

Distribuição do vírus rábico no sistema nervoso central em ruminantes naturalmente infectados¹

Maria Luana C.R. Silva^{*2}, Franklin Riet-Correa², Glauco J.N. Galiza², Sérgio S. Azevedo², José A.B. Afonso³ e Albério A.B. Gomes²

ABSTRACT.- Silva M.L.C.R., Riet-Correa F., Galiza G.J.N., Azevedo S.S., Afonso J.A.B. & Gomes A.A.B. 2010. [Distribution of rabies virus in the central nervous system in naturally infected ruminants.] Distribuição do vírus rábico em herbívoros naturalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(11):940-944. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Cx. Postal 64, Patos, PB 58700-000, Brazil. E-mail: luacristiny@yahoo.com.br

With the aim to study the distribution of lesions the rabies virus in spontaneous cases of rabies in ruminants and to determine the efficiency of the direct fluorescent antibody test (DFA), mouse inoculation (MI) and presence of Negri bodies in the diagnosis of the disease, 48 cases of the rabies were examined. Samples of frontal, temporal, parietal and occipital cerebral cortex, hippocampus, thalamus, rostral and caudal colliculi, cerebellum, pons, medulla oblongata, basal nuclei and sections of the cervical, thoracic and lumbar spinal cord were examined. Of the 48 samples examined all were positive on DFA and MI, and in 30 (62.5%) Negri bodies were observed. However there were differences in the results of the three tests among different regions of the central nervous system. In the samples of the cerebral cortex in 38 cattle, the frequency of inclusion bodies was low (11-37%), and so was the positivity to DFA and MI (60-80%). In contrast, all samples of thalamus, pons and spinal cord were positive to DFA and MI. In other regions of the brain stem, positivity to these tests varied between 60% and 96.7%. On histologic examination, the major frequency of Negri bodies (88.2%) was observed in the cerebellum. In eight sheep the DFA and MI tests were positive in all sections of the CNS examined and Negri bodies were found in three sheep. Only two goats were examined; both were positive in DFA and MI tests and in one Negri bodies were found. These results suggest that the recommendations of the Brazilian Technical Manual for Rabies of Herbivores is adequate for rabies diagnosis, because their recommendations include the histologic study and the examination of cerebellum, and sections of the brainstem with high positivity to DFA and MI tests. However, a better recommendation is to send for DFA and MI half of the brain cut longitudinally and samples of the spinal cord, which will permit to examine one or two sections, and if those are negative to get back to the material and examine the rest of the sections. In contrast, to collect samples of the brain or half brain can be inappropriate for the diagnosis of other diseases of the CNS, for which the study of the whole fixed brain is necessary to recognize the symmetry or distribution of lesions. In these situations by the results obtained here, it can be recommended to send different sections of the spinal cord for DIF and MI tests and to fix the whole brain for gross and histologic examinations.

INDEX TERMS: Rabies, fluorescent antibody test, mouse inoculation, Negri bodies, laboratory diagnosis.

¹ Recebido em 9 de abril de 2010.

Aceito para publicação em 28 de julho de 2010.

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, Av. Santa Cecília,

Cx. Postal 64, Patos, PB 58700-00, Brasil. *Autora para correspondência luacristiny@yahoo.com.br

³ Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Bom Pastor s/n, Cx. Postal 152, Bairro Mundaú, Garanhuns, PE 55292-901, Brasil.

RESUMO.- Com o objetivo de identificar a distribuição das lesões do vírus rábico no sistema nervoso central de casos espontâneos de raiva em ruminantes e comparar as técnicas de imunofluorescência direta (IFD), inoculação em camundongos (ICC) e presença de corpúsculos de Negri para o diagnóstico da doença foram analisados materiais provenientes de 48 casos de raiva, incluindo amostras de córtex frontal, temporal, parietal e occipital, hipocampo, tálamo, colículo rostral e caudal, cerebelo, ponte, medula oblonga, núcleo da base e porções da medula cervical, torácica e lombar. De 48 amostras analisadas, todas foram positivas na IFD e na ICC e em 30 (62,5%) foram encontrados corpúsculos de Negri (CN). No entanto, houve diferenças importantes nos resultados dos três testes nas diferentes regiões do SNC avaliadas. Nos cortes de córtex cerebral, em 38 bovinos, a presença de corpúsculos de inclusão foi baixa (11%-37%) assim como a positividade para IFD e ICC (60-80%). Pelo contrário, todas as amostras de ponte, tálamo e medula testadas foram positivas para IFD e ICC. Em outras regiões do tronco encefálico e também no cerebelo a positividade para ICC e IFD foi de 60% a 96,7%. No cerebelo foi encontrada a maior frequência (88,2%) de corpúsculos de inclusão. Em oito ovinos as provas de ICC e IFD foram positivas em todos os cortes e foram observados corpúsculos de inclusão em três animais. Foram analisados somente dois casos de caprinos encontrando-se corpúsculos de inclusão em um e ambos foram positivos para IFD e ICC. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a conduta recomendada pelo Manual Técnico de Controle da Raiva dos Herbívoros (MTCRH) permite o diagnóstico de raiva associando o estudo histológico aos testes de IFD e ICC que incluem cerebelo, tálamo e tronco encefálico que apresentam alta positividade para as provas de IFD e ICC. No entanto, a melhor conduta é a de incluir metade do encéfalo cortado longitudinalmente e amostras de medula. Isto permite examinar por IFD e ICC uma ou mais regiões onde essas provas apresentam maior positividade e, posteriormente, se essas provas fossem negativas, retornar ao material original e examinar outras regiões. Por outro lado, a coleta de amostras dos locais recomendados pela MTCRH, assim com a coleta de metade do encéfalo, podem prejudicar o diagnóstico de outras doenças para o qual é necessário o estudo de todo o encéfalo após a fixação em formaldeído, para constatar a simetria e a distribuição das lesões. Nestes casos, com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode ser recomendado para diagnóstico laboratorial de raiva o envio exclusivo de porções da medula cervical, dorsal e lombar, já que as três porções apresentaram 100% de positividade nas provas de IFD e ICC. Além disso, o estudo histológico de todas as porções do cérebro incluídas neste trabalho permitirá complementar o diagnóstico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Raiva, teste de imunofluorescência, inoculação em camundongos, corpúsculos de Negri, diagnóstico laboratorial.

INTRODUÇÃO

Surtos de raiva bovina são descritos no Brasil desde 1911 (Carini 1911) e a partir de 1966 implantou-se o Plano de

Combate à Raiva dos Herbívoros, atualmente denominado Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias (PNCRH), que tem como objetivo diminuir a prevalência da doença nos herbívoros domésticos (Brasil 2009).

Mesmo com a implantação do Programa, a raiva ainda ocorre de maneira endêmica na região do semiárido Brasileiro em diferentes espécies de animais domésticos (Gomes 2004, Lima et al. 2005). Ocorrendo também em outros estados do país (Lemos 2005, Rech 2007). São frequentes os relatos de amostras de eqüinos e bovinos negativas para raiva na imunofluorescência direta (IFD) e positivas na inoculação intracerebral em camundongos (ICC) (Carvalho 2001, Carrieri et al. 2006). Vários são os relatos de raiva animal no Brasil, no entanto são poucos os que descrevem a porção do sistema nervoso central (SNC) que proporciona melhor o diagnóstico. Peixoto et al. (2000) encontraram pouca concordância dos resultados entre as provas de IFD, ICC e exame histopatológico em casos de raiva dos herbívoros. Rech et al. (2006a) e Lima et al. (2005) descreveram os locais das lesões histopatológicas de raiva no SNC de herbívoros e Bingham & Van Der Merwe (2002) indicaram a presença de corpúsculos fluorescentes em vários segmentos do SNC de várias espécies. Diante do exposto, este trabalho objetivou identificar a distribuição das lesões no SNC em casos de infecção natural da raiva em ruminantes e comparar as técnicas IFD, ICC e exame histopatológico no diagnóstico laboratorial da doença. Com essa informação será possível determinar as amostras a serem enviadas ao laboratório para exame histológico, IFD e ICC, evitando os resultados falsos negativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 48 amostras de ruminantes com diagnóstico positivo para raiva em pelo menos um dos testes padrão, procedentes da região do semiárido nordestino, necropsiados pelo setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (CSTR/UFPG), no período de janeiro de 2004 a julho de 2009 (26 bovinos, dois caprinos e oito ovinos), e pela Clínica de Bovinos de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no período de abril de 2008 a julho de 2009 (12 bovinos).

Essas amostras foram analisadas mediante as técnicas de IFD, ICC e exame histopatológico, padronizando os cortes para serem analisados em córtex frontal, temporal, parietal e occipital, hipocampo, tálamo, colículo rostral e caudal, cerebelo, ponte, medula oblonga, núcleos da base e porções da medula cervical, torácica e lombar dos animais.

Na prova da IFD, com os cortes já descritos anteriormente, as lâminas com inclusões intracitoplasmáticas fluorescentes e/ou poeira antigênica foram registradas como sendo positivas, de conformidade com o método descrito por Goldwasser & Kissling (1958), com modificação descrita por Dean et al. (1996).

A ICC foi realizada com 0,03mL de inóculo da suspensão a 10% (p/v) em camundongos albinos, com idade de 21 dias, criados no Biotério do CSTR/UFPG. Para cada amostra foram

utilizados grupos constituídos de seis indivíduos. Após a infecção foram mantidos no infectório do Laboratório de Virologia do CSTR/UFCG. Os animais inoculados foram observados por um período de 30 dias com observações diárias, e leitura a cada 24 horas. Mortes ocorridas antes do quinto dia pós-inoculação não foram consideradas como sendo de raiva, conforme a metodologia descrita por Koprowski (1996). Para a confirmação da presença do vírus rábico nos camundongos que morreram no período de observação, os cérebros foram submetidos à técnica de IFD. Os camundongos que não adoeceram no período de observação foram eutanasiados com éter etílico e incinerados, conforme regras estabelecidas pela Comissão de Bioética do CSTR/UFCG (Protocolo de Aprovação na Bioética 129/2009).

Para o exame histopatológico o encéfalo e a medula foram fixados em formol tamponado a 10% e cortados transversalmente em fatias de 3 a 5mm de espessura. Amostras das regiões mencionadas anteriormente foram embebidas em parafina, cortadas em secções de 4-5 µm e coradas com hematoxilina-eosina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 48 amostras analisadas, todas foram positivas na IFD e ICC e em 30 foram encontrados corpúsculos de Negri (CN) no exame histopatológico. No entanto, houve diferenças importantes nos resultados dos três testes nas diferentes regiões do SNC avaliadas (Quadro 1). Em bovinos somente 11% a 37% dos cortes das diferentes regiões do córtex resultaram positivas para corpúsculos de inclusão, sendo também baixa a frequência de encefalite ou meningite. Também nas técnicas de IFD e ICC a positividade foi baixa no córtex, variando de 60% a 80%. Nos cortes de tronco encefálico e medula houve também uma baixa frequência de CN, sendo maior o número de testes positivos tanto para IFD e ICC nas diferentes regiões do tronco encefálico. Com isso observa-se que todas as amostras de ponte, tálamo e medula testados foram positivas para IFD e ICC. Quando são analisados os resultados dos três testes nos cortes de cerebelo observa-se que nesse órgão foi encontrada a maior frequência de CN, mesmo em casos sem outras lesões histológicas, e que as provas de IFD e ICC foram positivas em todos os casos analisados. Isto sugere que o tálamo, a ponte, o cerebelo e a medula são de eleição para realização de IFD e ICC e que o cerebelo é o local mais indicado para a procura de CN.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a conduta recomendada pelo Manual Técnico de Controle da Raiva dos Herbívoros (MTCRH) (Brasil 2005) permite o diagnóstico de raiva associando o estudo histológico aos testes de IFD e ICC, já que incluem o cerebelo, tálamo e o tronco encefálico, que apresentam alta positividade para as provas de IFD e ICC. Outra possibilidade de envio ao laboratório de virologia seria metade do encéfalo cortado longitudinalmente e amostras de medula. Isto permitiria examinar por IFD e ICC uma ou mais regiões onde essas provas apresentam maior positividade e, posteriormente, se essas provas fossem negativas, retornar ao material original e examinar outras regiões. Por outro lado, a coleta

de amostras dos locais recomendados pela MTCRH, assim com a coleta de metade do encéfalo pode prejudicar o diagnóstico de outras doenças, para o qual é necessário o estudo de todo o encéfalo após a fixação em formaldeído, para constatar a simetria e a distribuição das lesões. Nestes casos, com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode ser recomendado para diagnóstico laboratorial de raiva o envio exclusivo de porções da medula cervical, dorsal e lombar, já que as três porções apresentaram 100% de positividade nas provas de IFD e ICC. Além disso, o estudo histológico de todas as porções do sistema nervoso central permitirá complementar o diagnóstico através da observação de corpúsculos de inclusão, que neste trabalho foram observados em 68% (26/38) dos casos em bovinos. Essa frequência de observação foi menor do que encontrada por Lima et al. (2005), em 87% dos casos (20/23), e por Rech (2007) em 83,3% (20/24), é a mesma frequência encontrada por Langohr et al. (2003), em 68% (17/25) dos casos, e maior do que a encontrada por Lemos (2005), em 48% (13/27) dos casos nas células de Purkinje. Macruz et al. (1977) não encontraram corpúsculo de inclusão no hipocampo, cerebelo, bulbo e medula de 20 bovinos infectados experimentalmente e os mesmos materiais foram diagnosticados como raiva pela IFD e ICC.

Os relatos de raiva em pequenos ruminantes são menos frequentes. Nos casos examinados nesse trabalho, todos os fragmentos avaliados em materiais de ovinos foram positivos na IFD e na ICC, sem exceção, ressaltando que a maioria apresentou poeira antigênica na IFD. No entanto, corpúsculos de inclusão foram observados somente em 37,5% (3/8) dos ovinos (Quadro 1). Guedes et al. (2007) observaram a presença de CN em um caprino e um ovino examinados (100%), Lima et al. (2007) em dois caprinos (100%) e em três de quatro ovinos (75%) e Rissi et al. (2008) encontraram CN nos dois ovinos examinados (100%). Em relação aos caprinos, as amostras dos dois animais examinados apresentaram corpúsculos de inclusão e as únicas regiões examinadas pela IFD e ICC foram positivas. Enquanto não seja avaliado um número maior de materiais provenientes de caprinos e ovinos com raiva, as amostras a serem enviadas para o diagnóstico da doença nestas espécies podem ser semelhantes às recomendadas para bovinos.

No presente estudo 10 amostras, seis de bovinos e quatro de ovinos, encontravam-se em estado de decomposição, na IFD alguns cortes resultaram positivos, enquanto que outros cortes apresentaram fluorescência não específica, como relatado por Trimarchi & Debbie (1991). Essas amostras apresentaram um período de incubação maior nos camundongos, variando de 15 a 17 dias, enquanto que nas amostras não autolizadas o período de incubação foi de 7-13 dias. No entanto, o período clínico, tanto nas amostras autolizadas quanto nas não autolizadas, foi semelhante, de 3 a 5 dias. Carvalho (2001) encontrou sensibilidade da IFD de 73% em materiais em decomposição, valor menor da sensibilidade encontrada por Keane & Little (1987) em materiais em bom estado, que foi de 99,8%.

Quadro 1: Resultados dos testes de imunofluorescência direta (IFD), inoculação intracerebral em camundongos (ICC) e estudo histopatológico, em 38 amostras de bovinos e oito de ovinos, com diagnóstico positivo para raiva, em diferentes regiões do sistema nervoso central, provenientes da região semiárida do nordeste brasileiro, nos anos de 2004-2009

| Fragmento | Exame histopatológico | | | | Total | IFD | ICC |
|----------------|---|--|------------------------------|--------------------------------|-------|------------------------|------------------------|
| | Corpúsculo de inclusão (N° de positivos) | Manguito perivascular (N° de positivos) | Glicose (N° de positivos) | Meningite (N° de positivos) | | N° de positivos /Total | N° de positivos /Total |
| Bovinos | | | | | | | |
| CF | 9(37,5%) | 12(50%) | 2(8,33%) | 6(25,0%) | 24 | 21(30) | 25(32) |
| CP | 3(15,78%) | 2(10,52%) | 00 | 2(10,52%) | 19 | 7(11) | 8(12) |
| CT | 4(20,0%) | 4(20,0%) | 1(5,0%) | 1(5,0%) | 20 | 7(10) | 8(10) |
| CO | 2(11,76%) | 2(11,76%) | 00 | 1(5,88%) | 17 | 6(10) | 7(10) |
| NB | 5(27,77%) | 11(61,11%) | 2(11,11%) | 00 | 18 | 9(10) | 9(10) |
| HP | 1(5,55%) | 1(5,55%) | 00 | 00 | 18 | 6(10) | 7(10) |
| TA | 10(41,66%) | 21(87,5%) | 2(8,33%) | 1(4,16%) | 24 | 30(31) | 34(34) |
| CR | 5(31,25%) | 9(56,25%) | 2(12,5%) | 1(6,25%) | 16 | 9(10) | 9(10) |
| CC | 5(35,71%) | 5(35,71%) | 1(7,14%) | 1(7,14%) | 14 | 9(10) | 9(10) |
| PT | 8(26,66%) | 14(46,66%) | 2(6,66%) | 00 | 30 | 32(32) | 36(36) |
| MO | 4(25,0%) | 11(68,75%) | 3(18,75%) | 00 | 16 | 9(10) | 9(10) |
| CE | 30(88,21%) | 20(58,82%) | 2(5,88%) | 13 38,23% | 34 | 32(32) | 35(35) |
| MC | 10(58,82%) | 10(58,82%) | 3(17,64%) | 1(5,88%) | 17 | 4(4) | 6(6) |
| MT | 7(41,17%) | 7(41,17%) | 3(17,64%) | 00 | 17 | 4(4) | 6(6) |
| ML | 7(41,17%) | 10(58,82%) | 3(17,64%) | 1(5,88%) | 17 | 4(4) | 6(6) |
| Ovinos | | | | | | | |
| CF | 2(28,57%) | 4(57,14%) | 0 | 4(57,14%) | 7 | 5(5) | 5(5) |
| CP | 0 | 0 | 0 | 3(60,0%) | 5 | 4(4) | 4(4) |
| CT | 0 | 0 | 0 | 2(33,33%) | 6 | 4(4) | 4(4) |
| CO | 0 | 0 | 0 | 3(42,85%) | 7 | 4(4) | 4(4) |
| NB | 1(14,28%) | 1(14,28%) | 1(14,28%) | 2(28,57%) | 7 | 4(4) | 4(4) |
| HP | 0 | 2(33,33%) | 0 | 0 | 6 | 4(4) | 4(4) |
| TA | 0 | 2(28,57%) | 0 | 1(14,28%) | 7 | 7(7) | 7(7) |
| CR | 1(16,66%) | 2(33,33%) | 0 | 1(16,66%) | 6 | 4(4) | 4(4) |
| CC | 0 | 2(33,33%) | 1(16,66%) | 1(16,66%) | 6 | 4(4) | 4(4) |
| PT | 0 | 2(40,0%) | 1(20,0%) | 0 | 5 | 6(6) | 6(6) |
| MO | 0 | 3(60,0%) | 1(20,0%) | 0 | 5 | 4(4) | 4(4) |
| CE | 2(25,0%) | 2(25,0%) | 0 | 4(50,0%) | 8 | 8(8) | 8(8) |
| MC | 1(14,28%) | 3(42,85%) | 0 | 1(14,28%) | 7 | 2(2) | 2(2) |
| MT | 0 | 3(50,0%) | 0 | 1(16,66%) | 6 | 2(2) | 2(2) |
| ML | 0 | 1(16,66%) | 0 | 0 | 6 | 2(2) | 2(2) |

^a CF = córtex frontal, CP = córtex parietal, CT = córtex temporal, CO = córtex occipital, NB = núcleos da base, TL = tálamo, HP = hipocampo, TA = tálamo, CR = cóliculo rostral, CC = cóliculo caudal, PT=ponte, MO = medula oblongata, CE = cerebelo, MC = medula cervical, MT = medula torácica, ML= medula lombar; ^b P/T = número de positivos / número total; ^c IFD = Imunofluorescência Direta; ^d ICC = Inoculação Intracerebral em camundongos; ^e EH = Exame histopatológico; ^f CN = Corpúsculos de Negri; ^g MG = Manguito; ^h GL = gliose.

Nesse trabalho a sensibilidade de 100% para as duas provas deve-se provavelmente ao grande número de amostras examinadas por cada animal.

Pela rapidez com que são obtidos os resultados, a realização correta da prova de IFD em materiais enviados corretamente é muito importante para o diagnóstico de raiva. Os diagnósticos falsos positivos na IFD podem ser decorrentes da qualidade na confecção da lâmina, conjugado e experiência do leitor das lâminas, em alguns casos que apresentam baixos títulos virais podendo apresentar apenas poeira antigênica discreta que pode passar despercebida.

Os resultados deste trabalho mostram que as falhas de diagnóstico de raiva utilizando corretamente os exames histopatológico, IFD, ICC em materiais corretamente

enviados, se ocorre, é um evento raro. Além disso, mesmo não tendo sido observados CN e sendo negativas as provas de IFD e ICC podemos utilizar a prova de imunohistoquímica nos blocos utilizados para exame histológico. Ressalta também a importância de realizar uma necropsia adequada, retirando todo o encéfalo, pelo menos partes representativas da medula e o núcleo do trigêmeo para exame histológico, como recomendado por Rech et al. (2006b), Rissi et al. (2008) e Pedroso et al. (2008).

REFERÊNCIAS

- Bingham J. & Van Der Merwe M. 2002. Distribution of rabies antigen in infected brain material: Determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Meth.* 101:85-94.
- Brasil 2005. Controle da Raiva dos herbívoros. Departamento de Saú-

- de Animal, Secretária de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 104p.
- Brasil 2009. Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil. Departamento de Saúde Animal, Secretária de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 440p.
- Carini A. 1911. Sur une grande épizootie de rage. *Ann. Inst. Pasteur* 25:843-846.
- Carrieri M.L., Peixoto Z.M.P., Paciencia M.L.B., Kotait I. & Germano P.M.L. 2006. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. *J. Virol. Meth.* 138:1-9.
- Carvalho A.A.B. 2001. Sistema alternativo para o diagnóstico da raiva utilizando células de neuroblastoma murino: testes com amostras de campo isoladas no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 105 p.
- Dean D.J., Abelseth M.K. & Atanasiu P. 1996. The fluorescent antibody test, p.88-95. In: Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Eds), *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed. World Health Organization, Geneva. 476p.
- Goldwasser R.A. & Kissling R.E. 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98:219-223.
- Gomes A.A.B. 2004. Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 107p.
- Guedes K.M.R., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Simões S.V.D., Neto E.G.M., Nobre V.M.T. & Medeiros R.M.T. 2007. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesq. Vet. Bras.* 27(1):29-38.
- Keane D.P. & Little P.B. 1987. Equine viral encephalomyelitis in Canada: A review of known and potential causes. *Can. Vet. J.* 28(8):497-504.
- Koprowski H.T. 1996. The mouse inoculation. p.80-87. In: Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Eds), *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed. World Health Organization, Geneva. 476p.
- Langohr I.M., Irigoyen L.F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2003. Aspectos epidemiológicos e clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural* 33(1):125-131.
- Lemos R.A.A. 2005. Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 155p.
- Lima E.F., Riet-Correa F., Castro R.S., Gomes A.A.B. & Lima F.S. 2005. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 25(4):250-264.
- Macruz R., Nilsson M.R. & Côrtes J.A. 1977. Raiva experimental em bovinos: histopatologia do sistema nervoso central. *Revta Fac. Med. Vet. Zootec.*, São Paulo, 14(1):123-127.
- Pedroso P.M.O., Pescador C.A., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Borba M.R., Wouters F., Bezerra Jr P.S. & Driemeier D. 2008. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. *Pesq. Vet. Bras.* 28(12):627-632.
- Peixoto Z.M.P., Cunha E.M.S., Souza M.C.A.M., Silva L.H.Q., Carrieri M.L., Lazarini S.R.F., Amatuzzi E.A., Germano P.M.L. & Kotait I. 2000. Diagnóstico laboratorial da raiva dos herbívoros: aspectos peculiares. Seminário Internacional de Raiva, São Paulo, SP. 51p.
- Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 228p.
- Rech R.R., Rissi D.R., Pierezan F., Inkelmann M.A. & Barros C.S.L. 2006a. Raiva em herbívoros: 27 casos. *Anais Encontro Nacional de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário (Endivet)*, Campo Grande, MS, p.43-44.
- Rech R.R., Rissi D.R., Silva M.C., Inkelmann M.A. & Barros C.S.L. 2006b. Histomorfologia do gânglio de Gasser, da *rete mirabile* carotídea e da hipófise de bovinos: estudo de 199 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 26(2):105-111.
- Rissi D.R., Pierezan F., Kommers G.D & Barros C.S.L. 2008. Ocorrência de raiva em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10):495-500.
- Trimarchi C.V. & Debbie J.G. 1991. The fluorescent antibody in rabies, p.220-229. In: Baer G.M.(Ed.), *The Natural History of Rabies*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.