Raiva são todos pós-morte, entretanto são realizados testes ante-morte, como por exemplo, a pesquisa viral em folículos pilosos, saliva, líquido cefalorraquidiano (LCR) e impressões de córnea, e a pesquisa de anticorpos neutralizantes do vírus da Raiva (AcN), (Figuras 06,07 e 08) em amostras do soro e LCR (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2004). Alguns pesquisadores recomendam a pesquisa do vírus na saliva ou nas glândulas salivares, mas é conveniente ressaltar que o vírus não está continuamente na saliva, resultando em falsos resultados. Devido a essa peculiaridade o material nervoso é o preferencial para o diagnóstico da Raiva, mas existem alguns casos em que o vírus se isola da saliva e não se isola do Sistema Nervoso Central (S.N.C), provavelmente ocasionado pela presença de substâncias inibidoras da Raiva (S.I.R), no encéfalo (DINIZ, 1975).

Em áreas endêmicas os animais domésticos devem ser observados por até 14 dias. Se desenvolverem sinais clínicos, o cérebro deve ser enviado para exame, visando a confirmação do óbito por Raiva (INSTITUTO PASTEUR, 2003)

Em testes histopatológicos pode ser observada uma encefalite não supurativa, caracterizada por infiltrado linfóide perivascular e por inclusões intracitoplasmáticas (Corpúsculo de Negri). O diagnóstico através de cultivo também é utilizado, neste o vírus é cultivado em células de neuroblastoma ou em células renais de hamster recém-nascido. A cultura do vírus tem valor quando outros testes são duvidosos. O vírus da Raiva que não é citopático é detectado em cultura de tecidos através do uso de anti-soro conjugado (WHITBY et al 1997).

2.7 Controle

O controle de uma doença corresponde ao conjunto de medidas que se adota visando diminuir ou eliminar a ocorrência da mesma em uma região. Com relação à Raiva, as medidas de prevenção são também parte das de controle. Para que as medidas de controle sejam eficientes, é necessário que a população apóie as ações das autoridades de saúde. Para que isso ocorra, essa população deve estar consciente sobre a importância da Raiva e sobre as medidas que são adotadas para evitá-las. Como a Raiva é uma doença incurável, que culmina em morte lenta e com grande sofrimento, geralmente a população aceita muito bem as orientações que são dadas no sentido de preveni-la. No entanto, ainda hoje, muitos seres humanos atingem o óbito por negligenciarem os cuidados mínimos com esta enfermidade. Portanto, é necessário que se enfatize quais são essas medidas (CÔRREA e CÔRREA, 1992)

Imunoprofilaxia, ou seja, o uso de vacinas para prevenir a enfermidade. Existem três tipos de vacina para Raiva em animais, vacinas de vírus vivo atenuado, vacinas de vírus inativado e vacinas de vírus inativado com adjuvante imunológico. As que são comercializadas no Brasil e utilizadas em animais são a vacina Fleury, Fuenzalida e Palácios, e a de Cultivo celular. A vacina Fleury, é denominada assim em homenagem à adolescente norte-americana que morreu de Raiva e nessa jovem foi isolada a amostra de vírus da Raiva. Os pesquisadores adaptaram essa amostra em ovos embrionados, e realizaram 136 passagens, verificando a diminuição da patogenicidade, após 178 passagens não ocorriam mais óbitos (CÔRREA e CÔRREA, 1992). Apesar da atenuação a capacidade antigênica foi mantida e passou a ser utilizada em cães e gatos, através da via intramuscular, dose de 2 a 5 ml dependendo do porte do animal, pois é um imunobiológico composto por vírus vivos atenuados. Essa vacina Fleury substituiu

as antigas vacinas anti-rábicas, que eram feitas com tecido cerebral macerado de animais raivosos, que apesar de imunizar bem, causavam muitos acidentes devido à desmielinização ascendente. O ponto fraco dessa vacina é que pode ocorrer a Raiva vacinal. (CÔRREA e CÔRREA, 1992)

A vacina Fuenzalida, foi desenvolvida no Chile em 1950, por Fuenzalida & Palácios. Inicialmente foi fabricada para uso somente em humanos. Camundongos neonatos favorecem a replicação viral, permitindo a fabricação da vacina, essa vacina contém pouca mielina, tornando mínimos os riscos de desmielinização. A vacina contém vírus inativado (CÔRREA e CÔRREA, 1992). É a vacina utilizada atualmente em campanhas de vacinação de animais (cães e gatos) contra a Raiva e é produzida pelo Instituto Butantã e pelo Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR). A suspensão vacinal é preparada em cérebros de camundongos neonatos infectados com vírus fixo da cepa Pasteur (PV) ou da cepa Challenge Virus Standard (CVS). Os vírus são inativados pela beta-propiolactona. A vacina contém 2% de tecido nervoso, 0,01% de timerosol e 0,1% de fenol (INSTITUTO PASTEUR, 2003).

A vacina é oferecida de forma gratuita nos diversos postos de saúde de vacinação animal existentes no dia da campanha. Alguns postos vacinam o ano todo contra a Raiva e não somente no dia da vacinação em massa. A vacina utilizada é certificada pelo Ministério da Saúde e deve ser aplicada por profissional treinado, que tenha conhecimentos sobre a aplicação do imunobiológico, a via a ser utilizada que é a subcutânea, a idade dos animais (a partir de 4 meses de idade), a dosagem de 2 mL (no caso da Fuenzalida), o local mais indicado para a aplicação e a conservação da mesma que é de 2 a 8 °C.

Um animal imunizado com a vacina Fuenzalida para estar efetivamente protegido deve apresentar titulação de anticorpos superior ou igual a 0,5 U.I/mL e deve-se vacinar acima de 80% da população canina para assegurar que a campanha tenha obtido sucesso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O tipo de vacina mais moderno é a vacina de cultivo celular. Essa vacina evita a morte de milhares de animais para sua fabricação, visto que o meio utilizado é a célula. Esse imunobiológico é a adaptação do vírus fixo em células, podendo ser produzidas em diversas células como as de rim de hamster neonato (BHK) e células renais de suínos. O título obtido por essa vacina é alto e propicia excelente imunidade, mais segura e confiável que a Fuenzalida, o único inconveniente é o alto custo (CÔRREA, 1992). A

vacina de cultivo celular é utilizada para prevenção de casos humanos da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Outra grande ferramenta no controle da zoonose é o controle populacional de cães, através da realização de esterilizações, químicas ou físicas, captura de animais irrestritos e eliminação de animais errantes e suspeitos, e envio de material para confirmação do motivo do óbito. Deve ser realizada quarentena de animais importados, esses animais devem vir com atestado de saúde e de vacinação assinados por veterinário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Deve-se proibir e alertar a população, por meio de canais de comunicação, sobre a criação de animais silvestres como o mico-estrela, pois esses animais não possuem um período de quarentena determinado e não se sabe se a vacina utilizada em cães e gatos tem eficácia em animais silvestres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Em caso de agressão, a arranhadura ou mordedura por animal suspeito, deve ser lavado imediatamente o local com água e sabão em abundância. Não é recomendado o uso de sabonetes, nem detergentes, pois a ação do sabão é muito mais eficiente. O sabão é produzido à base de soda cáustica, possuindo um pH básico que destrói quase imediatamente vírus da Raiva Mesmo lavando o local, o paciente deve ser encaminhado ao serviço médico local. O soro anti-rábico é utilizado em casos graves, no caso de lacerações profundas, múltiplas ou ainda agressão por espécies silvestres como morcegos e raposas, que sempre são consideradas agressões graves (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O morcego, responsável pelo ciclo aéreo da doença, é o maior mantenedor de vírus na natureza. Tem maior importância no ciclo rural da doença, ao se alimentar de bovinos e eqüinos. Esse hospedeiro deve ser combatido em áreas endêmicas, através de captura com redes especiais e uso de pastas vampiricidas. Cada animal capturado e que será passado a pasta resultará na morte de aproximadamente 20 animais, devido o hábito desses animais de lambadura visando a higienização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A vacinação de herbívoros no Brasil somente é recomendada em áreas endêmicas. Para o que controle dessa zoonose tenha eficácia é necessário que todas ações sejam tomadas em conjunto e adotar a criação de barreiras epidemiológicas com países vizinhos que não tenham a Raiva controlada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A cidade de Fortaleza, desde o ano de 2003, quando uma jovem de 15 anos faleceu, ao adquirir Raiva de um cão errante, não apresentou nenhum caso de Raiva humano, ou canino. Caso Fortaleza complete dez anos sem casos humanos ou caninos da doença será considerada uma área livre da Raiva. Mas essa situação não é tranqüila como aparenta, pois a realização de captura de animais irrestritos está suspensa por ordem judicial, o que dificulta o controle da enfermidade. Não existe um programa de controle da Raiva silvestre que pode facilitar a reintrodução de vírus na cidade e estudos realizados nos diversos estados do país demonstraram que a vacina Fuenzalida não está conferindo títulos de anticorpos protetores acima do recomendável pelo Ministério da Saúde, que é superior a 0,5 U.I/mL (SECRETARIA DE SAÚDE DE FORTALEZA, 2008).

3. JUSTIFICATIVA

A Raiva é uma zoonose grave que quase sempre leva o paciente à morte. A prevenção da Raiva animal é realizada via campanhas de vacinação massivas, destinadas a cães e gatos e feitas anualmente, e em áreas endêmicas, essa campanha ocorre em duas etapas. A cidade de Fortaleza apresentou elevada incidência de Raiva animal e humana e, graças a medidas profiláticas, dentre elas a vacinação, não registra casos humanos ou animais da doença há quatro anos, contudo ainda eram realizadas duas campanhas anuais até o primeiro semestre do ano de 2008. A partir do segundo semestre do ano de 2008, houve uma substituição da vacina, anteriormente era a vacina Fuenzalida e Palácios e a nova é uma vacina produzida em cultivo celular, teoricamente mais segura e eficaz. A campanha passou a ser anual desde então.

A vacinação animal, o controle populacional de cães, captura de animais irrestritos, têm papel preponderante no controle dessa doença. Entretanto, essas ações precisam continuar. Negligenciar a aplicação de qualquer uma dessas medidas poderá resultar em graves consequências, como a ocorrência de novos casos de Raiva.

No intuito de monitorar a ação preventiva da vacinação anti-rábica em Fortaleza, uma amostragem populacional canina foi realizada e uma posterior titulação dos anticorpos protetores de animais vacinados contra a Raiva e visando desta forma comprovar a eficiência da vacinação anteriormente utilizada e traçando um comparativo de eficácia entre os dois tipos de imunobiológicos, avaliando a importância da medida ou ajustando os fatores que estão contribuindo para as possíveis falhas da vacinação.

Desta forma esta dissertação estará atuando efetivamente, no complemento da ação comunitária no controle desta zoonose de tão grande impacto na saúde pública.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A vacinação em massa contra a Raiva canina realizada em Fortaleza, na Secretaria Executiva Regional III é efetiva, conferindo o título soroneutralizante maior ou igual a 0,5 U.I/mL exigidos pela O.M.S. e vacinar mais de 80% da população canina.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia da nova vacina de cultivo celular em uso na SER III, no município de Fortaleza, Ceará

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Avaliar a eficácia de anticorpogênese de vacinas contra a raiva utilizando o teste de soroneutralização como parâmetro de avaliação de cães imunizados no município de Fortaleza

5.2.2 Determinar a porcentagem de animais que soroconverteram, ou seja, com titulação de anticorpos superior ou igual a 0,5 U.I/mL;

5.2.3 Demonstrar o perfil imunológico frente a atual vacinação em massa de cães na SER III, Fortaleza;

5.2.4 Avaliar qual dos dois imunobiológicos induziu maiores títulos de anticorpos

6. CAPÍTULO 01

Status imunológico de cães vacinados contra o vírus da Raiva em Fortaleza, Ceará.

Immune status of dogs vaccinated against Rabies in Fortaleza, Ceará.

Periódico: Instituto Oswaldo Cruz (Submetido em outubro de 2008).

Status imunológico de cães vacinados contra o vírus da Raiva em Fortaleza, Ceará.

José Arturo de Oliveira Carvalho^{I, II}; Maria Fátima da Silva Teixeira^{III}; Luzia Martorelli^{IV}; Alfredo Magalhães^V; Tânia Valeska Dantas^{VI}

^I Mestrando do programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE

^{II} Médico-Veterinário, Coordenador Vigilância Ambiental SERIII, Prefeitura de Fortaleza, Fortaleza, CE

^{III} Professora doutora, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, CE

^{IV} Assessora Técnica do Laboratório da Raiva e Doenças Transmitidas por Vetores, CCZ da Prefeitura Municipal de São Paulo, SP

^V Estudante, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, CE

^{VI} Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE Universidade Estadual do Ceará, CE

e-mail: arturocarvalho@oi.com.br

Rua Carlos Camara, 1738, apartamento 202, Bairro Benfica, Fortaleza Ceará.

CEP: 60415810

Telefone: (85) 86066927

RESUMO

A raiva é uma das doenças mais preocupantes na saúde pública. Embora a Raiva canina esteja controlada na cidade de Fortaleza Ceará, nunca foi realizado um estudo para comprovar a qualidade da imunização animal. Este trabalho avaliou a titularidade de anticorpos protetores através de coletas e realização de exames de soroneutralização em uma amostra de 100 animais. Nos 15 postos da Secretaria Executiva Regional III, Fortaleza/CE, formou-se dois grupos, animais vacinados (Com dois tipos de imunobiológicos) e não-vacinados, sendo estes submetidos a duas coletas, uma anterior à pesquisa e outra 60 dias após. Os soros obtidos foram armazenados no LABOVIR-UECE e a titulação de anticorpos foi realizado no CCZ de São Paulo. Na coleta 01, apenas 27% dos animais estavam protegido contra a Raiva, na coleta 2, 100% estavam protegidos. Atualmente os níveis de anticorpos foram satisfatórios, demonstrando uma eficácia da vacinação animal em Fortaleza-Ceará.

Palavras-chave: Raiva. Imunobiológico. Coleta. Titulação

ABSTRACT

The rabies is one of diseases the most concern in the public health. Although canine rabies is under control in city of Fortaleza, Ceará, never was performed a study to show the quality of animal immunization. This study evaluated the titration of protective antibodies through collections and examinations of serum neutralization in a sample of 100 animals. In the 15 posts of Executive Secretary III Regional, Fortaleza / CE, formed two groups, vaccinated (with two types of immunobiological) and non-vaccinated, which underwent two collections, one prior to the survey and another 60 days after. Sera were stored in Labovir-UECE and antibody titration was performed in the CCZ of Sao Paulo. In the collect one, only 27% of the animals were protected against rabies, collection 2, 100% were protected. Currently, antibody levels were satisfactory, showing an efficacy of animal vaccination in Fortaleza, Ceara.

Keywords: Rabies. Immunobiological. Collection. Titration

Introdução

A Raiva é uma encefalomielite viral aguda, zoonótica e de distribuição cosmopolita, que invariavelmente leva à morte do animal afetado (TORDO et al., 1998). O vírus da Raiva é mantido na natureza em quatro ciclos epidemiológicos: urbano, rural, silvestre e aéreo (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 1996). O ciclo urbano é o que oferece maior risco à saúde humana, pois é transmitido por animais domésticos de companhia, como o cão e o gato, que têm uma maior proximidade com a família, favorecendo a transmissão da doença (TORDO et al., 1998). Ocorrem, segundo a Organização Mundial de Saúde (O.M.S), 55 mil casos humanos de raiva no mundo, 99% deles na China, sendo que 60 a 90% das transmissões ocorrem através do cão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

No Brasil, de acordo com o Programa Nacional de Controle da Raiva (P.N.C.R), instituído em 1973, o animal ou ser humano são considerados protegidos quando a titulação de anticorpos é superior a 0,5 UI/mL. Para que se atinjam esses níveis de anticorpos considerados protetores são realizadas campanhas de vacinação anuais, destinadas a animais domésticos(cão e gato). Em municípios onde a doença não está controlada ou apresentou casos recentes, são feitas duas campanhas anuais (ROLIM,2006). A Raiva urbana está atualmente controlada no Brasil, um caso da

enfermidade em humanos em um município é a prova da ineficácia de sua vigilância epidemiológica e ambiental (GOMES, 2005).

Apesar de não registrar casos caninos ou humanos do agravo, a cidade de Fortaleza vinha realizando vacinação animal semestralmente (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2004). Estas campanhas têm sua qualidade questionada por vários técnicos devido às possíveis falhas que ocorrem na campanha, tais como: imperícia do vacinador, falta de treinamento adequado do profissional, conservação da vacina, falha na cobertura, erro na dose e via de aplicação (ROLIM, 2006). Apesar da campanha prevenir a Raiva humana e animal, alguns estudiosos afirmam que a campanha seria muito mais benéfica à saúde humana do que à saúde animal, pois a durante a realização da mesma, ocorre uma propagação na veiculação de doenças contagiosas entre os animais, devido às grande aglomerações de cães e gato nos dias da campanha (MORENO, 2002).

Devido ao grande número de possíveis falhas vacinais, questiona-se a eficácia da vacinação. Pesquisadores guiados por essa dúvida fizeram titulação em cães vacinados, , na cidade de Campo Grande, no estado do Mato Grosso do Sul, e constataram que 51% dos cães vacinados apresentaram titulação para raiva inferior ao 0,5 UI/mL recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), demonstrando uma ineficácia da vacina ou dos métodos de vacinação (RIGO ET AL, 2006).

Material e métodos

A metodologia que foi desenvolvida foi dividida em três etapas: Na 1ª etapa foi a realização das duas coletas dos cães. Foram coletados 3 mL de sangue através da veia cefálica de 100 animais, durante o dia da campanha animal de novembro, 2008. Os animais foram oram divididos em dois grupos: Grupo 1- animais com 0 dose, numerados do 1 ao 50 e Grupo 2- animais que receberam uma ou mais doses(animais vaicnados anteriormente com a vacina Fuenzalida) , numerados do 100 ao 150. Sessenta dias após a primeira coleta, houve uma nova coleta dos mesmos animais após estes terem sido imunizados (Foi utilizado um imunobiológico novo em relação aos anos anteriores, vacina de cultivo celular), este tempo foi determinado para que o sistema imune dos animais vacinados tivesse tempo de responder à vacinação e desta forma apresentassem níveis de títulos de anticorpos detectáveis. As amostras foram levada ao

LABOVIR-UECE e submetidas à centrifugação de 3000 rpm durante 10' para separar os soros que posteriormente foram armazenados a -20°C. Os animais somente foram submetidos à coleta após os proprietários assinarem o termo de anuência, permitindo que seu animal fosse submetido à coleta e assim participasse do experimento. Nesse documento também constam dados dos animais coletados, como: nome, sexo, raça, histórico vacinal e endereço. Na 2ª etapa- Foi realizado um teste rápido de soroneutralização por inibição de focos de fluorescência (RIFFT), (DAS, 1986) no CCZ de São Paulo para verificar se níveis de anticorpos dos animais coletados está igual ou acima de 0,5 U.I/mL, recomendado pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde. Uma comparação na titulação foi feita entre as duas coletas, verificando se houve progressão dos níveis de anticorpos presentes no soro após um mês da vacinação, se houve uma resposta vacinal eficaz ou não. Na 3ª etapa foi realizada Análise estatística dos dados. (média, comparação entre grupos e desvio padrão). Foi realizada no Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo. As amostras foram avaliadas pelo teste rápido de inibição de focos de fluorescência em cultivo celular para verificar se a titulação está igual ou acima de 0,5 U.I/mL, recomendado pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde. O princípio do teste rápido de inibição de focos fluorescente (RFFIT) para determinação de anticorpos neutralizantes antivírus da raiva é a neutralização in vitro de uma quantidade constante de vírus após inoculação deste em células susceptíveis ao vírus. O título é expresso em UI/mL, após comparação, com o título de um soro padrão diluído nas mesmas condições do teste. O método foi realizado em placas de 96 poços, sendo a técnica uma adaptação realizada por Zalan et al. (1979) e Perrin et al. (1985). Os soros foram inativados a 56°C, em banho-maria, por 30 minutos, foram realizadas 8 diluições seriadas dos soros diretamente na placa de microtitulação. A primeira diluição foi realizada adicionando 20µL de cada soro teste (H1 à H12); com a pipeta multicanal foi feita à homogeneização (meio+soro), seguindo a transferência de 50µL para a segunda coluna e assim sucessivamente, descartando 50µL do último poço, todos os orifícios ficam com um volume final de 50µL. Foi adicionado em todas as diluições 50µL de vírus desafio (cepa PV, previamente titulado), contendo de 32 a 100 FFD50/0,05mL. A placa foi incubada por 60 minutos a 35°C em estufa com 5% de CO₂. Dez minutos antes do término da incubação foi iniciada a tripsinização (descolamento das células da parede da garrafa). As células foram ressuspensas com a adição de 10mL de meio

eagle (2,5% de SFB), a contagem feita em Câmara de Newbauer, após isso foi realizada uma diluição, de modo que se obteve uma suspensão celular final de $3,7 \times 10^5$ células/mL. Foi adicionado 50µL da suspensão de células em todos os poços da placa, sendo estas incubadas novamente. Ao término da incubação, as placas foram retiradas da estufa, o meio aspirado e descartado utilizando uma pipeta multicanal. As placas foram fixadas, seguindo-se uma incubação de por 10 minutos em freezer -20°C. A acetona foi desprezada por inversão das placas, sendo estas colocadas para secar em estufa 37°C por 10 minutos. Após estarem secas, acrescentou-se 40µL do conjugado (rabies conjugate Fujirebio), incubou-se por uma hora em câmara úmida a 37°C. O conjugado foi desprezado por inversão da placas, sendo estas lavadas por imersão, duas vezes com solução salina tamponada e uma com água destilada. O excesso de água foi retirado colocando as placas invertidas sobre papel absorvente, secagem em estufa 37°C. Após as placas estarem totalmente secas, foi adicionada a toda a placa uma solução de glicerina tamponada (pH 8,0/8,5; 1 gota/poço). Após esses processos a leitura foi realizada em microscópio invertido de fluorescência, e os títulos calculados de acordo com o método de Spearman-Kärber, através da comparação com o soro padrão homólogo que contém 300 U.I/mL. São considerados protetores, títulos $\geq 0,5$ UI/mL (OMS, 2005). Uma comparação na titulação foi feita entre as duas coletas, verificando se houve progressão dos níveis de anticorpos presentes no soro após um mês da vacinação, se houve uma resposta vacinal eficaz ou não.

RESULTADOS

1ª Coleta

Os animais do grupo 1, numerados do número 1 até o 50, que não haviam recebido nenhuma dose da vacina anti-rábica obtiveram em sua grande maioria titulações abaixo dos 0,5 U.I/mL recomendado pelo Ministério da Saúde. Somente 6% do grupo 1, ou seja, 03 animais apresentaram títulos iguais ou acima do ideal, os cães representados pelos números 06, 10 e 25. Como esses animais eram todos jovens

com faixa etária de 2 a 4 meses de idade e nunca haviam recebido imunógenos, possivelmente esses anticorpos foram adquiridos de modo passivo via intrauterina. O grupo 2, representado por animais com uma ou mais doses, que foram numerados do número 100 ao 150 haviam sido vacinados com o imunobiológico anteriormente utilizada em Fortaleza, a vacina Fuenzalida e Palácios. Dos 44 animais coletados, apenas 12 estava com títulos protetores, o que representa um percentual de 27,27% .

2ª Coleta

Na segunda coleta, todos os animais já haviam sido vacinados com o novo imunobiológico, a vacina de cultivo celular Rabifa®. A coleta foi realizada 2 meses após a primeira. Na segunda coleta não foi possível coletar todos os animais da primeira coleta, pois muitos animais haviam sumido, foram abandonados ou morreram. Os cães pertencentes ao Grupo 01, na segunda coleta dos 50 cães coletados, mas somente em 34 foi possível realizar as titulações. Desse total 29, ou seja, 85,29% apresentaram títulos de anticorpos iguais ou superiores a 0,5 U.I/mL. Já os animais do grupo 2, somente 38 cães foram coletados. Desses, 13 não foi possível realizar a titulação. Das 25 titulações realizadas, todas apresentavam títulos de anticorpos superiores a 0,5 U.I/mL. O que representa uma proteção de 100% dos animais vacinados.

Discussão

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir sobre a importância da vacinação de animais contra a Raiva para a prevenção da doença, pois a maioria dos animais do grupo 1, que não tinham tomado nenhum tipo de vacina da raiva, antes de receberem a vacina de cultivo celular, 86% apresentavam títulos protetores médios em torno de 0,22 UI/mL. Após a vacinação a grande maioria desses animais (82,8%) apresentou títulos protetores médios em torno de 0,98 UI/mL, ocorrendo um aumento em média de 0,76 UI/mL, o que demonstra a boa qualidade do novo imunobiológico utilizado em Fortaleza.

Os animais do grupo 2, que haviam sido vacinados anteriormente com a vacina Fuenzalida e Palácios apresentaram um nível muito baixo de proteção contra Raiva, somente 27,27% dos animais estava com títulos protetores médios em torno de 0,30

UI/ml. Já na segunda coleta podemos observar a excelente qualidade da nova vacina, pois a maioria dos animais (84,6%) apresentou títulos de anticorpos médio em torno de 0,896 superior a 0,5 U.I/mL, conferindo uma proteção efetiva contra a Raiva.

A partir do teste do Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%, e do coeficiente de correlação constata-se que os resultados da titulação da vacina de cultivo celular Rabifa independem do tipo de grupo, ou seja, do animal não ter tomado a vacina ou já ter tomado a vacina anteriormente a sua aplicação. Os percentuais de animais reagentes encontrados estão próximos aos resultados de outros estudos, realizados em Mato Grosso, com os animais vacinados na campanha (Rigo et al,2006) e a resultados obtidos em um estudo realizado em São Paulo com cães dos municípios de Paulínia e São Paulo (Marilene et al, 1997) .

Apesar da cidade de Fortaleza apresentar cobertura vacinal acima de 80% do total da população animal, recomendado pelo Ministério da Saúde pode afirmar com base na pesquisa realizada que as campanhas anti-rábicas animais anteriores foram insatisfatórias, pois os animais não estavam efetivamente protegidos contra a Raiva, mas atualmente baseado na última campanha foi plenamente satisfatório. Apesar da maioria dos animais em campanhas anteriores estarem com baixos títulos não ocorreu casos caninos de Raiva nos últimos anos, que nos leva a corroborar com outros autores (Aubert, 1992) que citam que esse número padrão de 0,5 U.I/mL para considerar um animal devidamente protegido, pode estar superestimado em cães, esse número deve ser reavaliado nessa espécie.

Conclusões

Os animais vacinados nas campanhas anteriores do município de Fortaleza, não estavam efetivamente protegidos contra a Raiva

Agradecimentos

À M.F Teixeira, Luzia A.F. Martorelli, ao Labovir-UECE e ao Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, SP, pela realização dos testes sorológicos.

Referências Bibliográficas

Aubert, M.F.A. Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.*, **11**:735-60, 1992

Das, S.K. et al. Application of indirect fluorescent antibody test in determining the post vaccinal immune response against rabies in canine. *Indian J. Animal Health*, **26**:151-6, 1986.

Gomes, F. J.; Rolim, B. N. Avaliação epidemiológica do comportamento da raiva humana no município de Fortaleza-CE, no período de 2000 a 2003. In: Temas em saúde da família - práticas e pesquisas. Fortaleza: Ed. UECE. v.1, 2005. 332p.

Hogenesch, H, Thomson, S, Dunhama, A, Ceddia, M, Hayek, M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. *Veterinary Immunol Immunopathol* 97:77-85, 2004.

Instituto Pasteur. In:Manual Técnico do Instituto Pasteur Número 6 - Controle de Populações de Animais de Estimação, São Paulo, 2000.

Instituto Pasteur, In: Seminário internacional: morcegos como transmissores da Raiva. Instituto Pasteur - SP, Pasteur Informa, jan/mar – 2003, n.7 – ano 4.

Moreno, J. O. In:Diagnóstico laboratorial do vírus da Raiva. Universidade Estadual do Ceará, curso de especialização em bioquímica e biologia molecular. Fortaleza – Ceará. 2007. p.6.

OPAS, Organização Panamericana De La Salud. Vigilancia epidemiológica de la rabia em las Américas. In: Boletim de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia em las Américas, v. 28, 1996. 28p.

OPAS, Organização Panamericana De La Salud. Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: Análisis de la situación, ano 2004. Washington, D.C: OPS, 2005.

Organização Mundial de Saúde –OMS/WHO – World Health Organization. Expert Consultation on rabies. Geneva, Switzerland, 2005.

Palácio, A. R. S. Perfil epidemiológico da raiva silvestre no estado do Ceará e desafios ao seu alcance. 2003. 103p. Dissertação (Conclusão de curso) – Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza, 2003.

Perrin P, Joffret ML, Zanetti C, Bourhy H, Gontier C, Fritzell C, et al. Rabies-specific production of interleukin-2 by peripheral blood lymphocytes from human rabies vaccines. *Vaccine*, **9**:549-58, 1991.

Rigo, L, Honer, M.R, Titulação de anticorpos contra o vírus da raiva em cães, em Campo Grande, MS, na Campanha Anti-Rábica de 2003. *Rev Soc Bras Med Trop*. V.39, p.553-555, 2006

Tordo, N., Charlton, K., Wandeler, A. I. Rhabdoviruses: Rabies. In: *Microbiology and microbial infections*. Vol. 1. 1998. P.665 – 692.

Zalan, E.; Wilson, C. & Pukitis, D. - A microtest for quantification of rabies virus neutralising antibodies. **J. biol. Stand.**, 7: 213-220, 1979.

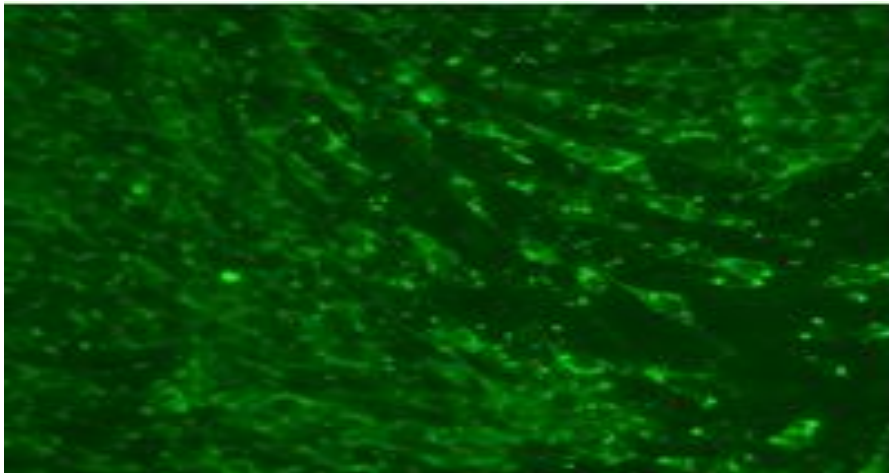


Figura 06. Visualização no microscópio invertido de amostra com ausência de anticorpos neutralizantes.

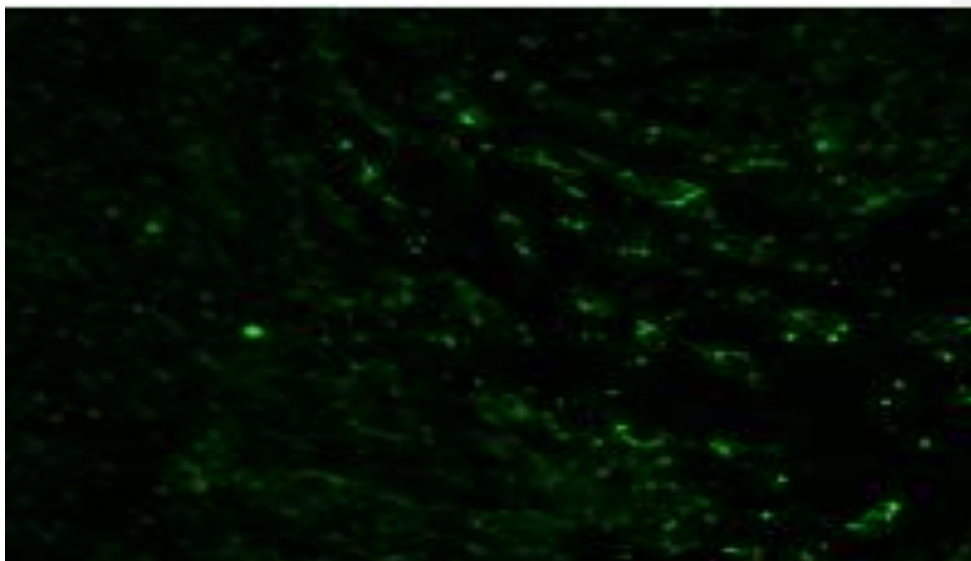


Figura 07. Visualização no microscópio invertido de amostra com poucos anticorpos neutralizantes

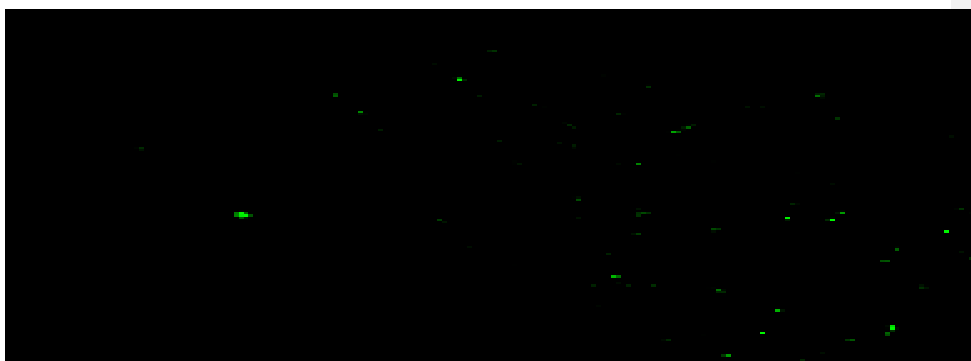


Figura 08. Visualização no microscópio invertido de amostra com anticorpos neutralizantes.

7.CONCLUSÕES

* De acordo com os resultados obtidos podemos concluir sobre a importância da vacinação de animais contra a Raiva para a prevenção da doença, pois os animais do grupo 1, antes de receberem a vacina de cultivo celular não apresentavam títulos protetores. Após a vacinação a grande maioria desses animais apresentou altos títulos o que demonstra a boa qualidade do novo imunobiológico utilizado em Fortaleza.

*Os animais do grupo 2, que haviam sido vacinados anteriormente com a vacina Fuenzalida e Palácios apresentaram um nível muito baixo de proteção contra Raiva, somente 27,27% dos animais estava com títulos protetores. Já na segunda coleta podemos observar a excelente qualidade da nova vacina, pois todos os animais apresentaram altos títulos de anticorpos, conferindo uma proteção efetiva contra a Raiva.

*Apesar da cidade de Fortaleza apresentar cobertura vacinal acima de 80% do total da população animal, recomendado pelo Ministério da Saúde podemos afirmar com base na pesquisa realizada que as campanhas anti-rábicas animais anteriores foram insatisfatórias no ponto de vista imunológico, pois os animais não estavam efetivamente protegidos contra a Raiva, mas atualmente baseado na última campanha foi plenamente satisfatório.

8. PERSPECTIVAS

A vacina de cultivo celular possui uma qualidade superior às demais e por isso, deverá tornar-se imunobiológico de eleição em todos os estados do país.

·É necessário que se realize um monitoramento contínuo da nova vacina através de amostras de soros caninos afim de visualizar sua qualidade em um longo prazo

•Como o vírus da Raiva é um parasita intracelular é necessário que além das titulações de anticorpos se Avalie a resposta celular do novo imunobiológico através das dosagens de interferon.

• Como a Raiva urbana, transmitida por cães e gatos está controlada em Fortaleza a vigilância da Raiva deverá ser direcionada contra a Raiva silvestre.

• Para se controlar a Raiva silvestre será necessário a realização de Vacinação oral dos animais silvestres

• Como a captura de animais errantes não é mais realizada em Fortaleza, a adoção de Programas de controle de natalidade canina e felina é uma necessidade urgente. Além disso deverá ser adotado a utilização de um registro de identificação animal.

• Um dos meios mais eficazes para a reintrodução da Raiva urbana é a utilização de protocolos mais rigorosos para autorização do ingresso de cães e gatos vindos de áreas onde a Raiva não está controlada.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARTER M.E, MARKEY B.K,QUINN P.J, DONNELLY W.J. **Veterinary Microbiology**, v.23, p.115-28, 2005.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Human Rabies – Washington. MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** v.44, 1995.

CÔRREA W.M, CÔRREA,C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**, segunda edição, p.609-627, capítulo 68, 1992

DAS, S.K. **Application of indirect fluorescent antibody test in determining the post vaccinal immune response against rabies in canine.** *Indian J. Animal Health*, **26**:151-6, 1986.

DINIZ, C.C.C; REIS, R. **Comparação de provas de imunofluorescência indireta e soroneutralização na titulação de anticorpos anti-rábicos em soro de bovinos vacinados.** *Arq. Esc.Vet. UFMG*, 27:29-37, 1975

EPIDEMIOLOGIA SERVIÇOS DE SÚDE, BRASÍLIA, 18(4):385-394, out-dez 2009. **Protocolo para tratamento de Raiva Humana no Brasil.** Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/protocolo_tratamento_raiva_humana.pdf

ELKHOURY, M.R.; MAIA, A. N. S; PHEBO, L. **Aspectos epidemiológicos da Raiva humana no Brasil – 1998.** Relatório Técnico, Brasília 2002, 22p.

FLINT, S. J., ENQUIST, L.W., RANCANIELLO, V. R., SKALKKA, A. M. (2004). **Principles of virology, Molecular Biology, Pathogenesis and control animal viruses**, 2ª edição. ASM Press, USA

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde - **Guia Brasileiro de VigilânciaEpidemiológica**, 5. ed, 1998.

GOMES, F. J.; ROLIM, B. N. Avaliação epidemiológica do comportamento da raiva humana no município de Fortaleza-CE, no período de 2000 a 2003. In: **Temas em saúde da família - práticas e pesquisas.** Fortaleza: Ed. UECE. v.1, 2005. 332p.

INSTITUTO PASTEUR. **Manual Técnico do Instituto Pasteur Número 6 - Controle de Populações de Animais de Estimação**, São Paulo, 2000.

INSTITUTO PASTEUR, In: **SEMINÁRIO INTERNACIONAL: MORCEGOS COMO TRANSMISSORES DA RAIVA.** Instituto Pasteur - SP, Pasteur Informa, jan/mar – 2003, n.7 – ano 4.

MARTORELLI L.A.F, ALMEIDA MF. AGUIAR, EA.C, LUZIA A. F. M. **Resposta imune humoral de cães à vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes,**

utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. In: Rev. Saúde Pública vol. 31 no. 5 São Paulo Oct. 1997

MACHADO, C.G. **Raiva humana.** II Simpósio Bras. Raiva, 28-36, Rio de Janeiro, 1965

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Manual de controle da Raiva urbana,** 2005

MORENO, J. O. **O perfil epidemiológico da Raiva urbana em Fortaleza e os desafios ao seu controle.** 2002. 70p. Dissertação (Conclusão de curso) – Medicina veterinária, Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza, 2002

MORENO, J. O. **Diagnóstico laboratorial do vírus da Raiva.** Universidade Estadual do Ceará, curso de especialização em bioquímica e biologia molecular. Fortaleza – Ceará. 2007. p.6.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology.** 3.ed, Academic Press, 1999

MORAES, N.B. **Wild rabies in Ceara and its implications for public health.** In: __. **Ixth National Meeting of Virology.** Virus Reviews & Research. V.03, sup.1, p.35, 1998.

NILSSON, M. R. **Considerações sobre um vírus rábico de curto período de duração, isolado de bovino.** Arq. Inst. Biol. S. Paulo, 1962

NILSSON, M.R, NAGATA, C.A. **Isolamento do vírus rábico do cérebro, glândulas salivares e interescapular, coração, pulmões e testículos de morcegos *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1910), no Estado de São Paulo.** Arq Inst Biol (Sao Paulo).1975; 42(23):183-8

OPAS, ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Vigilância epidemiológica de la rabia em las Américas.** In: Boletim de Vigilância Epidemiológica de la Rabia em las Américas, v. 28, 1996. 28p.

OPAS, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina:** Análisis de la situación, ano 2004. Washington, D.C: OPS, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE –OMS/WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Consultation on rabies.** Geneva, Switzerland, 2004.

PALÁCIO, A. R. S. **Perfil epidemiológico da raiva silvestre no estado do Ceará e desafios ao seu alcance.** 2003. 103p. Dissertação (Conclusão de curso) – Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza, 2003.

PENA, G. O. **Doenças infecciosas e parasitárias.** Ministério da saúde: Fundação nacional de saúde. Brasília/DF, 2º Ed. 1998. 220p.

RIGO, L.; HONER, M. R. Titulação de anticorpos contra o vírus da raiva em cães, em Campo Grande, MS, na Campanha Anti-Rábica de 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.39, p.553-555, 2006.

ROLIM, B.N Avaliação da incidência de raiva no estado do Ceará no período de 1990 a 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.37, p.396, 2004

ROLIM, B. N. **Avaliação dos casos de raiva humana transmitidas por cães: na América Latina, no Brasil, no Ceará e em Fortaleza, no período de 1990 a 2003**. In: II Feira de Ciência, Cultura, Tecnologia e Inovação do Estado do Ceará, no período de 19 a 23 de junho de 2006. Anais publicados pela Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará, Brasil. 2006

SCHNEIDER, M.C.; SANTOS-BURGOA, C. Tratamiento contra la rabia humana: um poco de su historia. **Rev. Saúde Pública**, v 28, n 6, p. 454-463, 1994.

SEMUSA-FORTALEZA. Secretaria de Saúde de Fortaleza. **Boletim informativo**. Fortaleza, 2007

SMITH, J.; YAGER, P.; BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibodies. **Bull W.H.O.** **48**, 535-541, 1973.

SESA-CE. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, coordenação do programa estadual de controle da Raiva. **Informe técnico-Relatório 2004**. Ceará, 2004.

SESA-CE. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, coordenação do programa estadual de controle da Raiva. **Informe técnico-Relatório 2005**. Ceará, 2005.

SESA-CE. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, coordenação do programa estadual de controle da Raiva. **Informe técnico 2009**. Ceará, 2009.

TORDO, N, CHARLTON K, WANDELER A. I. Rhabdoviruses: Rabies. **Microbiology and microbial infections**, v.1, p.665-692. 1998.

WHITBY, JE. Rabies virus in decomposed brain of an Ethiopian wolf detected by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Wildlife**, v.33, n.4, 1997

ANEXO A**TERMO DE ANUÊNCIA/ FICHA DE COLETA ANIMAL**

Eu, _____
permito, quem eu animal, _____, participe da coleta de sangue, a ser realizada por estudantes da pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, com o intuito de verificar se meu cão está efetivamente protegido contra a Raiva. Eu permito a publicação do resultado do seu exame de titulação em qualquer trabalho científico.

A- Nome do proprietário:

B- Nome do Animal**Número correspondente**

C- Idade: _____**D- Sexo:**

() masculino () feminino

E- Raça:

() S.R.D () especifique: _____

F- Quantidade de doses da vacina antirábica:

() uma dose () duas doses () três doses

G- Cor da Pelagem:

H- Endereço e telefone

: _____

ANEXO B

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO RIIFT RESUMIDO

A metodologia que foi desenvolvida foi dividida em três etapas: Na 1ª etapa foi a realização das duas coletas dos cães. Foram coletados 3 mL de sangue através da veia cefálica de 100 animais, durante o dia da campanha animal de novembro, 2008. Os animais foram oram divididos em dois grupos: Grupo 1- animais com 0 dose, numerados do 1 ao 50 e Grupo 2- animais que receberam uma ou mais doses(animais vacinados anteriormente com a vacina Fuenzalida) , numerados do 100 ao 150. Sessenta dias após a primeira coleta, houve uma nova coleta dos mesmos animais após estes terem sido imunizados (Foi utilizado um imunobiológico novo em relação aos anos anteriores, vacina de cultivo celular), este tempo foi determinado para que o sistema imune dos animais vacinados tivesse tempo de responder à vacinação e desta forma apresentassem níveis de títulos de anticorpos detectáveis. As amostras foram levada ao LABOVIR-UECE e submetidas à centrifugação de 3000 rpm durante 10' para separar os soros que posteriormente forma armazenados a -20°C. Os animais somente foram submetidos à coleta após os proprietários assinarem o termo de anuência, permitindo que seu animal fosse submetido à coleta e assim participasse do experimento. Nesse documento também constam dados dos animais coletados, como: nome, sexo, raça, histórico vacinal e endereço. Na 2ª etapa- Foi realizado um teste rápido de soroneutralização por inibição de focos de fluorescência (RIFFT), (DAS, 1986) no CCZ de São Paulo para verificar se níveis de anticorpos dos animais coletados está igual ou acima de 0,5 U.I/mL, recomendado pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde. Uma comparação na titulação foi feita entre as duas coletas, verificando se houve progressão dos níveis de anticorpos presentes no soro após um mês da vacinação, se houve uma resposta vacinal eficaz ou não. Na 3ª etapa foi realizada Análise estatística dos dados. (média comparação entre grupos e desvio

padrão). Foi realizada no Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo. As amostras foram avaliadas pelo teste rápido de inibição de focos de fluorescência em cultivo celular para verificar se a titulação está igual ou acima de 0,5 U.I/mL, recomendado pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde. O princípio do teste rápido de inibição de focos fluorescente (RFFIT) para determinação de anticorpos neutralizantes antivírus da raiva é a neutralização *in vitro* de uma quantidade constante de vírus ('challenge virus standard' [PV] cepa adaptada à cultura de células) após inoculação deste em células susceptíveis ao vírus: BHK-21 C13 (Smith et al., 1973). O título do soro é a diluição na qual, 100% do vírus, encontram-se neutralizado. Tal título é expresso em UI/mL, após comparação, com o título de um soro padrão (WHO standard for rabies immunoglobulin [human]), diluído nas mesmas condições do teste. O método é realizado em placas de 96 poços, sendo a técnica uma adaptação realizada por Zalan et al. (1979) e Perrin et al. (1985). Os soros foram inativados a 56°C, em banho-maria, por 30 minutos. Na cabine de segurança biológica foram realizadas 8 diluições seriadas dos soros diretamente na placa de microtitulação, na razão 5, como descrito a seguir. Em todos os lotes de soros processados foi adicionado um soro padrão, um soro controle positivo e um negativo. Na coluna H1 à H12 foi colocado 80µL de meio Eagle enriquecido com 2,5% de soro fetal bovino estéril; no restante da placa (em todos os outros poços) foram colocados 50µL de meio. A primeira diluição foi realizada adicionando 20µL de cada soro teste (H1 à H12); com a pipeta multicanal foi feita a homogeneização (meio+soro), seguindo a transferência de 50µL para a segunda coluna e assim sucessivamente, descartando 50µL do último poço (diluição de 1:5 à 1:640). Deste modo: todos os orifícios ficam com um volume final de 50µL. Foi adicionado em todas as diluições 50µL de vírus desafio (cepa PV, previamente titulado), contendo de 32 a 100 FFD₅₀/0,05mL. A placa foi incubada por 60 minutos a 35°C em estufa com 5% de CO₂. Dez minutos antes do término da incubação foi iniciada a triplicinização (descolamento das células da parede da garrafa). Após o descolamento, as células foram ressuspensas com a adição de 10mL de meio eagle (2,5% de SFB), procedendo-se então a contagem em Câmara de Neubauer. Após a contagem das células foi realizada uma diluição destas, de modo que se obteve uma suspensão celular final de $3,7 \times 10^5$ células/mL. Foi adicionado 50µL da suspensão de células em todos os poços da placa, sendo estas encubadas novamente por 24 horas a 35°C em estufa com 5% de CO₂. Ao término do período de encubação, as placas foram

retiradas da estufa, o meio aspirado e descartado utilizando uma pipeta multicanal. A fixação das células nas placas foi realizada pela adição de 80µL de acetona gelada (80%), seguindo-se uma encubação de por 10 minutos em freezer -20°C. A acetona foi desprezada por inversão das placas, sendo estas colocadas para secar em estufa 37°C por 10 minutos. Após estarem secas, foi acrescentado, em cada poço, 40µL do conjugado (rabies conjugate Fujirebio) diluído segundo as instruções do fabricante, sendo as placas encubadas por uma hora em câmara úmida a 37°C. O conjugado foi desprezado por inversão da placas, sendo estas lavadas por imersão, duas vezes com solução salina tamponada e uma com água destilada. O excesso de água foi retirado colocando as placas invertidas sobre papel absorvente, seguido de secagem em estufa 37°C. Após as placas estarem totalmente secas, foi adicionada a toda a placa uma solução de glicerina tamponada (pH 8,0/8,5; 1 gota/poço). Após esses processos a leitura foi realizada em microscópio invertido de fluorescência, e os títulos calculados de acordo com o método de Spearman-Kärber, através da comparação com o soro padrão homólogo que contém 300 U.I./mL. São considerados protetores, títulos $\geq 0,5\text{UI/mL}$ (OMS, 1992). Uma comparação na titulação foi feita entre as duas coletas, verificando se houve progressão dos níveis de anticorpos presentes no soro após um mês da vacinação, se houve uma resposta vacinal eficaz ou não.

ANEXO C

Laudo da Sorologia canina

Anexo D- Gráficos da Análise Estatística

Tabela 1. Animais pertencentes ao grupo 01(nunca haviam sido vacinados contra a Raiva) segundo as coletas

Identificação	Exame	Coletas	
		1ª COLETA Nunca tinham sido vacinados	2ª COLETA Vacinados com a vacina de cultivo celular rabifa
		Resultado (UI/mL)	Resultado (UI/mL)
1	RIFFIT	< 0.16	--
2	RIFFIT	0.33	1.0
3	RIFFIT	0.25	0.66
4	RIFFIT	< 0.16	--
5	RIFFIT	< 0.16	1.0
6	RIFFIT	0.66	--
7	RIFFIT	< 0.16	1.3
8	RIFFIT	< 0.16	Hemólise
9	RIFFIT	0.16	> 1.3
10	RIFFIT	0.5	> 1.3
11	RIFFIT	< 0.16	--

12	RIFFIT	0.26	> 1.3
13	RIFFIT	< 0.16	1.0
14	RIFFIT	0.26	> 1.3
15	RIFFIT	< 0.16	1.0
16	RIFFIT	0.16	0.26
Identificação	Exame	Coletas	
		1ª COLETA Nunca tinham sido vacinados	2ª COLETA Vacinados com a vacina de cultivo celular rabifa
		Resultado (UI/mL)	Resultado (UI/mL)
17	RIFFIT	0.26	--
18	RIFFIT	< 0.16	0.33
19	RIFFIT	0.16	0.33
20	RIFFIT	< 0.16	0.26
21	RIFFIT	< 0.16	> 1.3
22	RIFFIT	Hemólise	1.0
23	RIFFIT	< 0.16	1.0
24	RIFFIT	0.16	0.66
25	RIFFIT	0.5	1.3
26	RIFFIT	0.16	1.0
27	RIFFIT	0.33	0.5
28	RIFFIT	0.26	1.0
29	RIFFIT	< 0.16	> 1.3
30	RIFFIT	Hemólise	> 1.3
31	RIFFIT	< 0.16	> 1.3
32	RIFFIT	< 0.16	--
33	RIFFIT	0.16	--
34	RIFFIT	0.26	--
35	RIFFIT	0.26	--
36	RIFFIT	< 0.16	--
37	RIFFIT	0.33	--
38	RIFFIT	< 0.16	--
39	RIFFIT	< 0.16	0.66
40	RIFFIT	< 0.16	
41	RIFFIT	0.33	1.3
42	RIFFIT	< 0.16	0.26
43	RIFFIT	< 0.16	0.66
44	RIFFIT	< 0.16	
45	RIFFIT	< 0.16	0.51
46	RIFFIT	0.33	> 1.6
47	RIFFIT	0.26	0.66
48	RIFFIT	< 0.16	--
49	RIFFIT	Hemólise	1.3
50	RIFFIT	Hemólise	>1.3

Fonte: Pesquisa direta

Nota: Titulação de anticorpos é igual/superior a 0,50 UI/mL

Tabela 2. Distribuição do resultado da 1ª coleta do 1º grupo (Não vacinados)

Resultado (UI/mL)	Frequência absoluta	Frequência relativa
Hemólise	4	8,00
< 0,16	24	48,00
0,16	6	12,00
0,25	1	2,00
0,26	7	14,00
0,33	5	10,00
0,5	2	4,00
0,66	1	2,00
Total	50	100,00

Fonte: Pesquisa Direta

Tabela 3. Distribuição do resultado da 2ª coleta do 1º grupo (Não vacinados)

Resultado (UI/mL)	Frequência absoluta	Frequência relativa
Hemólise	1	2,00
0,26	3	6,00
0,33	2	4,00
0,5	1	2,00
0,51	1	2,00
0,66	5	10,00
1	8	16,00
1,3	4	8,00
> 1.3	9	18,00
> 1.6	1	2,00
Animal não encontrado	15	30,00
Total	50	100,00

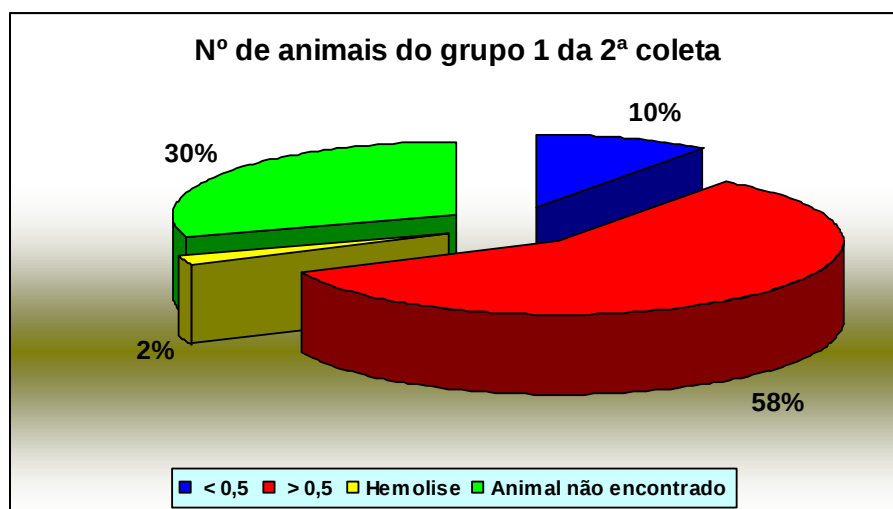
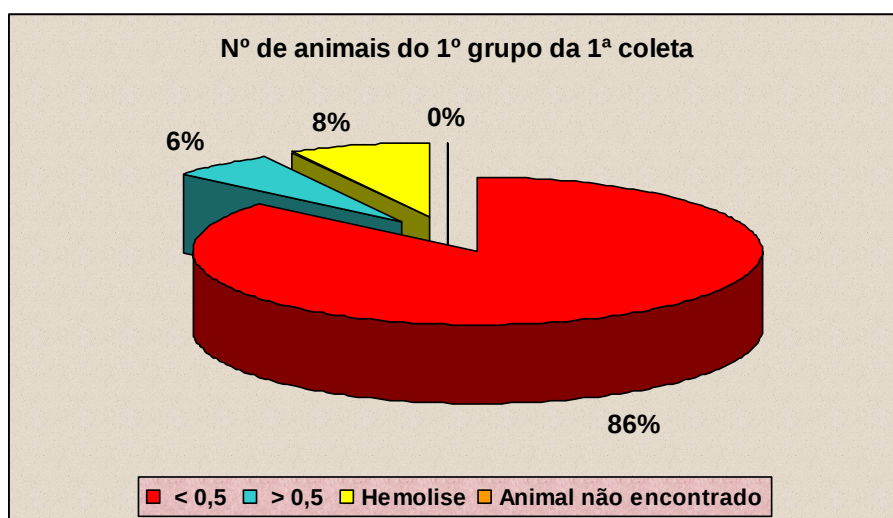
Fonte: Pesquisa Direta

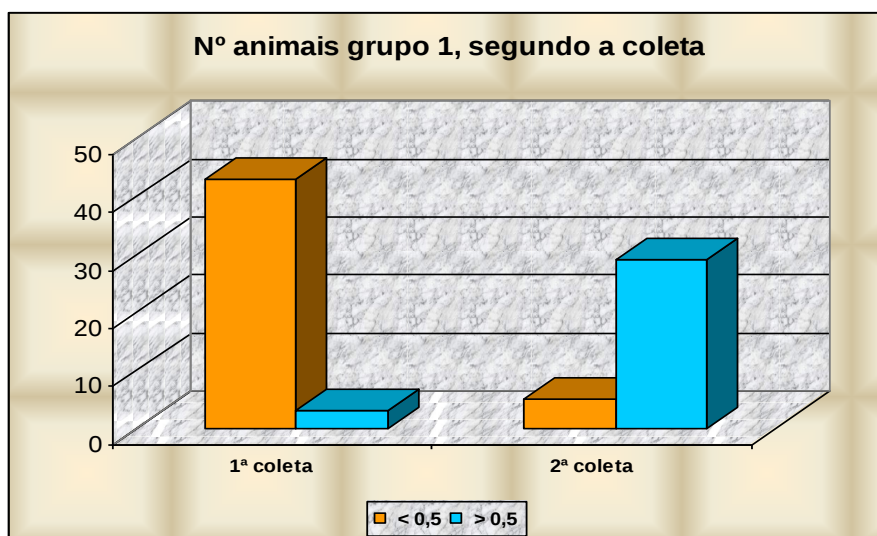
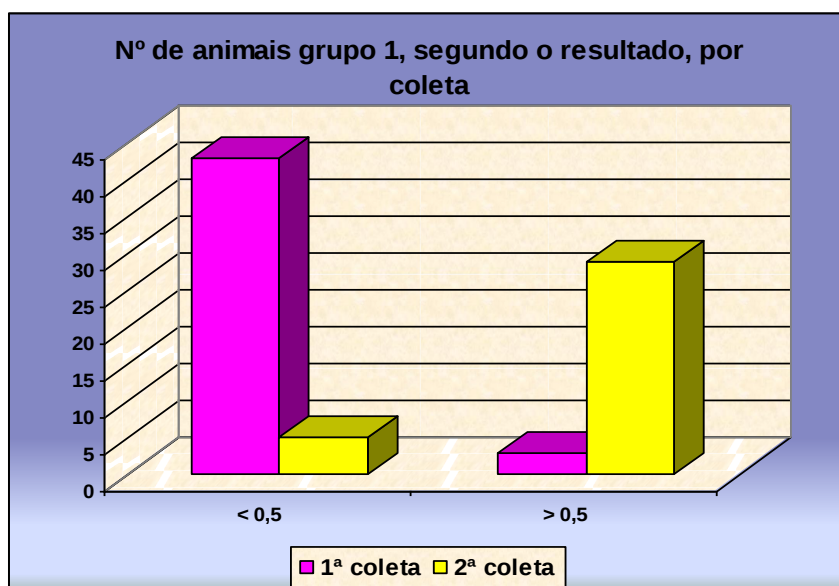
Tabela 4. Medidas estatísticas do 1º grupo, por coleta

Medidas estatísticas	Coletas	
	1ª coleta	2ª coleta
Moda	< 0,16	> 1,3
Mediana	< 0,16	> 1.6

Media	0,22	0,98
Variância	0,0125	0,6466
Desvio padrão	0,1118	0,8041

Fonte: Pesquisa Direta





TABELAS GRUPO 2

Tabela 6. Animais pertencentes ao grupo 02(haviam sido vacinados contra a Raiva), segundo as coletas

Identificação	Exame	Coletas	
		1ª COLETA Vacinados com a vacina Fuenzalida e Palácios	2ª COLETA – Vacinados com a vacina de cultivo celular Rabifa

		Resultado (UI/mL)	Resultado (UI/mL)
100	RIFFIT	--	0,66
101	RIFFIT	0.16	---
102	RIFFIT	0.26	> 1.3
103	RIFFIT	0.26	---
104	RIFFIT	0.33	---
105	RIFFIT	< 0.16	---
106	RIFFIT	0.50	---
107	RIFFIT	0.33	0.66
108	RIFFIT	< 0.16	0.16
109	RIFFIT	0.5	1.3
110	RIFFIT	0.25	0.50
111	RIFFIT	0.5	0.66
112	RIFFIT	0.5	> 1.3
113	RIFFIT	0.25	---
114	RIFFIT	< 0.16	---
115	RIFFIT	0.33	0.5
116	RIFFIT	0.25	1.3
117	RIFFIT	0.5	---
118	RIFFIT	0.16	---
119	RIFFIT	0.25	> 1.3
120	RIFFIT	< 0.16	1.0
121	RIFFIT	0.5	1.3
122	RIFFIT	0.25	> 1.3
123	RIFFIT	0.33	0.66
124	RIFFIT	0.25	> 1.3
125	RIFFIT	0.25	1.0
126	RIFFIT	0.25	0.5
127	RIFFIT	0.5	> 1.3
128	RIFFIT	< 0.16	< 0.16
129	RIFFIT	0.25	1.0
130	RIFFIT	< 0.16	0.5
131	RIFFIT	0.5	---
132	RIFFIT	< 0.16	---
Identificação	Exame	Coletas	
		1ª COLETA Vacinados com a vacina Fuenzalida e Palácios	2ª COLETA – Vacinados com a vacina de cultivo celular Rabifa
		Resultado (UI/mL)	Resultado (UI/mL)
133	RIFFIT	< 0.16	0.5
134	RIFFIT	< 0.16	Hemólise
135	RIFFIT	< 0.16	---

136	RIFFIT	0.5	—
137	RIFFIT	0.5	> 1.3
138	RIFFIT	< 0.16	0.26
139	RIFFIT	0.25	—
140	RIFFIT	0.5	—
141	RIFFIT	< 0.16	—
142	RIFFIT	0.25	—
143	RIFFIT	< 0.16	—
144	RIFFIT	0.5	—
Fonte: Pesquisa Direta			
Nota: Titulação de anticorpos é igual/superior a 0,50 UI/mL			

Tabela 7. Distribuição do resultado da 1ª coleta do 2º grupo (Vacinados)

Resultado (UI/mL)	Frequência absoluta	Frequência relativa
Hemólise	0	0,00
< 0.16	13	29,55
0,16	2	4,55
0,25	11	25,00
0,26	2	4,55
0,33	4	9,09
0,5	12	27,27
Total	44	100,00

Fonte: Pesquisa Direta

Tabela 8. Distribuição do resultado da 2ª coleta do 2º grupo (Vacinados)

Resultado (UI/mL)	Frequência absoluta	Frequência relativa
Hemólise	1	2,56
< 0.16	1	2,56
0,16	1	2,56
0,26	1	2,56
0,5	5	12,82
0,66	4	10,26
1	3	7,69
1,3	3	7,69

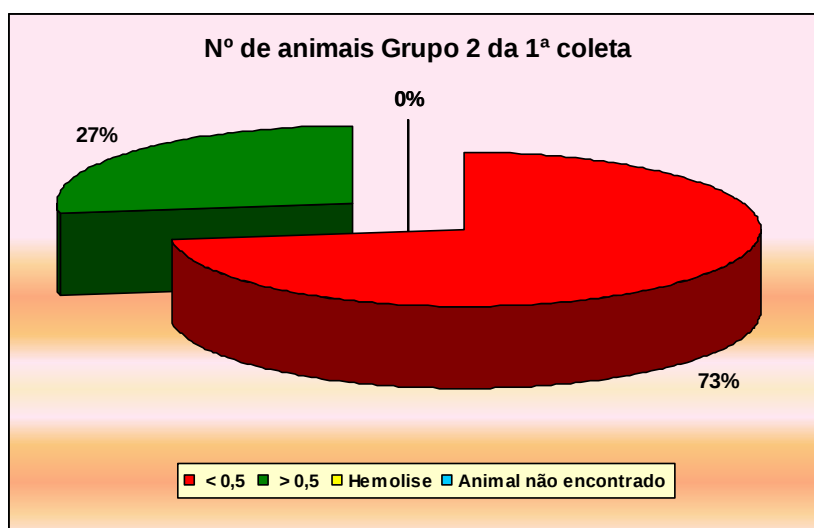
> 1.3	7	17,95
Animal não encontrado	13	33,33
Total	39	100,00

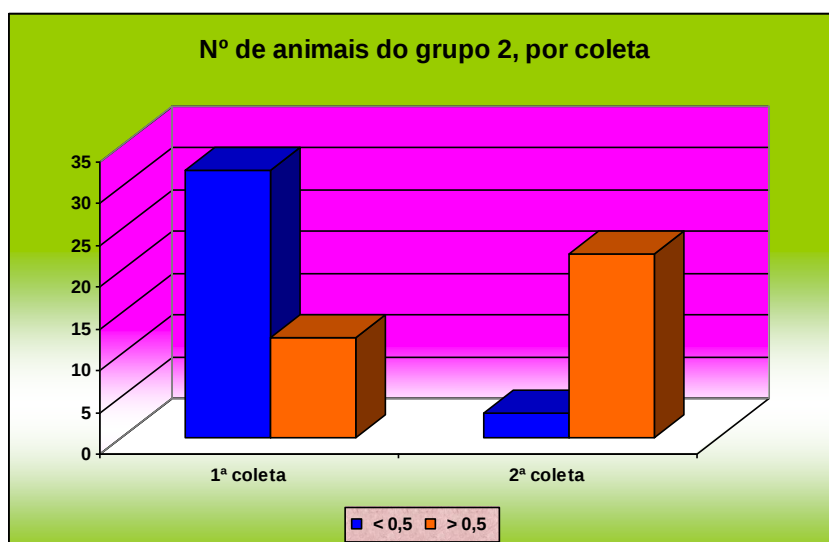
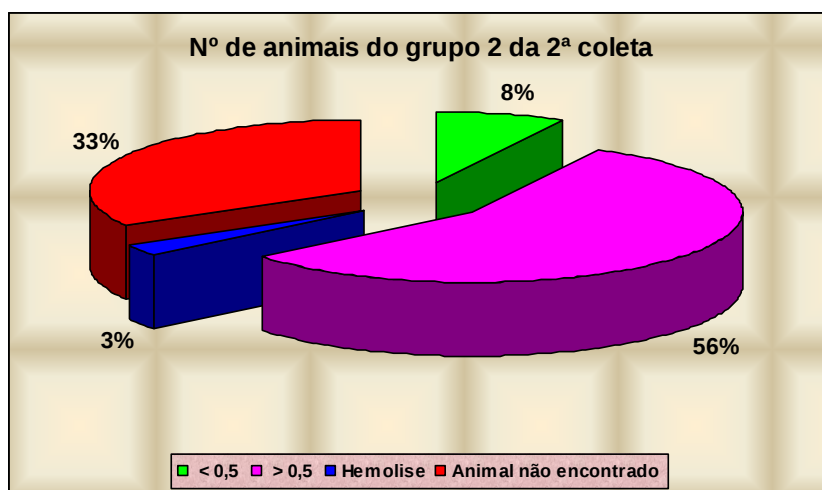
Fonte: Pesquisa Direta

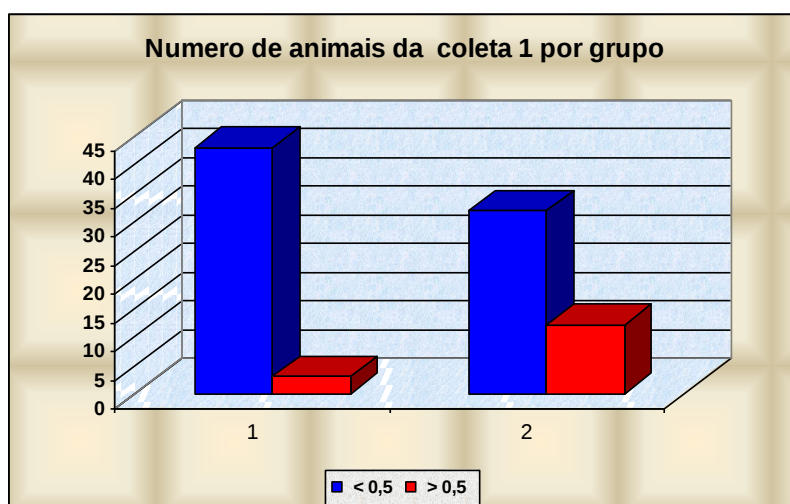
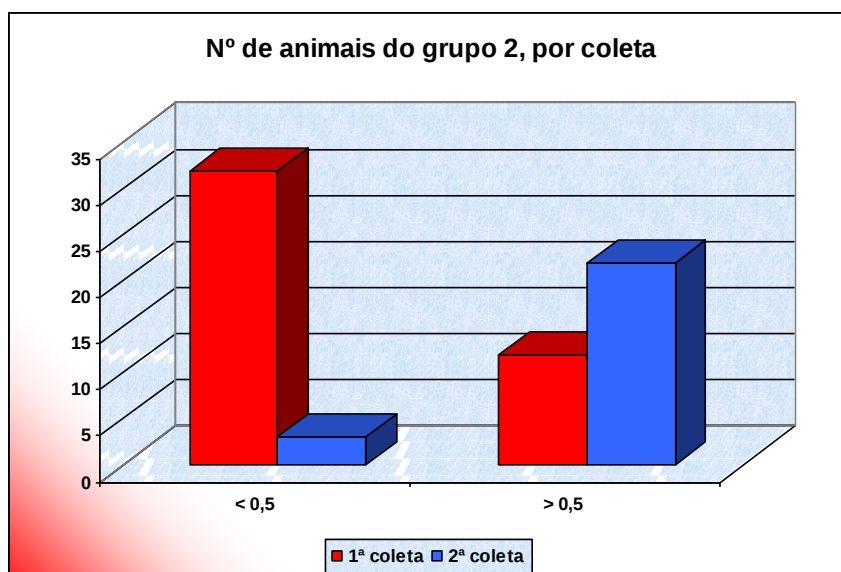
Tabela 9. Medidas estatísticas do 2º grupo, por coleta

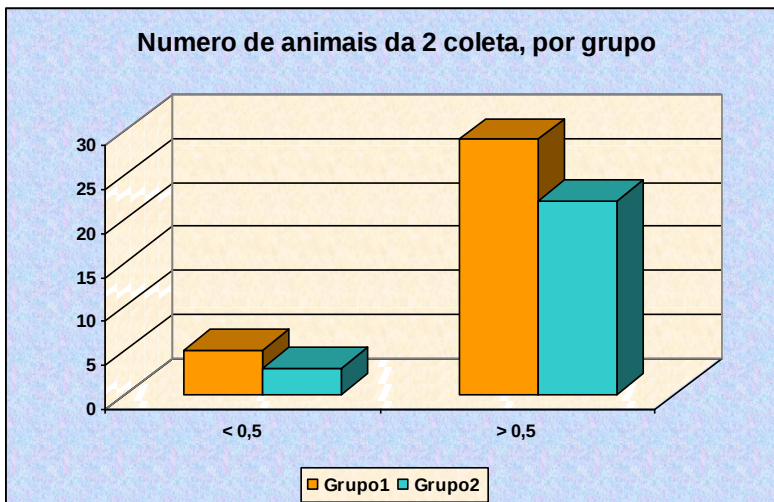
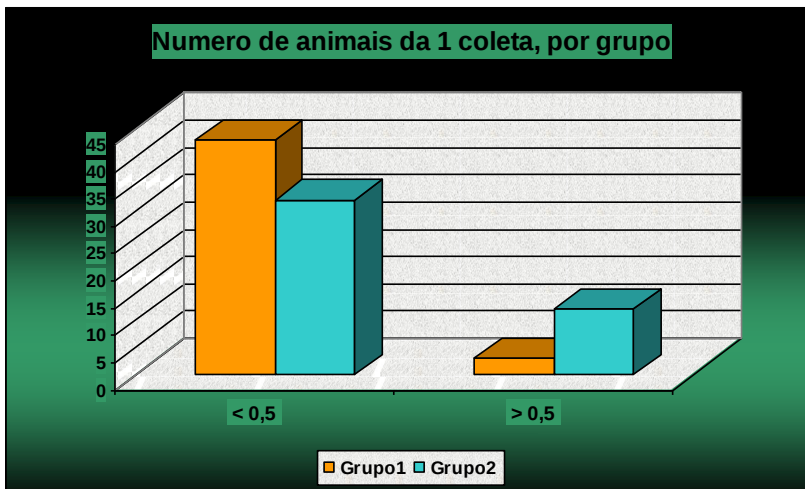
Medidas estatísticas	Coletas	
	1ª coleta	2ª coleta
Moda	< 0.16	> 1.3
Mediana	0,25	> 1.3
Media	0,30	0,8964
Variância	0,0482	0,9066
Desvio padrão	0,2195	4,5663

Fonte: Pesquisa Direta











Teste do Qui-Quadrado:

Tabela 05. Numero de Animais da Coleta 2, por Grupo

Resultado	Grupos		Total
	Grupo1	Grupo2	
	Freq. Observada	Freq. Observada	
< 0,5	5	3	8
> 0,5	29	22	51
Total	34	25	59

Fonte: Pesquisa direta

Tabela 06. Numero de Animais da Coleta 2, por Grupo

Resultado	Grupos		Total %
	Grupo1	Grupo2	
	Freq. Esperada	Freq. Esperada	
< 0,5	4,76	3,5	0,14
> 0,5	29,24	21,5	0,86
Total	34	25	1,00

Fonte: Pesquisa direta

Qui-quadrado calculado: 0,0971

Conclusão: Qui-Quadrado calculado < Qui-Quadrado tabelado aceita-se a hipótese H_0 , ou seja a titulação independe do tipo de grupo

Coefficiente de Correlação entre os resultados da titulação e o tipo de grupo

Coefficiente é de **0,057322**, ou seja a dependência entre as variáveis praticamente não existe, ou seja os resultados da titulação independem do tipo de grupo.