

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Karina Gonzalez Fernandes

**ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O VÍRUS DA RAIVA EM
CÃES COM E SEM HISTÓRICO DE VACINAÇÃO EM SANTA MARIA
- RS, BRASIL**

Santa Maria, RS

2016

Karina Gonzalez Fernandes

**ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O VÍRUS DA RAIVA EM CÃES
COM E SEM HISTÓRICO DE VACINAÇÃO EM SANTA MARIA - RS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, RS
2016

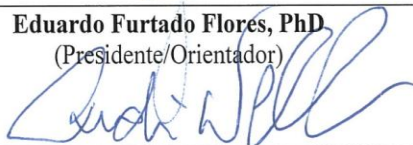
Karina Gonzalez Fernandes

**ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O VÍRUS DA RAIVA EM CÃES
COM E SEM HISTÓRICO DE VACINAÇÃO EM SANTA MARIA - RS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.



Eduardo Furtado Flores, PhD
(Presidente/Orientador)



Rudi Weiblen, PhD. (UFSM)



Mário Celso Sperotto Brum, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Luiz Eduardo e Carmen pela dedicação e empenho em me ajudar para que concretizasse mais este objetivo e em todos os momentos em que eles se fazem presentes na minha vida.

Aos meus filhos que com tão pouca idade se mostraram compreensíveis e amáveis torcendo incansavelmente para que este objetivo fosse atingido.

À minha irmã Elen pela força e por acreditar sempre no meu sucesso.

À minha madrinha Deziré que sempre me ajudou nos momentos em que mais precisei.

À minha amiga Débora que incentivou minha entrada no mestrado.

À minha amiga Ariéli que me incentiva sempre a melhorar.

Aos demais familiares que sempre possuem uma palavra de auxílio e apoio, nos momentos difíceis.

Aos amigos que fiz no SV e que se mostraram sempre dispostos a ajudar com boa vontade e dedicação.

Especialmente ao colega Mathias, que foi incansável e sempre esteve presente durante toda a execução deste trabalho, agindo com toda ética e caráter de uma pessoa exemplar.

Aos professores Eduardo e Rudi, pela oportunidade e pela paciência em explicar incansavelmente tudo que sempre foi solicitado.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realizar um mestrado de excelência.

E à todos que de alguma forma colaboraram para a concretização deste objetivo.

RESUMO

ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O VÍRUS DA RAIVA EM CÃES COM E SEM HISTÓRICO DE VACINAÇÃO EM SANTA MARIA – RS - BRASIL

AUTORA: Karina Gonzalez Fernandes

ORIENTADOR: Eduardo Furtado Flores

O vírus rábico (RabV) pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, e é o agente da raiva, uma doença zoonótica grave que cursa com sinais neurológicos e que, inevitavelmente leva à morte. A raiva urbana, que é mantida em ciclos envolvendo cães e gatos, está sob controle ou virtualmente erradicada na maioria dos Estados do Brasil. No entanto, a vacinação maciça das populações caninas e felinas das cidades segue sendo realizada para manter os níveis de imunidade dessas populações. Considerando-se surtos de raiva herbívora no Estado do Rio Grande do Sul, envolvendo principalmente bovinos, e o risco potencial de introdução do vírus em populações urbanas de cães, torna-se relevante avaliar os níveis de proteção e a cobertura vacinal conferidos pelas vacinações realizadas nessa população. Assim, o presente estudo teve como objetivos: 1. Avaliar os níveis de anticorpos anti-RabV em cães com histórico de vacinação antirrábica e 2. Investigar a frequência e níveis de anticorpos anti-RabV em uma amostra de cães sem histórico conhecido de vacinação de Santa Maria, RS. No primeiro estudo, utilizaram-se 440 amostras séricas de cães coletadas durante a campanha de vacinação antirrábica de 2015 na cidade Santa Maria. Somente foram coletadas amostras de cães com histórico confirmado de, pelo menos, uma vacinação antirrábica nos dois anos anteriores. O segundo estudo incluiu 300 amostras de cães levados para atendimento clínico e/ou cirúrgico no Hospital Universitário Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU/UFSM) no ano de 2015. O histórico de vacinação antirrábica neste grupo não foi investigado, constituindo-se, portanto, em uma amostra de conveniência de cães sem histórico conhecido de vacinação contra a raiva. As amostras de soro foram submetidas ao teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RIFFT) que detecta anticorpos neutralizantes contra o RabV. Dentre as amostras coletadas na campanha de vacinação, 70,4% (330/440) apresentaram título neutralizante igual ou superior a 0,5 UI/ml, considerado protetivo pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No entanto, aproximadamente 30% dos animais não apresentavam títulos adequados. Dentre as amostras com títulos inferiores a 0,5 UI/ml, 57,4% (74 amostras) eram provenientes de cães com histórico de mais de uma vacinação. Dentre as amostras coletadas de cães sem histórico conhecido de vacinação, 42,3% (127/300) apresentaram título igual ou superior a 0,5 UI/ml e 57,7% (173/300) não possuíam anticorpos em títulos considerados adequados para proteção. Considerando-se que tratava-se de uma amostra de conveniência, e não necessariamente representativa da população canina da cidade, esses níveis de cobertura vacinal não devem ser extrapolados para a população total, porém são indicativos de cobertura vacinal baixa. Em resumo, os resultados deste estudo indicam que uma parcela importante dos cães vacinados contra a raiva em Santa Maria/RS não está desenvolvendo níveis adequados de anticorpos contra o RaBV, indicando a necessidade de se reavaliar as estratégias de vacinação. Por outro lado, os níveis de cobertura vacinal detectados em uma amostra de cães sem histórico conhecido de vacinação sugerem a necessidade de se expandir as campanhas de vacinação antirrábica na cidade de Santa Maria/RS para produzir uma cobertura vacinal mais ampla.

Palavras-chave: Raiva. Cães. Vacinas. Cobertura vacinal. RabV.

ABSTRACT

NEUTRALIZING ANTIBODIES AGAINST RABIES VIRUS IN DOGS WITH AND WITHOUT HISTORY OF VACCINATION IN SANTA MARIA – RS – BRAZIL

AUTHOR: Karina Gonzalez Fernandes

ADVISOR: Eduardo Furtado Flores

Rabies virus (RabV) belongs to the family *Rhabdoviridae*, genus *Lyssavirus* and is the agent of a severe zoonotic disease that courses with neurological signs and inevitably leads to death. Urban rabies, which is maintained through transmission cycles involving dogs and cats is under control or virtually eradicated in most Brazilian states. Regardless, massive vaccination of urban canine and feline populations is still being performed in many cities as to maintain the population immunity. Considering the recent outbreaks of bovine rabies in Rio Grande do Sul state (RS) and the potential risk of introduction of the virus in the urban populations of dogs and cats, it is relevant to evaluate the levels and coverage of humoral immune response induced by rabies vaccination in these populations. Thus, the present study aimed at: 1. To determine the magnitude of the serological response in dogs with recent history of rabies vaccination; 2. To investigate the frequency and level of antibodies to RabV in dogs with unknown history of vaccination against rabies. The first study included 440 serum samples from dogs with recent history of vaccination against rabies, collected during the 2015 Rabies Vaccination Campaign in Santa Maria, RS. The second study used 300 samples from dogs submitted to the University Veterinary Hospital (HVU) of the Federal University of Santa Maria in 2015. These dogs have been submitted to HVU for varied clinical and surgical procedures and, thus, rabies vaccination history was unknown. Serum samples were submitted to the rapid inhibition of fluorescent foci test (RIFFT) which detects neutralizing antibodies to RabV. Out of the 440 samples collected from vaccinated animals, 70.4% (330/440) harbored neutralizing antibody titers ≥ 0.5 UI/mL, considered an indicative of protection to rabies by the World Health Organization (WHO). However, approximately 30% of the animals did not contain antibodies in adequate levels. Among the animals with titers below 0.5 UI/mL, 57.4% (74 amostras) had been subjected to two or more vaccinations, indicating failure in the immunization strategies and/or poor vaccine quality. Among the samples collected from dogs with unknown history of rabies vaccination, 42.3% (127/300) contained neutralizing antibody titers ≥ 0.5 UI/mL. Thus, 57.7% (173/300) of the sampled animals did not contain levels of protective antibodies against rabies. Considering that these samples were collected from a selected dog population, these coverage levels should not be considered representative of the vaccine coverage of the total dog population. However, these numbers are indicative of a low rabies vaccine coverage in the urban dog population of Santa Maria, RS. In summary, our results demonstrated that an important proportion of dogs vaccinated against rabies have not developed adequate antibody levels against RabV, indicating the need of reformulation of the vaccination strategies. On the other hand, the levels of vaccine coverage detected in a selected sampling with no history of vaccination indicates the need to extend the rabies vaccination campaigns as obtain a wider vaccine coverage.

Key-words: Rabies. Dogs. Vaccine. Serological response. Antibodies

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -Resultados da pesquisa de anticorpos contra o RabV em 440 amostras de soro de cães com histórico de vacinação antirrábica. Titulação de anticorpos frente ao RabV pelo teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RIFFT) frente a aproximadamente 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀) de CVS. A = amostras de soro canino que apresentaram títulos protetivos segundo a organização mundial de saúde (OMS, 2013) (título maior ou igual a 0,5 UI/mL); B = amostras de soro canino considerados sorologicamente desprotegidos (soronegativos ou com título menor que 0,5 UI/mL); C = amostra imprópria para teste.....31
- Figura 2 - Resultados da pesquisa de anticorpos contra o RabV em 300 amostras de soro de cães com histórico de vacinação antirrábica desconhecido. Titulação de anticorpos frente ao RabV pelo teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RIFFT) frente a aproximadamente 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀) de CVS. A = amostras de soro canino que apresentaram títulos protetivos segundo a organização mundial de saúde (OMS, 2013) (título maior ou igual a 0,5 UI/mL); B = amostras de soro canino considerados sorologicamente desprotegidos (soronegativos ou com título menor que 0,5 UI/mL); C = amostra imprópria para teste.....32
- Figura 3 - Distribuição da frequência dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o RabV em 310 amostras de soro canino com títulos de anticorpos protetivos no grupo de animais com histórico de vacinação conhecido (igual ou superior a 0,5 UI/ml). “= títulos de anticorpos maior ou igual a 16 UI/mL.....33
- Figura 4 -Distribuição da frequência dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o RabV em 127 amostras de soro canino com títulos de anticorpos protetivos no grupo de animais com histórico de vacinação desconhecido (igual ou superior a 0,5 UI/ml). “= títulos de anticorpos maior ou igual a 16 UI/mL.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos animais por sexo, idade, média do número de vacinações prévias e a média de tempo após a última vacinação de todos os animais incluídos no estudo (geral) ou agrupados conforme título de anticorpos contra o RabV.....	35
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. CAPÍTULO 1.....	12
MANUSCRITO.....	12
ABSTRACT.....	13
RESUMO.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26
3. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma das doenças humanas e animais mais antigas que se conhece. Ao mesmo tempo, é uma doença quase sempre mortal. A cada ano, aproximadamente 70.000 pessoas morrem com a doença em países subdesenvolvidos, sobretudo crianças. Apesar de ser conhecida desde a antiguidade, a doença continua sendo um grave problema de saúde pública nos países subdesenvolvidos. Esta doença ocorre em todos os continentes, exceto na Antártida e Austrália e aproximadamente 2/3 dos países são afetados (WHO, BRASIL, 2016).

O vírus da raiva (RabV) pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (ICTV, 2014). O RabV possui genoma RNA, não-segmentado, de cadeia simples e polaridade negativa, que codifica cinco proteínas, incluindo a nucleoproteína, fosfoproteína, proteína da matriz, glicoproteína, e RNA polimerase dependente de RNA (RODRIGUEZ, 2012).

A transmissão do RabV ocorre pela saliva de animais infectados, principalmente devido a mordeduras (WHO, 1992). O período de incubação é muito variável após infecções naturais, pois diversos fatores podem estar associados a um maior ou menor período de incubação, tais como a amostra de vírus, o local e profundidade da mordedura (quanto mais próximo do sistema nervoso central (SNC), mais rápido o acesso do vírus ao mesmo), a carga viral, a suscetibilidade da espécie e imunidade do animal agredido. Geralmente, o período de incubação é de 2 a 12 semanas, porém períodos superiores a um ano já foram relatados (INSTITUTO PASTEUR, 2007; MAYR & GUERREIRO, 1972).

Os sinais clínicos de animais e pessoas infectadas pelo RabV é decorrente da infecção do SNC e variam desde paralisia (lesões no córtex cerebral) até distúrbios de comportamento (lesões no sistema límbico) (MAYR & GUERREIRO, 1972). Cães geralmente desenvolvem a forma furiosa/agressiva, quando tendem a se tornar agressivos, desenvolverem incoordenação motora e paralisias musculares (BATISTA et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2012).

O RabV se perpetua na natureza em quatro ciclos, que diferem entre si pelas espécies envolvidas e locais onde ocorrem: ciclos urbano, rural, silvestre terrestre e aéreo. O ciclo urbano envolve principalmente cães e gatos. O hospedeiro principal neste ciclo é o cão doméstico (*Canis familiaris*). A infecção humana ocorre, em geral, pela estreita relação existente entre os cães e o homem. O ciclo rural tem como reservatórios os morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e caracteriza-se pela transmissão da raiva aos animais domésticos de interesse econômico do meio rural, conhecidos como herbívoros domésticos. O ciclo aéreo envolve os morcegos ou quirópteros, hematófagos ou não, que podem manter e

transmitir o RabV entre si, mantendo assim o vírus na natureza. O ciclo silvestre terrestre envolve a transmissão do RabV entre diferentes espécies de carnívoros silvestres, por exemplo guaxinins (*Procyon sp.*) e gambás (*Didelphis virginiana*), entre outros (INSTITUTO PASTEUR, 2009).

A distribuição da raiva no mundo não é uniforme, existindo áreas livres e áreas com diferentes níveis de endemicidade, podendo apresentar, ocasionalmente, comportamento epizootico. No Brasil, a raiva é endêmica, em diferentes níveis de acordo com as regiões. De 1980 a julho de 2012 foram registrados 1.457 casos de raiva humana no Brasil, (BRASIL,2016). Mais de 95% dos casos humanos são causadas pela mordida de cães (OIE, 2016).

A vacinação profilática é insubstituível e muito importante quando se trata da prevenção da raiva em animais e humanos. Detecção e quantificação de anticorpos são utilizados principalmente para o controle do *status* de imunidade humoral do animal após a vacinação antirrábica. Os anticorpos são o resultado da resposta imune humoral do organismo para os antígenos; é um processo que é conduzido, e influenciado por muitos fatores: quantidade de antígenos, local de aplicação, a participação do complexo de histocompatibilidade (MHC) e, especialmente o estado geral do animal (MOORE & HANLON 2010).

Para a detecção e quantificação de anticorpos contra o vírus da raiva são preconizados pela OIE dois testes sorológicos: teste de neutralização do vírus com anticorpos fluorescentes (FAVN) e o teste rápido de inibição de foco fluorescente (RFFIT) para a determinação de anticorpos neutralizantes (OIE, 2013). Os anticorpos neutralizantes são considerados componentes-chave da resposta imunitária adaptativa contra o vírus da raiva (HOOPER et al., 1998). A Organização Mundial de Saúde determinou que o nível de anticorpos de pelo menos 0,5 UI/ml é indicativo de proteção conferida por vacinas. Este valor foi mencionado pela primeira vez pelo Comitê de Especialistas sobre Raiva no relatório da Organização Mundial de Saúde de 1992 e é reconhecido em todo o mundo (WHO, 2016). Porém, estudos mostram que a proteção conferida pelas vacinas, muitas vezes é ineficiente, devendo-se quantificar a resposta imune, após vacinação, a fim de se obter o nível de anticorpos neutralizantes na população vacinada (RIGO et al., 2006). Com isso, verifica-se o grau de proteção dos cães frente ao vírus da raiva, visto que são os maiores responsáveis pela transmissão da enfermidade aos humanos (WHO, 2016).

A Organização Mundial de Saúde Animal estima que 70% de cobertura vacinal na população canina é suficiente para proteção contra a doença (OIE, 2016). No Brasil, o calendário de vacinação acontece geralmente no segundo semestre do ano (BRASIL, 2016).

No Rio Grande do Sul anualmente são relatados casos de detecção do RabV em morcegos não-hematófagos capturados em áreas urbanas, oferecendo um grande risco à saúde animal e humana (CRMV-RS, 2013). De 2014 a abril de 2016 foram notificados 228 casos de raiva animal, entre eles, em felinos, bovinos, equinos, morcegos hematófagos e não-hematófagos, evidenciando que o vírus está circulando no Estado (SVS, 2016).

Em Santa Maria a vacinação canina é realizada anualmente pelo curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, 2016). Além dessa campanha, clínicas veterinárias, profissionais autônomos e empresas de produtos veterinários realizam vacinação antirrábica em cães e gatos.

Assim, os objetivos deste trabalho foram investigar os níveis de anticorpos neutralizantes em cães com histórico de vacinação antirrábica em Santa Maria/RS e também em uma amostra de cães sem histórico conhecido de vacinação.

2. CAPÍTULO 1

Anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva em cães com e sem histórico de vacinação em Santa Maria – RS - Brasil.

Autores: Karina Gonzalez Fernandes, Mathias Martins, Juliana
Felipetto Cargnelutti, Rudi Weiblen, Eduardo Furtado Flores

De acordo com normas para publicação em: Ciência Rural.

Neutralizing antibodies against rabies virus in dogs with and without history of vaccination in Santa Maria – RS – Brazil

Anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva em cães com e sem histórico de vacinação em Santa Maria – RS - Brasil

Karina Gonzalez Fernandes¹, Mathias Martins¹, Juliana Felipetto Cargnelutti¹, Rudi Weiblen¹, Eduardo Furtado Flores^{1*}

ABSTRACT

Urban rabies, which is maintained in transmission cycles involving dogs and cats is controlled or virtually eradicated in most Brazilian states. Nonetheless, massive vaccination of urban canine and feline populations against rabies virus (RabV) is still being performed in many cities as to maintain the population immunity. Considering the recent outbreaks of bovine rabies in Rio Grande do Sul state (RS) and the potential risk of introduction of the virus in the urban populations of dogs and cats, the present study aimed at: 1. To determine the magnitude of the serological response in dogs with recent history of rabies vaccination in Santa Maria, RS; 2. To investigate the frequency and level of antibodies to RabV in dogs with unknown history of vaccination against rabies. The first study included 440 serum samples from dogs with recent history of vaccination against rabies, collected during the 2015 Rabies Vaccination Campaign in Santa Maria, RS. The second study used 300 samples from dogs

^{1*}Programa de Pós graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria – Setor de Virologia, Av. Roraima, 1000, prédio 63 A, Parque de exposições, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com. Autor para correspondência.

submitted to the University Veterinary Hospital (HVU) of the Federal University of Santa Maria in 2015. These dogs have been submitted to HVU for varied clinical and surgical procedures and, thus, the rabies vaccination historic was unknown. Serum samples were submitted to the rapid inhibition of fluorescent foci test (RIFFT) which detects neutralizing antibodies do RabV. Out of the 440 samples collected from vaccinated animals, 70.4% (330/440) harbored neutralizing antibody titers ≥ 0.5 UI/mL, considered an indicative of protection to rabies by the World Health Organization (WHO). However, approximately 30% of the animals did not contain antibodies in adequate levels. Among the animals with titers below 0.5 UI/mL, 57.4% (74 amostras) had been subjected to two or more vaccinations, indicating failure in the immunization strategies and/or poor vaccine quality. Among the samples collected from dogs with unknown historic of rabies vaccination, 42.3% (127/300) contained neutralizing antibody titers ≥ 0.5 UI/mL. Thus, 57.7% (173/300) of the sampled animals did not contain levels of protective antibodies against rabies. Considering that these samples were collected from a selected dog population, these coverage levels should not be considered representative of the vaccine coverage of the total dog population. However, these numbers are indicative of a low rabies vaccine coverage in the urban dog population of Santa Maria, RS. In summary, our results demonstrated that an important proportion of dogs vaccinated against rabies have not developed adequate antibody levels against RabV, indicating the need of reformulation of the vaccination strategies. On the other hand, the levels of vaccine coverage detected in a selected sampling no history of vaccination indicates the need to extend the rabies vaccination campaigns as obtain a broader vaccine coverage.

Key-words: rabies, dogs, vaccine, serological response, antibodies.

RESUMO

A raiva urbana, que é mantida em ciclos envolvendo cães e gatos, está sob controle ou virtualmente erradicada na maioria dos Estados do Brasil. No entanto, a vacinação maciça das populações caninas e felinas das cidades contra o vírus rábico (RabV) segue sendo realizada para manter os níveis de imunidade dessas populações. Considerando-se os atuais surtos de raiva herbívora no Estado do Rio Grande do Sul e o risco potencial de introdução do vírus em populações urbanas de cães, o presente estudo teve como objetivos: 1. Avaliar os níveis de anticorpos anti-RabV em cães com histórico de vacinação antirrábica de Santa Maria/RS e 2. Investigar a frequência e níveis de anticorpos anti-RabV em uma amostra de cães sem histórico conhecido de vacinação. No primeiro estudo, utilizaram-se 440 amostras séricas de cães coletadas durante a campanha de vacinação antirrábica de 2015 na cidade Santa Maria. Somente foram coletadas amostras de cães com histórico confirmado de, pelo menos, uma vacinação antirrábica nos dois anos anteriores. O segundo estudo incluiu 300 amostras de cães que foram levados para atendimento clínico e/ou cirúrgico no Hospital Universitário Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU/UFSM) no ano de 2015. O histórico de vacinação antirrábica neste grupo não foi investigado. As amostras de soro foram submetidas ao teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RIFFT) que detecta anticorpos neutralizantes contra o RabV. Dentre as amostras coletadas na campanha de vacinação, 70,4% (330/440) apresentaram título neutralizante igual ou superior a 0,5 UI/ml, considerado protetivo pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No entanto, aproximadamente 30% dos animais não apresentavam títulos adequados. Dentre as amostras com títulos inferiores a 0,5UI/ml, 57,4% (74 amostras) eram provenientes de cães com histórico de mais de uma vacinação. Dentre as amostras coletadas de cães sem histórico conhecido de vacinação, 42,3% (127/300) apresentaram título igual ou superior a 0,5 UI/ml e 57,7% (173/300) não possuíam

anticorpos em títulos considerados adequados para proteção. Considerando-se que tratava-se de uma amostra de conveniência, e não necessariamente representativa da população canina da cidade, esses níveis de cobertura vacinal não devem ser extrapolados para a população total, porém são indicativos de cobertura vacinal baixa. Em resumo, os resultados deste estudo indicam que uma parcela importante dos cães vacinados contra a raiva em Santa Maria/RS não está desenvolvendo níveis adequados de anticorpos contra o RaBV, indicando a necessidade de se reavaliar as estratégias de vacinação. Por outro lado, os níveis de cobertura vacinal detectados em uma amostra de cães sem histórico conhecido de vacinação sugerem a necessidade de se expandir as campanhas de vacinação antirrábica na cidade de Santa Maria/RS para produzir uma cobertura vacinal mais ampla.

Palavras-chave: raiva, cães, vacinas, cobertura vacinal, RabV.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma das principais zoonoses virais e causa a morte de, aproximadamente, 70.000 pessoas por ano, sobretudo em países subdesenvolvidos (WHO, 2016). Embora seja uma doença milenar, a raiva continua sendo um grave problema de saúde pública, e também de sanidade animal (OIE, 2016). A doença é causada pelo vírus da raiva (ou vírus rábico, RabV), que pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (ICTV, 2014). O RabV é um vírus envelopado, com genoma RNA de polaridade negativa que codifica cinco proteínas: nucleoproteína, fosfoproteína, proteína da matriz, RNA polimerase e glicoproteína G (gG) (ICTV, 2014; WAGNER et al., 1972).

O RabV é transmitido pela saliva de animais infectados, principalmente por meio de mordeduras ou arranhaduras (WHO, 1992). Os animais infectados desenvolvem quadros de

doença neurológica, com sinais clínicos que variam desde alterações de comportamento até paralisia (MAYR & GUERREIRO, 1972). Cães geralmente desenvolvem a forma furiosa da doença, quando tendem a se tornar agressivos, desenvolver incoordenação motora e paralisias musculares (RODRIGUEZ et al., 2012).

A manutenção do RabV na natureza ocorre tanto na zona rural como em áreas urbanas, sendo que nas cidades o agente é transmitido, principalmente, entre cães e gatos. Na área rural, animais de produção geralmente se infectam pela mordedura de morcegos hematófagos. No ciclo silvestre, tanto morcegos quanto pequenos mamíferos (gambás, mãos-peladas, raposas, etc.) podem abrigar e transmitir o vírus (SILVA et al., 2009). Além disso, morcegos não-hematófagos também podem carrear o RabV e, eventualmente, transmitir o vírus para outras espécies de morcegos ou para outros mamíferos (CABRAL et al., 2012).

Os cães são os principais hospedeiros e fontes do RabV para humanos (WHO, 2016). Existem registros de raiva em cães e gatos em todo o Brasil, tanto pela variante do cão, como pelas variantes do vírus encontradas em morcegos. Estas variantes pertencem ao ciclo silvestre da doença e podem acometer, acidentalmente, outras espécies de animais domésticos como os cães e gatos (KOBAYASHI et al., 2005).

Na maioria dos Estados do Brasil, a raiva urbana (transmitida por cães e gatos) encontra-se controlada, com ocorrências apenas ocasionais (BRASIL, 2016). O controle da raiva urbana foi obtido por décadas de campanhas de vacinação antirrábica, o que tem reduzido drasticamente a população de animais não imunizados e, conseqüentemente, a circulação do vírus no meio urbano (OIE, 2016). Porém, casos de raiva humana seguem ocorrendo em vários municípios em todo Brasil: em 2015 foram notificados 47 casos de raiva em cães no município de Corumbá, em Mato Grosso do Sul, com exposição e óbito de uma pessoa (SILVA et. al., 2015). Nas regiões Norte e Nordeste são frequentemente descritos casos de raiva humana transmitida por cães (BRASIL, 2016). No Rio Grande do Sul, em 2013

e 2014 ocorreram casos de exposição humana ao RabV na área rural por arranhadura/mordedura de gatos (CRMV-RS, 2014). Além disso, anualmente são relatados casos de detecção do RabV em morcegos não-hematófagos capturados em áreas urbanas do Rio Grande do Sul, oferecendo um grande risco à saúde animal e humana (CRMV-RS, 2013). No Rio Grande do Sul, de 2014 a abril de 2016 foram notificados 228 casos de raiva animal, entre eles, em felinos, bovinos, equinos, morcegos hematófagos e não-hematófagos, evidenciando que o vírus está circulando no Estado (SVS, 2016).

A vacinação é a principal forma de prevenir e controlar a raiva urbana e rural, bem como para pessoas sob risco de infecção (OIE, 2016). Estudos demonstram a eficiência das vacinas e dos protocolos de vacinação (RAMANNA, et al., 2007; SHIRAISHI et al., 2014). No entanto, existem poucas investigações que demonstrem o grau de imunização de populações após vacinação de rotina.

Considerando-se, a atual epizootia de raiva em herbívoros no RS, os recentes relatos de pequenos animais infectados pelo RabV e os casos de exposição humana neste Estado, os objetivos deste trabalho foram avaliar os níveis de anticorpos contra o RabV em cães com histórico de vacinação antirrábica e verificar também a frequência de anticorpos anti-RabV em cães sem histórico conhecido de vacinação na cidade de Santa Maria – RS.

MATERIAL E MÉTODOS

A presença e os níveis de anticorpos neutralizantes contra o RabV foram investigados em cães com e sem histórico conhecido de vacinação antirrábica.

Amostras de soro

Amostras foram coletadas de dois grupos de cães: no grupo 1, 440 amostras foram coletadas durante campanha de vacinação antirrábica de 2015 e os cães apresentavam

histórico de pelo menos uma vacinação entre os anos de 2013 e 2015 – segundo relato dos proprietários ou apresentação da carteira de vacinação. Além disso, foram registrados os seguintes dados: sexo, idade, número de vacinações antirrábicas que o animal recebeu anteriormente e o ano da última vacinação. No grupo 2, foram obtidas 300 amostras coletadas durante atendimento clínico veterinário, no Hospital Universitário Veterinário (HUV/UFSM) de Santa Maria -RS, no ano de 2015. As amostras (2 a 5mL) foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro, que foi submetido à inativação do complemento a 56°C por 30 min. O soro foi armazenado a -20°C até a realização dos testes.

Teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RIFFT)

Em todos os procedimentos de amplificação viral e de sorologia foram utilizadas células de rim de hamster neonato BHK-21 mantidas em meio essencial mínimo (MEM) contendo penicilina (1,6 mg.L⁻¹), estreptomicina (0,4 mg.L⁻¹) e anfotericina B (2,25 mg.L⁻¹) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A cepa do RabV utilizada nos testes foi a Challenge Vírus Standard (CVS132-11A), gentilmente cedida pelo Instituto Pasteur de São Paulo.

Os testes foram realizados em placas de 96 orifícios conforme SMITH et al. (1973), com modificações. Diluições seriadas das amostras de soro na razão 2 (diluições de 1:10 a 1:1280) foram incubadas por 90 min a 37°C com aproximadamente 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC50) da cepa CVS-PV do RabV. Células BHK-21 (aproximadamente 2,5 x 10⁴ células/orifício) foram adicionadas à mistura de vírus e soro, e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 48 h. Após este período, o meio de cultura foi removido e adicionou-se 40 µL de tripsina versene (2,5 g/L). A mistura foi mantida 20 min a 37°C e o cultivo ressuspendido com 60 µL MEM e 20 µL SFB. Foram transferidos 30 µL dessa suspensão de células para lâminas do tipo multispot e mantidas em estufa a 37°C com

5% de CO₂ por 2 h. As células foram fixadas na lâmina utilizando acetona 100% por 5 min e incubados por 1 h a 37°C com um anticorpo monoclonal anti-RabV conjugado com fluoresceína (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, FujirebioDiagnostics, Malvern, PA). Cada cavidade da lâmina foi utilizada uma das diluições do soro e as células foram examinadas sob um microscópio de epifluorescência (Axiolab ZEISS®) (aumento de 200X). O título neutralizante foi definido como a recíproca da maior diluição de soro capaz de prevenir a infecção dos cultivos celulares. Em todos os testes, foi utilizado um soro controle positivo fornecido pelo Instituto Pasteur de São Paulo, contendo 0,5 UI/mL. O título neutralizante deste soro foi utilizado como referência para converter o título das amostras analisadas para UI/mL.

Estatística

Para realizar as análises estatísticas utilizou-se o programa Statgraphics® Centurion XV versão 15.1. Os dados foram submetidos à análise de variância e constatada diferença estatística realizou-se regressão simples ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 440 amostras coletadas de cães com histórico de vacinação, 310 (70,4%) apresentaram título de anticorpos contra RabV igual ou superior a 0,5 UI/mL. Outras 129 amostras (29,3%) foram negativas ou apresentaram título inferiores a 0,5 UI/mL; uma amostra (0,2%) mostrou-se imprópria para análise (Figura 1). Entre os animais com título de anticorpos igual ou superior a 0,5 UI/mL, os títulos neutralizantes variaram entre 0,5 e igual ou maior a 16 UI/mL, e o título médio geométrico (GMT) dos reagentes foi 3,8 UI/mL. Assim, 8,7% apresentaram título de 0,5UI/ml, 10,6% apresentaram título de 1UI/ml, 17% apresentaram título de 2UI/ml, 22,5% apresentaram título de 4UI/ml, 25,4% apresentaram

título de 8UI/ml e 15,4% apresentaram título de 16UI/ml ou mais (Figura 3). Estes resultados demonstram que aproximadamente 90% dos animais soropositivos possuíam títulos pelo menos duas vezes maiores do que o título considerado protetivo pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013).

No entanto, observou-se que 29,3% dos animais testados apresentaram-se soronegativos ou com anticorpos em níveis considerados insuficientes para conferir proteção contra desafio pelo RabV. Os índices de animais soronegativos ou com títulos baixos são preocupantes do ponto de vista da eficácia das campanhas de imunização, uma vez que todos os animais examinados, de acordo com os proprietários, apresentavam histórico de vacinação.

A vacinação antirrábica em cães é uma ferramenta importante, que tem como principal objetivo manter níveis sorológicos protetores em animais domésticos, reduzindo o número de animais suscetíveis ao vírus da raiva (SEGHAIER et al., 1999). Assim, quando são realizadas campanhas de vacinação em massa, o objetivo é induzir uma resposta imune protetora numa alta proporção da população (ALMEIDA, et al., 1997). Porém, assim como observado no presente trabalho, outros estudos que avaliaram os níveis de resposta imunológica em cães vacinados também observaram que parte dos animais amostrados não apresentaram resposta imune satisfatória (ALMEIDA, et al., 1997; RIGO et al., 2006; PÁEZ et al., 2011).

No presente estudo, dentre os 310 animais que apresentavam resposta imune teoricamente protetiva, 77,4% possuíam histórico de mais que uma dose de vacina antirrábica, e a média de vacinações prévias nestes animais foi de 4,2 vezes (Tabela 1). RAMANNA e colaboradores (2007) avaliaram os níveis de anticorpos neutralizantes em cães vacinados e observaram que depois de dose única de vacina antirrábica, apenas 56% dos cães desenvolveram títulos considerados protetores. PÁEZ e colaboradores (2011) observaram que 48% dos animais que não receberam aplicação anual de reforço da vacina antirrábica, não produziram resposta humoral adequada. ALBAS e colaboradores (2013) analisaram a resposta

imune humoral em cães e gatos vacinados contra o vírus da raiva no sudeste do Brasil e observaram que apenas 52,1% dos cães amostrados soroconverteram. Nestes estudos, a idade e a falta de reforço vacinal aparecem como um dos principais problemas que levam a falhas na indução de anticorpos.

No presente trabalho, pode-se observar uma relação entre o número de vacinações e o título de anticorpos apresentados pelos animais (regressão simples [$P < 0,05$]). Na tabela 1 são apresentados os resultados referentes a distribuição do sexo, média da idade, média do número de vacinações prévias e média do tempo após a última vacinação. Aproximadamente 30% dos animais amostrados eram soronegativos ou não apresentaram imunidade indicativa de proteção, embora a média de vacinações prévias recebidas por estes animais tenha sido 2,74 vacinações. Porém, 42,6% (55/129) destes cães são animais primovacinados, ou seja, receberam apenas uma dose de vacina. Esses resultados somam-se às observações feitas em outros estudos (ALMEIDA, et al., 1997; SEGHAIER et al., 1999; SILVA et al., 2009;) e expõem necessidade de reforço vacinal – ou de complementação da primovacinação - em animais que estejam recebendo a primeira dose vacinal. Uma possível solução, mesmo em campanhas de vacinação em massa, seria a indicação de uma dose de reforço vacinal com intervalo de 30 a 60 dias nos animais que nunca antes receberam vacina antirrábica.

Neste sentido, um estudo desenvolvido por BABONNI e colaboradores (2014) no município de Botucatu/SP avaliou a resposta sorológica de 576 cães primovacinados e que receberam uma dose de reforço vacinal 30 dias após a primeira vacinação. Trinta dias após o reforço, 99% dos animais apresentaram títulos protetivos.

Um dos resultados do presente estudo que merece destaque, é a população de animais que recebeu pelo menos duas vacinações, mas mesmo assim, não apresentou níveis de anticorpos compatíveis com proteção. Dos 129 animais soronegativos ou que apresentaram título menor que 0,5 UI/mL, 74 (57,4%) eram cães que receberam mais do que uma vacinação

antirrábica. Esses resultados indicam falhas na estratégia de imunização e/ou baixa qualidade das vacinas utilizadas.

Outro fator importante é o intervalo de tempo em relação à última vacinação. Dos animais soronegativos ou com títulos de anticorpo não protetivo, 64,7% haviam recebido a última vacinação há dois anos. Já nos animais sorologicamente protegidos, 92,9% haviam sido vacinados no ano anterior. Com isso, destaca-se a importância das campanhas anuais de vacinação antirrábica, como forma de manter grande parte da população canina devidamente protegida, visto que o vírus rábico segue circulando em áreas rurais e apresenta potencial de ser introduzido nos ambientes urbanos (ALMEIDA, et al., 1997).

No presente estudo, a média de idade geral dos animais foi de 5,8 anos e, embora a média de idade dos animais com títulos protetivos tenha sido maior do que nos animais considerados desprotegidos (6,5 e 4,3 anos, respectivamente), a idade não apresentou relação com os níveis de imunidade. Como a Campanha de Vacinação Antirrábica em Santa Maria/RS é realizada anualmente há pelo menos 40 anos, é provável que, em geral, animais mais velhos tenham recebido o maior número de vacinações.

As campanhas anuais de vacinação antirrábica de cães e gatos em Santa Maria – RS, tem utilizado vacinas inativadas, compostas de suspensão inativada de vírus rábico amplificado em células BHK-21 (Baby Hamster Kidney Cell - BHK-21 [C-13 ATCC® CCL-10™]) com adjuvante hidróxido de alumínio.

A qualidade da vacina, dose, idade da primovacinação, estado nutricional, presença de infecções concomitantes, além da capacidade imunológica do animal podem interferir nos índices de falhas vacinais (SEGHAIER et al., 1999; ALMEIDA, et al., 1997; MORTERS et al., 2014). Porém, esses fatores não foram avaliados no presente estudo. Assim, não é possível considerar ou descartar que possam estar relacionados ao nível de falhas vacinais observados.

Dentre os animais sem histórico conhecido de vacinação antirrábica, observou-se que 42,3% (127/300) apresentaram títulos iguais ou superiores a 0,5 UI/ml, enquanto 57,7% (173/300) não possuíam anticorpos em títulos considerados indicativos de proteção (Figura 2).

Entre os animais com título de anticorpos igual ou superior a 0,5 UI/mL, os títulos neutralizantes variaram entre 0,5 e igual ou maior a 16 UI/mL. Assim, 22,5% apresentaram título de 0,5UI/ml, 23,2% apresentaram título de 1UI/ml, 18,6% apresentaram título de 2UI/ml, 17% apresentaram título de 4UI/ml, 10% apresentaram título de 8UI/ml e 8,5% apresentaram título de 16 UI/ml ou mais (Figura 3). Como esses animais representaram uma amostragem de conveniência, não podem ser considerados representativos na população canina da cidade de Santa Maria. Na verdade, é provável que esses valores sejam muito superestimados em relação à cobertura vacinal existente na população total. A população canina estimada de Santa Maria (de acordo com estimativas da proporção canina/humana) gira em torno de 60 a 70 mil cães, enquanto que as campanhas de vacinação antirrábica realizadas na cidade abrangem entre 15 e 18 mil animais anualmente. Somando-se os animais imunizados em clínicas particulares, é pouco provável que o número de cães imunizados contra a raiva na cidade de Santa Maria seja superior a 20 mil cães. Por outro lado, a amostragem realizada em cães levados ao HVU/UFMSM provavelmente não reflete a população geral de cães da cidade, contemplando preferencialmente cães de proprietários de nível sócio-econômico e cultural acima da média da população. Por essas razões, acredita-se que a frequência real de animais soropositivos ao RabV pela vacinação em Santa Maria seja muito inferior aos 42,3% detectados neste estudo.

Segundo a Organização Mundial de saúde, cobertura vacinal de 70% da população canina em áreas não endêmicas é suficiente para que haja sucesso na prevenção de transmissão da doença (WHO, 2016). Porém, sabe-se que o Rio Grande do Sul é área

endêmica para raiva dos herbívoros, onde anualmente são relatados casos da doença em bovinos. Assim, o vírus circula no estado (SEAPI, 2016). Portanto, é imprescindível, para qualquer avaliação das estratégias de prevenção contra a raiva, que se tenha uma estimativa da população canina, para se estabelecer metas de cobertura vacinal e estratégias para a sua realização (BEYER, et al, 2012; ROCHA, et al, 2011).

De acordo com a OMS, dados sobre a população canina, como estratégia de prevenção da raiva, considera aspectos como densidade populacional humana, relação entre população canina e humana, formas de propriedade dos cães, padrões de assentamento humano, entre outros fatores (WHO, 1992), porém, nenhum destes fatores consegue abranger com precisão a população de cães domiciliados ou não.

CONCLUSÃO

No grupo dos animais com histórico de vacinação antirrábica nos últimos dois anos, aproximadamente 30% dos animais não apresentam imunidade protetora. Visto que, destes animais, uma parcela considerável possuía apenas uma dose de vacina, o estabelecimento de um calendário de vacinação diferenciado para animais primovacinados deve ser considerado em campanhas de vacinação antirrábica.

No grupo que constituiu-se dos animais com histórico desconhecido de vacinação, 57,7% não apresentavam títulos indicativos de proteção contra a raiva, fica clara a necessidade de se ampliar as campanhas anuais de vacinação antirrábica, de forma a abranger um maior número de animais.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Os métodos utilizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria,

RS, Brasil de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de protocolo 080/2014.

AGRADECIMENTOS

Aos proprietários de cães que disponibilizaram a colheita de sangue de seus animais durante a campanha de vacinação antirrábica de 2015, ao Hospital Veterinário Universitário de Santa Maria (HVU/UFSM), e ao laboratório clínico da Universidade do Rio Grande do Sul pelo fornecimento das amostras. À equipe do Setor de Virologia (SV/UFSM). Fernandes, K.G., Martins M., Cargnelutti, J.F., Flores, E.F. e Weiblen, R. são bolsistas do CNPq.

REFERÊNCIAS

ALBAS, A. et al. Humoral immune response in dogs and cats vaccinated against rabies in southeastern Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.19, 2013. Disponível em: <<http://www.jvat.org/content/19/1/17>> Acesso em: 28 mai. 2016. DOI: 10.1186/1678-9199-19-17

ALMEIDA, M.F. et al. Humoral immune response of dogs to the inactivated suckling mouse brain vaccine utilized in anti-rabies campaigns in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v.31, p.502–507, 1997. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v31n5/2293.pdf>> Acesso em: 16 mai. 2016. DOI: 10.1590/S0034-89101997000600009

BABBONI, S.D. et al. Kinetics of rabies antibodies as a strategy for canine active immunization. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.20, 2014. Disponível em:<<http://www.jvat.org/content/20/1/37>> Acesso em: 15 mar. 2016. DOI:10.1186/1678-9199-20-37.

BEYER, H.L. et al. The implications of metapopulation dynamics on the design of vaccination campaigns. **Vaccine**, v. 30, p. 1014–1022, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198516>> Acesso em: 22 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.052.

BRASIL. (MINISTÉRIO DA SAÚDE), 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em: 08 mai.2016.

CABRAL, C.C. et al. Circulation of the rabies virus in non-hematophagous bats in the City of Rio de Janeiro, Brazil, during 2001-2010. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.2, p.255-256, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v45n2/v45n2a08.pdf>> Acesso em: 21 mai.2016. DOI: 10.1590/S0037-86822012000200008.

CRMV-RS. Sanidade. Vigilância em Saúde imuniza animais contra raiva no centro da Capital. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Mai/Jun de 2013. Online. Disponível em: <<http://www.crmvrs.gov.br/info572.html>> Acesso em: 06 mai. 2016.

CRMV-RS. Notícias. Rio Grande do Sul volta a registrar casos de raiva felina e canina. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Jan/Mar de 2014. Online. Disponível em: <<http://www.crmvrs.gov.br/jornal/78.pdf>> Acesso em: 07 mai. 2016.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**, 2014. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp/>>Acesso em: 5 mai. 2016.

KOBAYASHI, Y. et al. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 67, p.647-52, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16082111>> Acesso em: 29 mai. 2016.

MAYR, A. & GUERREIRO, M.G. 1972. Vírus da raiva. In: **Virologia Veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 437p.

MORTERS M.K. et al. Achieving population level immunity to rabies in free-roaming dogs in Africa and Asia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, 2014. DOI:10.1371/journal.pntd.000316.

OIE. (World Organisation for Animal Health), 2016. Disponível em: <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/portal-sobre-la-rabia>> Acesso em: 06 mai. 2016.

PÁEZ, A. et al. Evaluación de laseroconversión como respuesta a lavacunación antirrábica en perros en el departamento del Valle del Cauca, Colombia, 2009. **Biomédica**, v. 31, p. 474-484, 2011. Disponível em <<http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v31n4/v31n4a02.pdf>> Acesso em 25 abr 2016.

RAMANNA, B.C. et al. A study on the seroconversion in dogs vaccinated with cell culture rabies vaccine. **Journal of communicable diseases**, v.39, p. 165-70, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18697580>> Acesso em: 16 abr. 2016.

RIGO, L. et al. Rabies virus antibody titers in dogs in Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, during the Ati-rabies campaign, 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39 n.6, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v39n6/08.pdf>> Acesso em: 12 mai. 2016. doi: 10.1590/S0037-86822006000600008.

ROCHA, M.D.G. et al. Dimensionamento da população canina domiciliada e avaliação da cobertura vacinal antirábica nos municípios da V Gerência Regional de Saúde, Estado de Pernambuco. **Veterinária e zootecnia**,18(3): 473-480, 2011. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/119>> Acesso em: 15 mar. 2016.

RODRIGUEZ, L.L. et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, 2012. 2a ed., p.797-830.

SEGHAIER, C. et al. Rabies mass vaccination campaigns in Tunisia: are vaccinated dogs correctly immunized? **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 66, p. 879-884, 1999. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/61/6/879.full.pdf>> Acesso em: 22 jan. 2016.

SHIRAIISHI, R. et al. Neutralizing antibody response in Dogs and Cats Inoculated with Commercial Inactivated Rabies Vaccines. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n.4, p. 605-609, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064152/>> Acesso em: 08 mar. 2016. DOI: 10.1292/jvms.13-0335.

SEAPI. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação. **Notícias**. Disponível em:<http://www.agricultura.rs.gov.br/conteudo/4270/?Raiva_j%C3%A1_matou_quatro_mil_animais_no_Estado_em_2013> Acesso em: 17 jun. 2016.

SILVA, M.L.C.R. et al. Isolation of rabies virus from the parotid salivary glands of foxes (*Pseudalopex vetulus*) from Paraíba State, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.3, p.446-449, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v40n3/v40n3a04.pdf>> Acesso em: 15 mai. 2016. DOI: doi.org/10.1590/S1517-83822009000300004.

SILVA W.A. et al. Canine rabies in Corumbá town, Mato Grosso do Sul state, Brazil, 2015: Case report. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.9, n.4, p.386-390, 2015. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1035300/1/artigoraivacorumba.pdf>

> Acesso em: 20 mai. 2016.

SMITH, J.S. et al. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody, *Bull World Health Organ*, v.48, n.5, p. 535-541, 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2482941/>> Acesso em: 21 mai.2016.

SVS. Secretaria da Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Mapas. Raiva. 2016. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>>

Acesso em: 08 maio 2016.

WAGNER, R. R., et al. Classification of rhabdovirus proteins: a proposal. **Journal of Virology**, v.10, p. 1228-1230, 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC356605/>> Acesso em: 30 abr. 2016.

WHO. World Health Organization. Expert committee on rabies. *World Health Organ Technical Report Series*, 1992, n. 824, p.1-84, 1992. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1279901>> Acesso em: 02 mai.2016.

WHO. World Health Organization, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>>Acesso em: 07 mai. 2016.

WHO. World Health Organization. **WHO Expert Consultation on Rabies: second report**. No. 982. World Health Organization, 2013.

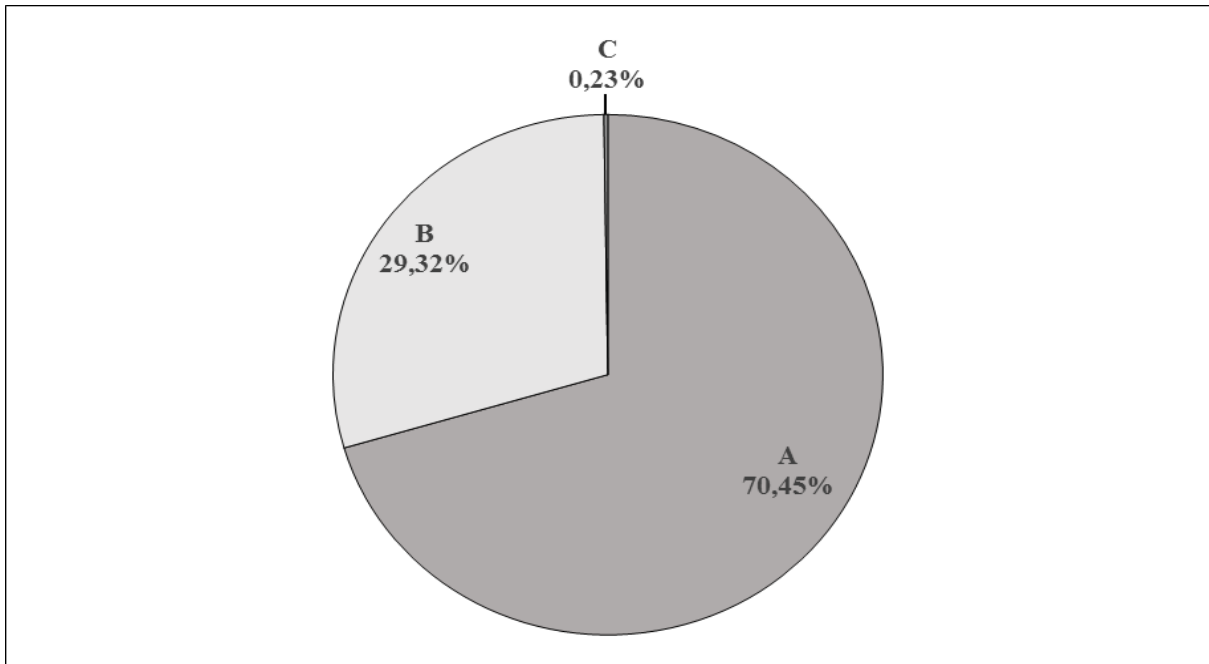


Figura 1 – Resultados da pesquisa de anticorpos contra o RabV em 440 amostras de soro de cães com histórico de vacinação antirrábica. Titulação de anticorpos frente ao RabV pelo teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RIFFT) frente a aproximadamente 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀) do CVS. A = amostras de soro canino que apresentaram títulos protetivos segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013) (título maior ou igual a 0,5 UI/mL); B = amostras de soro canino considerados sorologicamente desprotegidos (soronegativos ou com título menor que 0,5 UI/mL); C = amostra imprópria para teste.

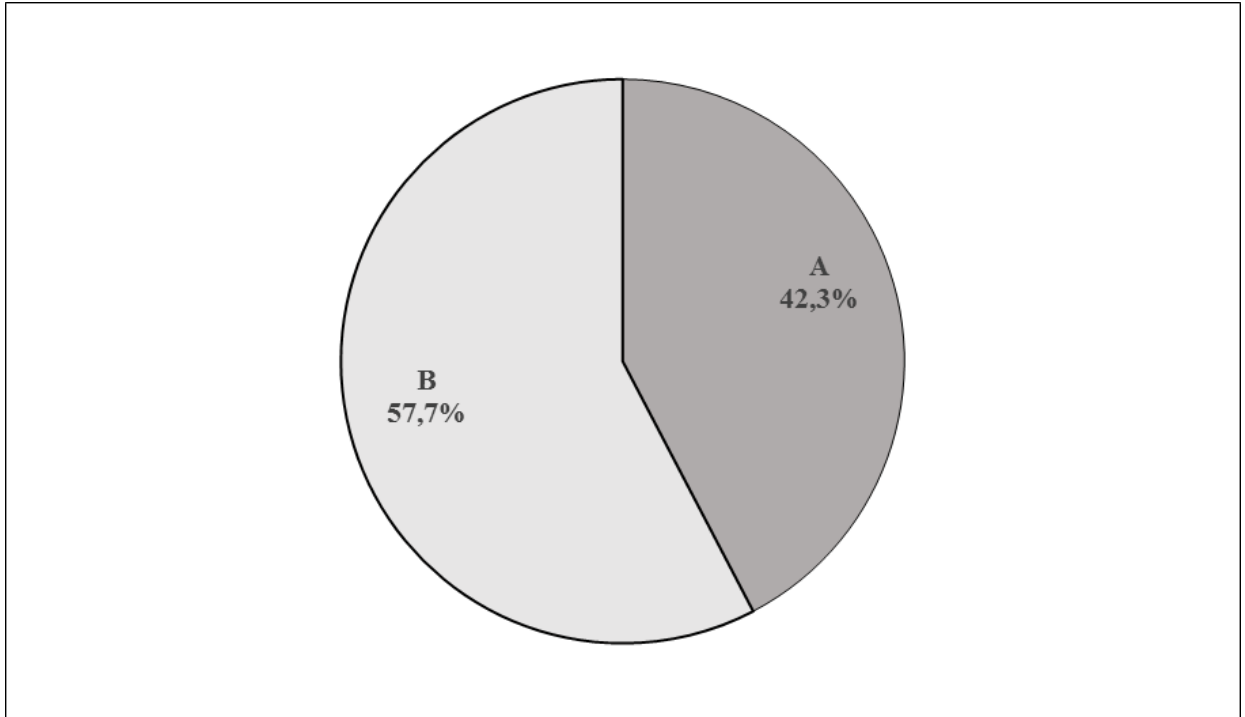


Figura 2 – Resultados da pesquisa de anticorpos contra o RabV em 300 amostras de soro de cães com histórico de vacinação antirrábica desconhecido. Titulação de anticorpos frente ao RabV pelo teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RIFFT) frente a aproximadamente 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀) do CVS. A = amostras de soro canino que apresentaram títulos protetivos segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013) (título maior ou igual a 0,5 UI/mL); B = amostras de soro canino considerados sorologicamente desprotegidos (soronegativos ou com título menor que 0,5 UI/mL).

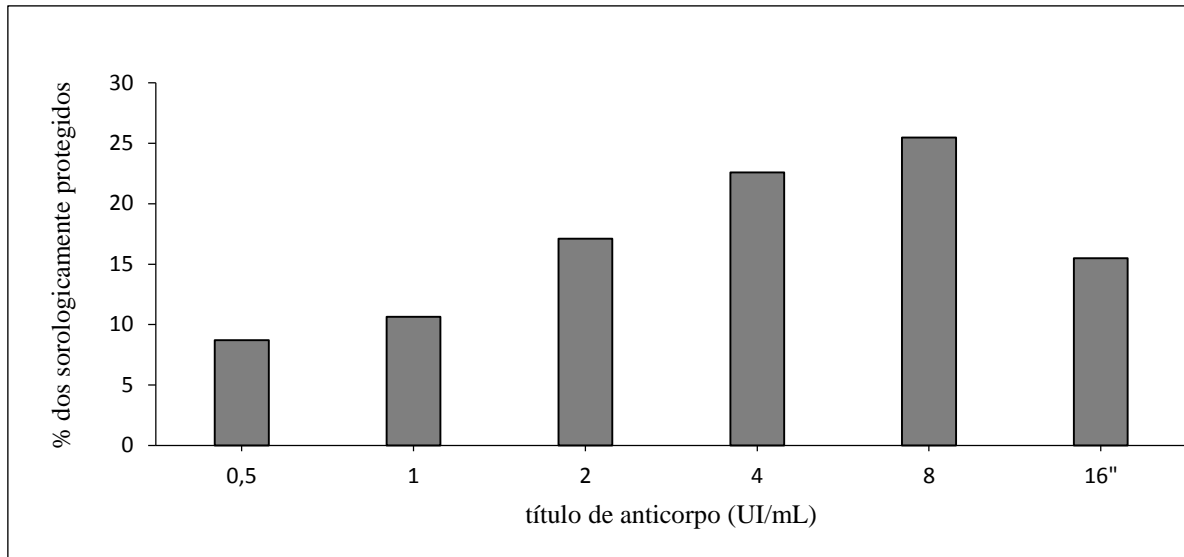


Figura 3 – Distribuição da frequência dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o RabV em 310 amostras de soro canino com títulos de anticorpos protetivos no grupo de animais com histórico de vacinação conhecido (igual ou superior a 0,5 UI/ml). “= títulos de anticorpos maior ou igual a 16 UI/mL

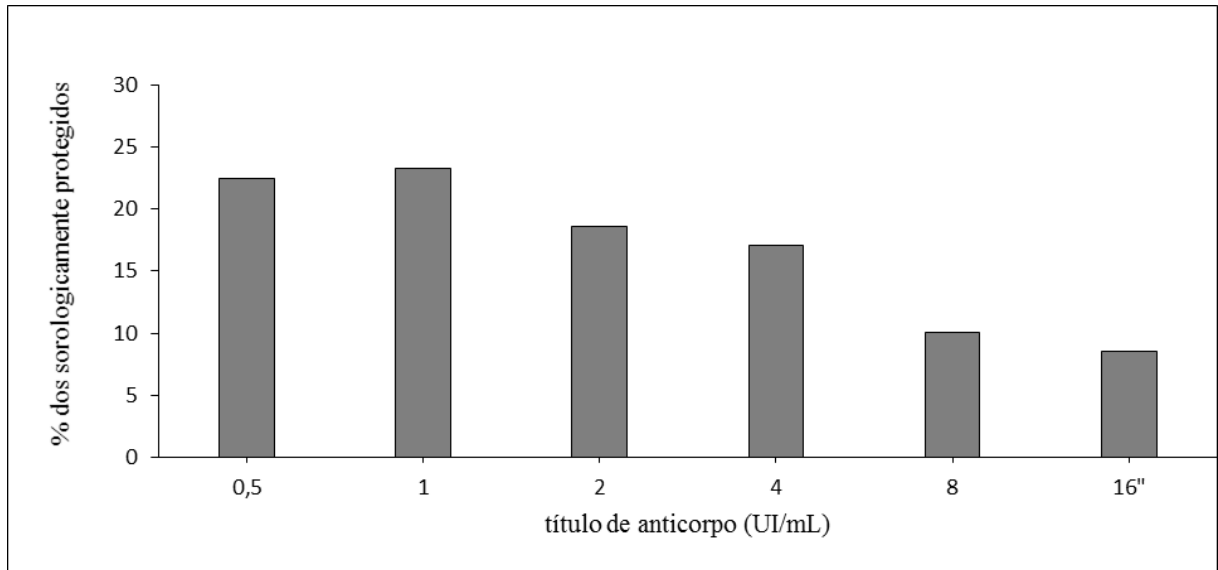


Figura 4 – Distribuição da frequência dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o RabV em 127 amostras de soro canino com títulos de anticorpos protetivos no grupo de animais com histórico de vacinação desconhecido (igual ou superior a 0,5 UI/ml). “= títulos de anticorpos maior ou igual a 16 UI/mL

Tabela 1 – Distribuição dos animais por sexo, média de idade, média do número de vacinações prévias e a média de tempo após a última vacinação de todos os animais incluídos no estudo (geral) ou agrupados conforme título de anticorpos contra o RabV.

	sexo (%)		média da idade (anos)	média do n° de vacinações prévias	tempo médio após a última vacinação (anos)
	macho	fêmea			
geral ^a	45,6	54,3	5,8	3,8	1,0
≥0,5 UI/mL ^b	46,4	53,5	6,5	4,2	1,0
<0,5 UI/mL ^c	43,8	56,1	4,3	2,7	1,1

^a Valores referentes aos 440 animais estudados; b: dados referentes aos 330 animais com título de anticorpos igual ou maior que 0,5 UI/mL ; c: dados referentes aos 129 animais soronegativos ou com títulos de anticorpos menor que 0,5 UI/mL.

3. CONCLUSÃO

No grupo dos animais com histórico de vacinação antirrábica nos últimos dois anos, aproximadamente 30% dos animais não apresentam imunidade protetora. Visto que, destes animais, uma parcela considerável possuía apenas uma dose de vacina, o estabelecimento de um calendário de vacinação diferenciado para animais primovacinados deve ser considerado em campanhas de vacinação antirrábica.

No grupo que constituiu-se dos animais com histórico desconhecido de vacinação, 57,7% não apresentavam títulos indicativos de proteção contra a raiva, fica clara a necessidade de se ampliar as campanhas anuais de vacinação antirrábica, de forma a abranger um maior número de animais.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, H.B.C.R. ; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/35-2/artigo718.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2016.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Raiva**. 2016. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/raiva>>. Acesso em 08 set. 2016.
- CRMV-RS. Sanidade. Vigilância em Saúde imuniza animais contra raiva no centro da Capital. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Mai/Jun de 2013. Online. Disponível em: < <http://www.crmvrs.gov.br/info572.html> > Acesso em: 06 mai. 2016.
- HOOPER D.C. et al. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. **Journal of Virology**, v.72, p.3711–3719, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9557653>>. Acesso em: 13 out. 2016.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy**. 2014. Disponível em <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp/>>. Acesso em 20 set. 2015.
- INSTITUTO PASTEUR. **Manual Técnico do Instituto Pasteur**,n. 8, 2009. São Paulo.
- INSTITUTO PASTEUR. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/menu.htm>>. Acesso em 22 set. 2015.
- MAYR, A.; GUERREIRO, M. G. Vírus da raiva. In: **Virologia Veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 437, p.1972.
- MOORE, S. M.;HANLON, C. A. Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, p595, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2834733/>>. Acesso em: 22 set. 2015
- OIE. World Organisation for Animal Health. **Rabies Portal, 2016**.Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/rabies-portal/>>. Acesso em 28 ago 2016.
- OIE. World Organization for Animal Health. **Terrestrial Manual**. 2013. CHAPTER 2.1.13. RABIES NB: Section B adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2011; Section C adopted in May 2013.
- RIGO, L.et al. Titulação de anticorpos contra o vírus da raiva em cães, em Campo Grande, MS, na campanha antirrábica de 2003. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 553-555, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000600008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 out. 2016.

RODRIGUEZ, L. L. et al. *Rhabdoviridae*. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 2012, 2a, ed. Editora UFSM, Santa Maria, p.797-830.

SVS. Secretaria da Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Mapas. Raiva. 2016. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em: 08 mai. 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. **Notícias**, Santa Maria, 2016. Disponível em:< <http://coral.ufsm.br/midia/?p=30043>>. Acesso em: 15 set. 2016.

WHO, World Health Organization. **Rabies**. Disponível em: < <http://www.who.int/rabies>>. Acesso em: 13 set. 2016.

WHO, World Health Organization. **Expert committee on rabies**, 1992. World Health Organization Tech Rep v. 824, p.1-84.