

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

JAMILE OLIVEIRA LEAL

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS
PRODUZIDOS EM EQUINOS, APÓS IMUNIZAÇÃO COM UMA
VACINA ANTIRRÁBICA INATIVADA**

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

Dezembro – 2023

JAMILE OLIVEIRA LEAL

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS
PRODUZIDOS EM EQUINOS, APÓS IMUNIZAÇÃO COM UMA
VACINA ANTIRRÁBICA INATIVADA**

Bacharel em Medicina Veterinária
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2020

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito para aprovação na Atividade Qualificação, do Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Karina Silva da Cavalcante

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

Dezembro – 2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

CENTRO DE CIÊNCIAS, AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA**

**AValiação DA RESPOSTA DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS PRODUZIDOS EM
EQUINOS, APÓS IMUNIZAÇÃO COM UMA VACINA ANTIRRÁBICA INATIVADA**

Comissão Examinadora da Qualificação de Jamile Oliveira Leal

Aprovada em: 27 de dezembro de 2023



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

Dr. Robson Bahia Cerqueira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
Membro interno

Dra. Ângela Cristina de Oliveira Lima
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
Membro Externo

DEDICATÓRIA

Dedico a esse projeto de pesquisa primeiramente a Deus e a minha família, que sempre estiveram presentes direto ou indiretamente em todo o processo da minha formação. Aos meus amigos e colegas do HVETSaj que sempre me ajudaram e apoiaram, gratidão a minha coordenadora Profa. Dra. Ana Karina Silva Cavalcante por motivar sempre a seguir em frente. Dedico também a todos os que contribuíram de alguma maneira para a realização desde projeto de pós graduação.

LEAL, Jamile Oliveira. **Avaliação da resposta dos níveis de anticorpos produzidos em equinos, após imunização com uma vacina antirrábica inativada.**

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante

RESUMO

A raiva é uma doença que causa uma encefalite fatal, que acomete mamíferos inclusive o homem, gerando sérios prejuízos na saúde pública e na criação de animais do campo. O principal transmissor da raiva no ciclo rural é o morcego hematófago. A vacina é a principal estratégia de controle da raiva já que é uma enfermidade que não existe tratamento. Este trabalho teve o objetivo de avaliar as curvas de anticorpos vacinais por 1 ano como medida de estratégia de controle da raiva equina. Foram selecionados 10 equinos no dia D-0, todos os animais que foram vacinados, apresentavam boas condições de saúde e sorologia negativa para raiva com titulação $\leq 0,5$ UI/mL. Após isso os cavalos foram acompanhados por um período de 1 ano de coleta nos Dias D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360. Após a vacinação para determinar os níveis de anticorpos, para o acompanhamento sorológico foi realizado através do Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência nos dias D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360, para acompanhamento da titulação de anticorpos rábico. Assim como o exame físico avaliando os parâmetros de frequência cardíaca, respiratória, temperatura retal e motilidade intestinal. Após a vacinação antirrábica, os equinos apresentaram níveis de anticorpos que atingiram o pico em 21 dias, variando entre 1 e 128 UI/mL. Nos dias D+90, D+180, D+270 e D+360, os valores mínimos e máximos foram respectivamente: 2,0 UI/mL a 170,67 UI/mL, 0,5 UI/mL a 32 UI/mL, 0,5 UI/mL a 64 UI/mL e 1,33 UI/mL a 96 UI/mL. Esses resultados mostram uma resposta imunológica adequada e a manutenção dos níveis de anticorpos ao longo do tempo. As análises observacionais através de exames físicos indicaram que os animais apresentaram saúde e comportamento condizente com a espécie e condições de manejo para o estudo. Diante dos resultados sorológicos concluiu-se que a vacina comercial antirrábica inativada para herbívoros, manteve a imunidade protetora de um ano.

Palavras-Chave: Zoonose, equídeos, lissavirus, Morcego hematófago, letal.

LEAL, Jamile Oliveira. **Assessment of the response of antibody levels produced in horses, after immunization with an inactivated anti-rabies vaccine.**

Federal University of Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – Ba, 2023.

Advisor: Prof. Dr. Ana Karina da Silva Cavalcante

ABSTRACT

Rabies is a fatal encephalitis disease that affects mammals, including humans, and causes serious public health and livestock farming problems. The main transmitter of rabies in rural areas is the hematophagous bat. Vaccination is the main strategy for rabies control, as there is no treatment for this disease. This study aimed to evaluate the vaccine antibody curves for 1 year as a measure of equine rabies control strategy. Ten horses were selected on Day D-0, all of which were vaccinated, in good health conditions, and had negative serology for rabies with titration ≤ 0.5 IU/mL. The horses were then followed for a period of 1 year with sample collections on Days D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270, and D+360. After vaccination, antibody levels were determined through the Simplified Fluorescence Inhibition Microtest on Days D+21, D+90, D+180, D+270, and D+360 to monitor rabies antibody titration. Physical examinations were also performed to assess parameters such as heart rate, respiratory rate, rectal temperature, and intestinal motility. After rabies vaccination, the horses reached peak antibody levels within 21 days, ranging from 1 to 128 IU/mL. On Days D+90, D+180, D+270, and D+360, the minimum and maximum values were respectively: 2.0 IU/mL to 170.67 IU/mL, 0.5 IU/mL to 32 IU/mL, 0.5 IU/mL to 64 IU/mL, and 1.33 IU/mL to 96 IU/mL. These results demonstrate an adequate immune response and maintenance of antibody levels over time. Observational analyses through physical examinations indicated that the animals had health and behavior consistent with their species and management conditions for the study. Based on the serological results, it was concluded that the commercial inactivated rabies vaccine for herbivores maintained protective immunity for one year.

Keywords: Zoonosis, Equids, Lyssavirus, Blood-sucking bat, Lethal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do Rabies virus	15
Figura 2 – Ciclo de transmissão da raiva	17
Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental	32
Gráfico 1 – Curvas da titulação de anticorpos neutralizantes antirrábico em equinos nos tempos avaliados	43
Gráfico 2 – Curvas individuais dos títulos de anticorpos (UI/mL) de equinos fêmeas vacinados contra a raiva com uma dose de vacina comercial, obtidas pela técnica SFIMT	44
Gráfico 3 – Curvas individuais dos títulos de anticorpos (UI/mL) de equinos machos vacinados contra a raiva com uma dose de vacina comercial, obtidas pela técnica SFIMT	46

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Identificação dos animais do estudo.....	31
Tabela 1 – Médias \pm desvios padrão e análise estatística por ANOVA [†] , dos parâmetros fisiológicos dos equinos antes e após a aplicação da vacina. Médias gerais dos parâmetros	36
Tabela 2 – Médias e desvios padrão dos parâmetros encontrados no hemograma dos equinos antes e após a aplicação da vacina	39
Tabela 3 – Médias e desvios padrão dos parâmetros encontrados no leucograma dos equinos antes e após a aplicação da vacina	40
Tabela 4 – Médias e desvios padrão dos parâmetros encontrados no bioquímico dos equinos antes e após a aplicação da vacina	41
Tabela 5 – Médias da sorologia de equinos vacinados com vacina antirrábica, antes e depois da aplicação	42

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

BHK-21 – *Baby Hamster Kidney* (Rim de Hamster Bebê)

CCID – *Cell Culture Infectious Dose* (Dose Infecciosa em Cultura de Células)

CK – Creatinoquinase

CPK – creatinofosfoquinase

FBS – *Fetal bovine serum* (Soro fetal bovino)

FC – Frequência cardíaca

FR – Frequência respiratória

G – Glicoproteína

GGT – Gama-glutamilttransferase

IFD – Direct immuno fluorescence (Imunofluorescência direta)

IFNS – Interferon

IRF-3 – *Interferon Regulatory Factor 3* (Fator Regulador de Interferon 3)

JAK – Janus quinase

JAK-STAT – *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (Transdutor de sinal Janus quinase e ativador de transcrição)

L – Proteína de polimerase de RNA grande

M – Proteína de matriz

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mL – Mililitro

MEM – *modified Eagle's medium* (meio de Eagle's modificado)

N – Nucleoproteína

P – Fosfoproteína

PNCRH – Programa Nacional de Combate à Raiva dos Herbívoros

PV – Pasteur Vírus

pSTAT1 – stands for phosphorylated (fosforilado)

RIFFT – *Rapid fluorescent spot inhibition test* (Teste rápido de inibição de foco fluorescência)

RIG-I – *Retinoic acid-inducible gene I* (Gene I induzível por ácido retinóico)

ROS – *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativa a oxigênio)

RNA – Ácido Ribonucleico

RDW – *Red Cell distribution width* (Tamanho de distribuição das células vermelhas)

SFIMT – *Simplified Fluorescence Inhibition Microtest* (Técnica Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência)

SNC – Sistema Nervoso Central

TR – Temperatura retal

SARS-COV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome* (Coronavírus – 19)

STAT1 – *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1)

TGO – Transaminase oxalacética

TGP – Transaminase pirúvica

UI/mL – Unidades Internacionais/mL

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	ESTADO DA ARTE	15
3.1	CARACTERÍSTICAS DO AGENTE ETIOLÓGICO	15
3.2	EPIDEMIOLOGIA	16
3.3	DIAGNÓSTICO.....	19
3.4	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	23
3.5	PROFILAXIA.....	25
3.5.1	VACINA	25
3.6	RESPOSTA IMUNE	26
3.7	VACINA ANTIRRÁBICA	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	30
4.2	LOCAL DO ESTUDO	30
4.3	ANIMAIS	30
4.4	MANEJO DOS ANIMAIS	31
4.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
4.6	AMOSTRAS	32
4.7	VACINAÇÃO.....	33
4.8	AVALIAÇÃO CLÍNICA PRÉ E PÓS-VACINAÇÃO	33
4.9	EXAME SOROLÓGICO	34
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	36
5.1	PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS.....	36
5.2	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.....	38
5.3	PARÂMETROS SOROLÓGICOS	42
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença neurológica, causada pelo *Rabies vírus*, pertencente ao gênero *Lyssavirus* da família *Rhabdoviridae*, que leva a um quadro de encefalite fatal em mamíferos (LECOLLINET et al., 2019), e no Brasil, é transmitida principalmente pelo morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) (ROSA, 2023).

Sabe-se que o Brasil avançou em desmatamento e conseqüentemente, na falta de planejamento e estratégia em áreas destinadas à agricultura e pecuária, o que impactou em alterações de biomas intensificando o risco de surgimentos de doenças infecto contagiosas, incluindo a raiva. A modificação dos habitats naturais forçou os morcegos hematófagos a buscarem novos abrigos e fontes alimentares, aproximando-os de animais de produção e domésticos, aumentando a ocorrência e disseminação da doença (ALMEIDA, 2022; GOMES et al., 2010).

Apesar de ser pouco estudada em equinos, um estudo realizado por Pimentel et al. (2009), no Nordeste Brasileiro, de 159 casos avaliados, 49 (30,8%) estavam relacionados a enfermidades do sistema nervoso central, sendo a raiva confirmada em terceiro lugar, representando 24,4%, sendo a doença viral em equídeos mais importante na região, carecendo medidas profiláticas para essa espécie (OLIVEIRA et al., 2022).

Segundo os dados do IBGE (2014), a população de equídeos foi estimada em 5,45 milhões de cabeças e de asininos 950 mil cabeças distribuídas pelo país. O Brasil exporta para mercados como União Europeia, Vietnã, África do Sul e Hong Kong derivados e carnes desses animais. Segundo a ADAB (2016), os abatedouros devem ser habilitados e seguir todos os requisitos e cuidados relacionados ao bem-estar e sanidade animal, e os animais devem estar vacinados e em boa condição de saúde, para garantir a segurança e qualidade da carne.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 1966, por meio da Defesa Sanitária Animal, instituiu o PNCRH o Programa Nacional de Combate à Raiva dos Herbívoros, estabelece ações por meio de vacinações e ações estratégicas do controle populacional do *Desmodus rotundus*, o principal transmissor, em associações

a medidas profiláticas e de vigilância (BRASIL, 2009b).

No Brasil, a vacina antirrábica utilizada para animais domésticos é a vacina inativada. Ela estimula a produção de anticorpos protetores contra a raiva, garantindo a prevenção dessa doença. Para que essa resposta imune humoral seja efetiva, o indivíduo deve estar saudável para que o organismo produza anticorpos específicos contra os antígenos do vírus (ALBAS et al., 2005, JACKSON, 2011, MOORE; HANLON, 2010).

Pesquisas evidenciam em diversas espécies de animais que a principal proteção contra o vírus da raiva é a presença de anticorpos neutralizantes no soro (HOOPER, et al., 1998). Existem diferentes métodos para avaliar a resposta imune humoral á vacinação antirrábica, como o RFFIT ou teste de neutralização de vírus com anticorpos fluorescentes. Estes testes são amplamente utilizados in vitro para avaliação dos níveis de anticorpos neutralizantes do vírus rábicos pelos laboratórios (MOORE; HANLON, 2010). No Brasil tem sido utilizado o teste de simplificado da inibição da fluorescência (SFIMT) para detecção de anticorpos neutralizantes antirrábicos em animais para a verificação da eficácia da vacina (PASSOS; GERMANO; FEDULLO, 2002).

Atualmente as pesquisas sobre raiva em herbívoros são voltadas mais para a espécie bovina. Sendo assim este trabalho teve o foco em estudar a espécie equina, pois esta é empregada no trabalho em conjunto com o homem. Observa-se a importância de atualizações de protocolos vacinais, podendo contribuir para o controle e possível erradicação da doença, evitando impactos econômicos e sanitários no Brasil e no mundo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar sorologicamente a produção de anticorpos de uma vacina antirrábica inativada, em equinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

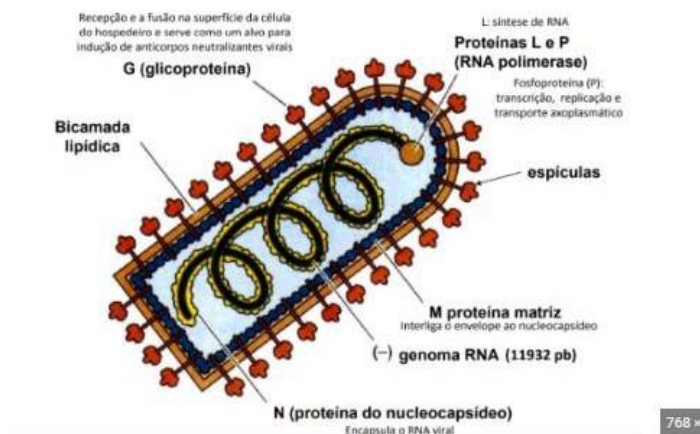
- Identificar a titulação de anticorpos IgG nos momentos D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360, por meio da técnica de Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência, durante um ano.
- Avaliar os parâmetros fisiológicos, hematológicos e bioquímicos dos animais antes e durante todo o experimento.

3 ESTADO DA ARTE

3.1 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE ETIOLÓGICO

A raiva é causada pelo *Rabies virus*, do gênero *Lyssavirus*, da família *Rhabdoviridae* e ordem *Mononegavirales* (JOHNSON et al., 2010), sua estrutura assemelha-se ao projétil de uma bala, variando de 100nm a 300nm de comprimento e 75nm de largura (BRASIL, 2009b). Segundo Fooks et al. (2017), a membrana plasmática apresenta-se homotrímeros da glicoproteína transmembrana tipo 1, que reveste o envelope viral, se assemelhando com um peplômeros (picos de proteínas), possui uma fita de RNA no sentido negativo de ~ 12kb codificando cinco proteínas virais: a nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e proteína de polimerase de RNA grande (L), como é possível observar na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura do *Rabies virus*.



Fonte: Adaptado de Abujamra (2020)

Dentre as proteínas, as glicoproteínas (G) estão em destaque por desempenhar funções importantes, incluindo a indução de anticorpos neutralizantes, a estimulação das células T, e a adsorção do vírus na célula do hospedeiro. Por outro lado, as nucleoproteínas (N), também desempenha um papel importante na resposta imune, agem como antígeno interno e grupo específico, desencadeando em uma resposta imune celular. A relação entre as proteínas N e G, na suspensão antigênica da vacina

é um indicativo da qualidade da vacina antirrábica (BRASIL, 2008; FERNANDES, 2001).

Por meio de testes laboratoriais realizados desde 1996, através de isolamento viral, foi descoberto que existem, na América, 5 variantes do vírus da raiva, Variante 2 do cão, isolado em humanos e animais silvestres, variante 3 *Desmodus rotundus*, também encontrada em outras espécies de morcego, animais urbanos, rurais, silvestres e humanos, variante 4 *Tadarida brasiliensis* isolada em animais de companhia e morcegos não hematófago, variante 5 semelhante a 2 porém encontrada em outros países, e a variante 6 *Lasiurus cinereus*, descoberta em morcegos insetívoros e outras espécies de animais (BRASIL, 2005).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

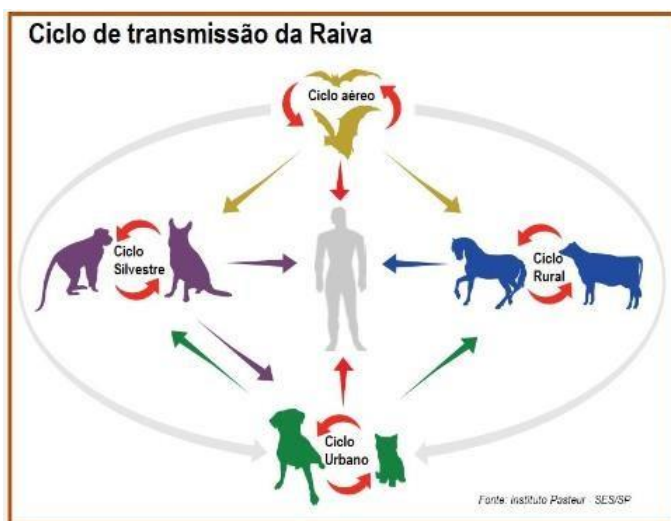
No Brasil a equinocultura é considerada um setor importante do agronegócio devido ser responsável por gerar uma renda de R\$ 6 bilhões anualmente por meio de criação, atividades e comercialização de cavalos, bem como da produção e vendas de produtos e subprodutos agropecuários. Além disso a equinocultura emprega 610 milhões de pessoas de forma direta e 2.430 milhões de forma indireta. Portanto, propiciando, em média, 3 milhões de ocupações no setor econômico, e sendo direcionado principalmente para o público urbano, vem ganhando destaque e crescimento na criação de cavalos, para as áreas de lazer e esporte; mas observa-se que esse animal requer maiores cuidados e investimentos com medicamentos, acessórios e ferragens (LIMA; CINTRA, 2016).

A Bahia ocupa o segundo lugar em cabeças de equinos, com aproximadamente 485.356 animais, e o primeiro lugar em relação aos asininos e muares, com um rebanho de pouco mais de 230 mil asininos e cerca de 260 mil muares. A regulamentação dos frigoríficos, para abater esses animais, pode movimentar o mercado agropecuário e gerar lucros com exportações de carne e produtos para a China o principal consumidor, como também ajudar a resolver problemas relacionados a animais errantes. Esses animais causam acidentes em rodovias e atuam como agentes disseminadores de doenças infecciosas e zoonoses (ADAB, 2016).

Estima-se que a raiva na América Latina cause prejuízos econômicos provocados pela morte de animais, além dos gastos indiretos com vacinação desses herbívoros e tratamentos de pós-exposição de pessoas que tiveram contato com animais suspeitos (BRASIL, 2009b). Os principais reservatórios do vírus da raiva são os morcegos hematófagos e os frugívoros, assim como os animais silvestres. A transmissão aos equídeos ocorre principalmente pela mordedura, inoculando o vírus contido na saliva do animal infectado. Os equídeos podem desenvolver sinais clínicos de forma silenciosa ou agressiva (BASILE, 2016).

A raiva é uma zoonose que tem a capacidade de se adaptar a diferentes espécies de mamíferos, além da sua ampla distribuição mundial, o que a torna uma doença endêmica para diversos países; no território Brasileiro o seu ciclo de transmissão pode ser classificado em rural, aéreo, silvestres e urbano, como observado na Figura 2. (TAKAOKA et al., 2000, KOTAIT et al., 2009).

Figura 2 – Ciclo de transmissão da raiva



Fonte: Adaptado de Freitas (2023).

No ciclo rural, o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) é o principal transmissor da raiva aos herbívoros domésticos de interesse econômico conhecidos como bovinos, caprinos, ovinos, equinos e suínos. Além de causar perdas econômicas à agropecuária, este ciclo como também o ciclo urbano apresenta risco a saúde pública, devido ao fato de poder ocorrer transmissão para humanos ao manipularem animais infectados principalmente cães e gatos (KOTAIT et al., 2009).

Segundo Brasil (2017), no ciclo silvestre, a circulação viral está subdividida em animais terrestres como raposa (*Dusicyon vetulus*), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), guaxinim (*Procyoncan crivorus*), saguis (*Callithrix sp.*), entre outras espécies, e o aéreo são os morcegos hematófagos e não hematófagos. Os quais podem manter o vírus rábico como reservatórios naturais, infectando um para outro, sendo estes hematófagos ou não, pois todas as espécies são vulneráveis a se infectarem pelo vírus.

Um estudo realizado por Pimentel et al. (2009), no Nordeste Brasileiro, avaliaram 159 casos, dos quais 49 (30,8%) estavam relacionados a enfermidades do sistema nervoso central, sendo a raiva confirmada em terceiro lugar, representando 24,4%, sendo a doença viral em equídeos mais importante. De acordo com os dados da Divep (2019), foram notificados na Bahia um total de 44.739 casos de raiva, sendo diagnosticados pelo Lacen, 26 casos de raiva animal: 13 bovinos, 2 equinos, 2 caprinos, 7 quirópteros não hematófagos, 2 raposas (cachorro-do-mato - *Cerdocyous thous*). Já a Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde que registrou entre 2010 e 2020, 39 casos de raiva humana. O Ministério da Agricultura e Pecuária registrou entre 2009 a 2019, 49.562 notificações de casos de raiva em 9 espécies de mamíferos dentre eles bovinos, equinos, cães e gatos (CFMV, 2020).

O crescimento da raiva no país é influenciado pelo aumento da criação de herbívoros, que está relacionado ao desmatamento, construção de estradas e hidrelétricas. Essas atividades humanas modificaram o habitat natural dos morcegos, forçando-os a buscar novas fontes de alimento e abrigos artificiais, como casas, túneis e bueiros. Essa mudança no ambiente favorece o contato entre os morcegos e os animais domésticos, aumentando o risco de transmissão da raiva (BRASIL, 2022a).

Os casos de raiva bovina estão em destaque por serem mais documentados, uma vez que o gado é um importante animal de produção, no entanto, é importante ressaltar que os cavalos também têm sido afetados pela raiva. Esses animais, que desempenham um papel significativo em atividades como transporte, esporte e lazer, também estão sujeitos à infecção pelo vírus da raiva. Portanto, torna-se necessário implementar medidas de vigilância e controle da raiva nessa espécie (ANDRADE et al., 2020).

3.3 DIAGNÓSTICO

Os equinos que forem a óbito com sinais neurológicos, as amostras devem ser encaminhadas para laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2008). Nessa espécie, deve-se coletar o encéfalo e a medula espinhal, de preferência fragmentos da região do córtex, cerebelo, hipocampo, bulbo e porções iniciais, medial e terminal da medula espinhal (BRASIL, 2009b; WHO, 2018). O material coletado deve ser encaminhado para o laboratório refrigerado em até 24 horas preferencialmente, caso na falta de condições adequadas para refrigerar, devem-se conservar as amostras em solução salina a 50%, em recipiente de paredes rígidas e hermeticamente fechado (BRASIL, 2014).

As principais técnicas realizadas *post mortem* para o diagnóstico da raiva são a histológica pela coloração de Sellers, a imunofluorescência direta (IFD), isolamento do vírus rábico em camundongos e o isolamento do vírus rábico em cultivo celular. (CHAVES, 2010; LIMA, GAGLIARI, 2014). Kotait et al. (2009) relataram que ao ser encontrado o corpúsculo de Negri pela técnica histológica de coloração de Seller, essa inclusão intracitoplasmática é patognomônica da raiva, devido à formação de ribonucleoproteínas das partículas virais em maturação; um grande entrave dessa técnica, é que ela apresenta um baixo grau de sensibilidade e também depende da experiência do observador. O teste padrão ouro para o diagnóstico da raiva é o IFD, uma técnica que se baseia no uso de anticorpos fluorescentes marcados com isotiocinato de fluoresceína (conjugado antirrábico), em que o fragmento do tecido nervoso é previamente tratado com o conjugado antirrábico e exposto à luz ultravioleta. Esse teste consiste na reação sorológica para detectar a ligação antígeno-anticorpo, que emite uma luz esverdeada fluorescente, sendo um método rápido que apresenta alta especificidade e sensibilidade, porém ocorre perda de acurácia se o tecido estiver em processo de autólise (BRASIL, 2008).

Outra técnica utilizada para isolamento viral é a inoculação do vírus intracerebral em camundongos suíços. É uma técnica que o período de incubação do vírus leva de 7 a 21 dias, é considerada uma prova eficaz para detecção do vírus da raiva, porém é uma prova de alto custo e manutenção dos animais (WEBSTER; DAWSON, 1935).

O diagnóstico da raiva *ante mortem* inclui técnicas para detecção de anticorpos

antirrábico no soro ou técnicas moleculares. Utilizando técnicas como IFD, isolamento viral em camundongos ou culturas celulares, a técnica de Transcriptase Reversa em cadeia da Polimerase (RT-PCR) e a Soroneutralização (SN). Vale ressaltar que resultados não reagentes em indivíduos com suspeita da doença não exclui a possibilidade de falso negativo (KOTAIT et al., 2009).

Na clínica médica equina, o hemograma, leucograma e os exames bioquímicos são considerados exames complementares essenciais para o diagnóstico de enfermidades (KANEKO,1997). Esses exames desempenham um papel crucial ao fornecer informações sobre a condição de saúde do animal. É fundamental garantir que o indivíduo esteja em boas condições de saúde antes de receber uma vacina, pois isso permite um funcionamento eficaz do sistema imunológico (GASPAR, 2016). Dessa forma a sorologia é utilizada para avaliar a soroconversão vacinal em animais e humanos tanto domésticos antes de viagens internacionais, como durante pesquisas de vacinação de animais domésticos ou silvestres, buscando-se assim dados epidemiológicos sobre sua eficácia. No entanto, esta técnica não é muito útil em hospedeiros com sinais clínicos, pois morrem antes de desenvolverem os anticorpos (DAY et al., 2020, OIE, 2018, SERVAT et al., 2006).

Neste sentido, durante a década de 70, o teste de neutralização em camundongos *in vitro* para a demonstração de anticorpos rábicos, foi substituído pelo teste de Inibição de Foco Fluorescente (RIFFT), devido ao custo pela necessidade do uso de camundongos, demora de resultados e questões éticas com os animais (SMITH et al., 1973). Para superar essas dificuldades o RIFFT foi desenvolvido com a capacidade de ser mais rápido executado e apresentar melhores resultados através da avaliação de anticorpos neutralizantes rábico a partir de células *in vitro* de BHK-21(*Baby Hamster Kidney*) (FAVORETTO, 1993; SMITH; YAGER; BAER, 1973).

Zalan e colaboradores (1979) desenvolveram a técnica de Microteste de Inibição de Fluorescência (FIMT) como uma melhoria em relação à técnica anteriormente utilizada, conhecida como RIFFT. Esta era limitada devido ao uso de lâminas de 8 poços, o que reduzia a quantidade de amostras de soro que poderiam ser testadas e dificultava a automação do processo. Por outro lado, a FIMT permite a análise de um grande número de amostras de soro com melhor eficiência.

Favoretto et al. (1993), baseados no teste FIMT, desenvolveram um teste semelhante, chamado de Teste Simplificado de Inibição de Focos Fluorescentes (SFMIT), que possibilita a avaliação de maior quantidade de soro, de fácil execução e leitura, boa sensibilidade e especificidade e avaliação quantitativa na titulação de anticorpos neutralizantes antirrábicos. Segundo Batista et al. (2011), esse teste é comumente usado no Brasil pela sua fácil execução e resultados equivalentes ao RIFFT para monitoramento vacinal em humanos e animais.

A técnica do SFMIT é realizada em microplacas de cultura celular de 96 poços. As amostras de soro devem ser inativadas a 56°C durante 30 minutos. Isso é feito para garantir que qualquer vírus presente no soro seja inativado antes do teste.

O soro padrão é uma imunoglobulina humana antirrábica diluída para conter 0,5 UI/mL, calibrado usando o segundo soro de referência internacional, que contém 30 UI/mL. Essa calibração é importante para garantir a precisão dos resultados.

O controle positivo é uma mistura de vários soros que contêm uma quantidade conhecida de anticorpos antirrábicos. O controle negativo é uma mistura de soros de indivíduos não vacinados, que contêm uma quantidade muito baixa de anticorpos (<0,08 UI/mL).

São preparadas seis diluições de soro (padrão, amostra de teste, controle) em uma diluição serial 2 vezes. Essas diluições são feitas adicionando 20 µ de soro a 180 µ de MEM/10% FBS com 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina). A diluição começa em 1:10 no primeiro poço e é transferida para o segundo poço sucessivamente até o último poço. Os 100 µ finais são descartados.

O vírus é armazenado em microtubos de 1mL a -80°C. Um tubo é descongelado rapidamente em água fria corrente e colocado em gelo derretido. Em seguida, adiciona-se 50 microlitros da suspensão de vírus previamente diluído em CCID 100 em cada poço.

Para controle do vírus no ensaio, faz-se uma diluição do vírus de trabalho em quatro poços da microplaca, adicionando 50 µ de MEM/10% FBS nos 4 poços, 100 µ da suspensão de vírus no primeiro poço, 50 µ da suspensão de vírus no segundo e terceiro poço, e transfere-se 50 µ da mistura do terceiro poço para o quarto poço,

descartando os últimos 50 µ. Em seguida, adiciona-se 50 µ de MEM/10% FBS no segundo poço e 100 µ de MEM/10% FBS no terceiro e quarto poço.

A microplaca é incubada durante 1 hora a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação, adiciona-se 50 µ de suspensão de células BHK-21 com células/mL (5x10⁶ células/poço) em cada poço. A microplaca é incubada durante 24 horas a 37°C com 5% de CO₂.

Após 24 horas de incubação, Antes da fixação celular, o meio de cultura deve ser aspirado com uma agulha. As microplacas devem ser resfriadas e as células fixadas com acetona a 80% com água fria e ficar em imersão sobre gelo, por 15 minutos. Esvazia-se e seca-se as placas a 37°C, os conjugados devem ser diluídos em 1:5 a 1:640 em tampão PBS de pH 7,4 com corante de Azul Evans e transferidos 40 µL/poço de cada diluição em 16 poços das microplacas, metade com células infectadas PV e metade de células não infectadas, após secar as placas adiciona-se o 40µL de glicerina tamponada (pH 8,5).

A leitura dos resultados é realizada em um microscópio de fluorescência invertido com aumento de 100x. O título sérico é a diluição com redução de 50% da infecção nas células, ou 50% de redução de fluorescência. A conversão do título da diluição 50% do soro diluído no título UI/mL é realizada utilizando a fórmula específica a seguir (BRASIL, 2008; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2018).

$$\text{Título do soro} = \frac{\text{título do soro padrão (UI/mL)} \times 10^{(\log \text{ da diluição do soro } 50\%)}}{10^{(\log \text{ da diluição do padrão } 50\%)}}$$

Nos equinos com suspeita de raiva, em que o diagnóstico for negativo, devem-se traçar diagnósticos diferenciais para outras doenças que causem encefalites, tais como as causadas pelos vírus alfavírus (encefalites equinas) e flavivírus (febre do Nilo Ocidental), tétano, botulismo, neurite da cauda equina, mielite segmentar equina ou intoxicação por plantas hepatotóxicas como *Echium plantagineum* L., conhecida como senecio ssp, “maria-mole”, flor-das-almas (FERNANDES, 2001; KOTAIT et al., 2009, SMITH; CLAIRE, 1972).

3.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A transmissão da raiva ocorre quando um mamífero inocula saliva infectada em um outro mamífero sadio, sendo a principal via de transmissão através de arranhadura ou mordedura (PINHEIRO, 2020). Segundo Sazima (1978), foi observado que os morcegos hematófagos atacam os equinos em região da escápula, cabeça e pescoço, devido a maior facilidade do morcego ficar preso na crina. A mordedura do *D. rotundus* apresenta um formato circular ou elíptico de aproximadamente 3 a 6mm de comprimento.

A replicação viral se inicia quando a proteína G do vírus liga-se com o receptor celular presente na membrana celular do hospedeiro, após o reconhecimento e adesão o vírus por endocitose entra no citoplasma da célula do hospedeiro, o qual tem tropismo por células do tecido nervoso (BRASIL, 2009b). O vírus ao ser endocitado libera ribonucleocapsídeo no interior citoplasmático, a proteína L viral (RNA - polimerase RNA viral dependente) realiza a transcrição do RNA mensageiro (ciclo de transcrição primária) promovendo a codificação das 5 proteínas virais N, P, M, G e L, e os novos genomas que são encapsidados e a nível das membranas celulares, são liberados por brotamento (BRASIL, 2020; FERNANDES, 2001). A disseminação viral se inicia nas células musculares quando as glicoproteínas virais se ligam nas junções neuromusculares, especificamente, ao receptor nicotínico da acetilcolina. Atingindo assim, os nervos periféricos, seguindo um trajeto centrípeto em direção ao (SNC) sistema nervoso central. A migração viral axoplasmático retrógrado é de célula a célula. A velocidade do genoma viral em direção ao SNC é de aproximadamente 25 a 50mm por dia (BRASIL, 2008). O vírus se replica e migra do SNC pelos nervos periféricos e autônomos em sentido para vários órgãos como bexiga, pulmão, coração, testículo, rim, útero, folículo piloso dentre outros e nas glândulas salivares, liberando o vírus através da excreção salivar, sendo a principal forma de disseminação e perpetuação da doença para outro animal e natureza (KOTAIT et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2007).

O vírus rábico, ao penetrar nos neurônios, fica protegido pela bainha de mielina, burlando a ação dos anticorpos e resposta imune do hospedeiro. Após atingir o SNC, a estimulação dos linfócitos B para a produção de anticorpos só vai ocorrer tardiamente, após o aparecimento dos sinais clínicos, devido ao agravamento da

proliferação viral o organismo não consegue mais debelar a infecção devido ao vírus já ter atingido todo sistema nervoso (TAKAOKA et al., 2000; KOTAIT; CARRIERI, 2004). Segundo Brasil (2009b), a intensa multiplicação dos vírus no interior dos neurônios leva a formação do corpúsculo de inclusão fazendo com que as células nervosas alterem a sua funcionalidade, com isso comprometendo o sistema límbico, resultando em alterações comportamentais.

O período de incubação é bastante variável, pois está relacionado ao local, profundidade e extensão da lesão, patogenicidade e carga viral do inóculo inicial. O local da mordida também interfere, pois quanto mais próximo do SNC, o período de incubação é menor (BRASIL, 2009a; FAN et al., 2022). A faixa de tempo para o período de incubação após a infecção para cada espécie animal é variável, podendo ocorrer entre 15 dias a 4 meses, exceto para os quirópteros, cujo o período pode ser prolongado (BRASIL, 2019). A média estimada para o período de incubação para os equinos varia de 2 a 9 semanas (SOUZA, 2019).

Em equinos, os sinais clínicos são variáveis uma vez que estão relacionados com o local da lesão em região do hipocampo, tronco cerebral e medula. A raiva pode cursar em uma forma paralítica, quando as lesões estão associadas no tronco encefálico e medula espinhal ou na forma furiosa, em que a lesão se encontra no sistema SNC, mais comumente em carnívoros (FERNANDES, 2001; LIMA et al., 2005).

Segundo Kotait e colaboradores (1998), os sinais clínicos apresentados nos equinos normalmente são: prurido intenso no local da mordida devido à penetração do vírus, intranquilidade, apetite depravado, retroversão patológica dos lábios, andar cambaleante, incoordenação motora. A forma furiosa observa-se sinais clínicos como morder, escoicear, se tornando arriscado o manejo. Já Green et al., (1992) relataram que na forma paralítica é caracterizada por paralisia progressiva com sinais clínicos de dificuldade de deglutir devido a paralisia do músculo masseter e da garganta, sialorreia, cólica, ataxia, incoordenação, perda do tônus da cauda e do esfíncter anal, decúbito e paresia de membros posteriores

Com a evolução da doença, o estágio em que o animal evolui para o decúbito não conseguindo mais se levantar, ocorrendo movimentos de pedalar, dispneia, opstótono, asfixia e morte, que geralmente acontece de 3 a 6 dias após o início dos

sinais clínicos, em alguns casos prolongando para 10 dias. O animal com raiva apresenta um prognóstico ruim, devendo isolar o animal, esperar sua morte ou fazer a eutanásia na fase agônica (BRASIL, 2022b).

3.5 RESPOSTA IMUNE

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra infecções virais levando à produção de interferons, citocinas inflamatórias e quimiocinas, além da ativação de processos como autofagia e apoptose para impedir a replicação viral. No caso específico do vírus da raiva, quando ele entra no organismo através de mordidas ou arranhões, ele consegue escapar dessa resposta, permitindo sua replicação e invasão do sistema nervoso central. Uma vez lá, o vírus não pode ser eliminado pelo sistema imunológico devido a mecanismos de escapes através de bloqueios pelas proteínas virais que inibe a geração de IFN e citocinas pró inflamatórias (ZHANG et al., 2022).

As micróglia são as principais células de defesa do sistema nervoso central (SNC), sendo denominadas células sentinelas. Elas desempenham um papel essencial ao apresentarem antígenos e estimularem a produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico (NO) no combate às infecções (RANSOHOFF; BROWN, 2012). Para combater a infecção, o organismo utiliza citocinas como a IL-12 e o TNF- α , produzidos por células apresentadoras de antígenos, que desempenham um papel essencial na regulação da resposta imune contra patógenos. A IL-12 ativa as células *natural killer* (NK) para produzirem IFN- γ , que contribui para o desenvolvimento da imunidade adquirida. Além disso, promove a diferenciação de células produtoras de IFN- γ e aumenta a produção dessa citocina por células já diferenciadas (ROBINSON et al., 1997; TRINCHIERI, 1995).

O vírus desenvolveu mecanismos para neutralizar a resposta imunológica. A proteína P do vírus da raiva tem a capacidade de reduzir a translocação nuclear de STAT1 e, portanto, inibir o IFN. Diferentes cepas do vírus apresentam diferentes níveis de eficiência na inibição da sinalização do IFN (ITO et al., 2010). Inicialmente, a proteína M interage com o JAK1 e impede sua fosforilação, o que interfere na sinalização do receptor de interferon (IFNAR) para o fator de transcrição STAT1. Isso resulta na inibição da resposta imune mediada pelo IFN. No entanto, quando as células infectadas são estimuladas pelo IFN, a proteína M muda sua interação e passa a

interação com o pSTAT1 (STAT1 fosforilado) melhorando a estabilidade da proteína M no citoplasma e sinalização pelo complexo JAK- STAT bloqueando a sinalização para a produção de citocinas (SONTHONNAX et al., 2019). Masatani et al. (2013) realizaram um estudo que a proteína N responsável por encapsula o RNA viral, contribui para a propagação e disseminação eficiente do vírus nas células do hospedeiro, pois impede a ativação da via IRF-3 mediada pelo RIG-I, inibindo a produção de IFNs.

No início, acreditava-se que os sintomas clínicos da raiva eram resultados da morte em massa de células neurais. No entanto, estudos experimentais demonstraram que apenas as cepas de baixa patogenicidade têm a capacidade de induzir a apoptose neuronal (ZHANG et al., 2022). Estudos descobriram que a infecção pelo vírus da raiva reduz o nível de ATP e altera o estado de oxidação-redução das células (FERNANDES et al., 2011; LI et al., 2005). A raiva pode causar danos neuronais graves devido à interação entre a proteína P do vírus e o complexo mitocondrial I. A produção aumentada de óxido nítrico por neurônios e macrófagos contribui para a disfunção mitocondrial e o inchaço axonal (FU et al., 2005; HOOPER et al., 1995; JACKSON et al., 2010; SHIN et al., 2004). Apesar do organismo não produzir anticorpos no estágio inicial da infecção, os vírus são sensíveis a anticorpos exógenos ou aos previamente produzidos por vacinação.

3.6 PROFILAXIA

De acordo com Brasil (2022b), a legislação da normativa nº 5, de 1º de março de 2002, instrui que os herbívoros devem ser vacinados com vacina antirrábica com vírus inativado na dosagem 2mL por animal, independentemente da idade, através de vias subcutânea ou intramuscular de acordo com a espécie.

A vacinação é a forma mais adequada de prevenção da raiva, uma vez que não há tratamento para a doença (ACHA; SZYFRES, 1986). Além disso soluções eficazes para o controle da raiva é obtidas através do controle das populações de morcegos hematófagos, segundo Batista et al. (2007), é baseado na estratégia de aplicação de

uma pasta contendo uma substância anticoagulante. Essa pasta é aplicada topicamente em morcegos capturados, que são posteriormente liberados para retornar à sua colônia. Devido ao hábito de limpeza mútua, especialmente entre as fêmeas, o anticoagulante aplicado resulta na eliminação de vários indivíduos na colônia. Diminuindo assim a chance dos animais serem atacados por morcegos.

3.6.1 Vacina antirrábica

Várias vacinas antirrábicas comerciais de cultivo inativo são indicadas para a profilaxia em equinos. Essas vacinas estimulam boas respostas imunológicas resultando no desenvolvimento de anticorpos e na resposta sorológicas, detectando anticorpos neutralizantes específicos. Geralmente, apenas uma dose é necessária, e sua eficácia dura de 12 a 14 meses. O cronograma de vacinação deve ser realizado por um médico veterinário, podendo ser seguidas as seguintes recomendações: cavalo não vacinado dose única e revacinar anualmente, vacinados revacinar anualmente, égua prenha vacinar antes da cruza ou 4-6 semanas antes de parir, potros vacinas a partir dos 4-6 meses e depois anualmente, porém potro com égua imunizadas primeira dose com 4-6 meses e após 4-6 semanas, a segunda dose e reforço anual, devido aos anticorpos maternos terem potencial de interferência na resposta vacinal (AAEP, 2020).

Com a evolução dos programas nacionais de controle da raiva bovina na América Latina e a regulamentação anualmente da vacinação antirrábica em rebanhos bovinos, a raiva em equinos começou a se destacar, em consequência da baixa taxa de vacinação dessa espécie, o que os tornam vulneráveis a doença. Portanto se tornando necessário a imunização dos animais para protegê-los contra a raiva. (SOUZA, 2019).

De acordo com o Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (2009), a raiva é uma enfermidade que não possui tratamento. Se um o animal apresentar sinais clínicos neurológicos, ele deverá ser isolado e aguardar sua morte na fase agônica ou ser eutanasiados. É de responsabilidade o proprietário notificar imediatamente ao Serviço Veterinário Oficial, pois a raiva é uma doença de notificação obrigatória. A falta de notificação coloca em risco a vida da população e a saúde dos rebanhos.

As vacinas virais podem ser classificadas em atenuadas e inativas, que é o caso da vacina antirrábica e subunidades. As vacinas atenuadas contêm agentes infecciosos vivos enfraquecidos, já inativas ou subunidades usam agentes mortos ou apenas partículas dele (FIOCRUZ, 2022).

As células apresentadoras dos antígenos como macrófagos, células dendríticas, células de Langherans etc. quando tem contato com o vírus da raiva elas o fagocitam, processam e apresentam ao sistema imune. Esse reconhecimento pelo órgão linfoide pelos linfócitos T e B. Levam a produção de linfócitos B em sequência a produção de anticorpos específico, ou seja, a imunidade humoral contra o antígeno já os linfócitos T a produção de células de memória (BRASIL, 2014; TAKAOKA et al., 2000).

A proteína G viral da raiva é um dos antígenos que induz a resposta aos linfócitos T citotóxicos. Estas células se diferenciam em dois tipos celulares com respostas distintas. As células TCD4 geram células de memórias, populações duradoras capazes responder melhor ao antígeno quando ocorrer um segundo contato. Porém, para que isso ocorra, é necessário que as células TCD4 virgem sejam apresentadas pelas (PACs) células apresentadoras de antígeno para a expressão dos complexos peptídicos de (MHCII) aos receptores de células T principalmente o fator de necrose tumoral (TNFRSF) o qual modula respostas de células virgem para função efetora garantindo assim a geração de células de memória (JANEWAY, 2001; WITHERS, MARRIOTT, 2016).

As células TCD8 requer na maioria das vezes para serem ativadas sinais coestimulatórios principalmente das células TCD4. Para sua função efetora as células TCD8 reconhecem as moléculas de antígeno através do (MHCI). Quando ativadas matam as células alvos principalmente por apoptose. Um mecanismo importante são as liberações de grânulos citotóxicos ou pela citocina IFN- γ que inibe a replicação viral enquanto crescente a expressão de MHCI aumentando a chance de eliminação de um reconhecimento da célula infectada (ATOR, 2019). Porém infelizmente em um hospedeiro o qual não foi vacinado o sistema imunológico não tem a capacidade de eliminar o vírus no início da infecção só sendo produzidos anticorpos neutralizantes quando a doença já adquiriu sua forma irreversível (KOTAIT et al, 2009). Segundo Kotait et al. (1998), relataram que Pasteur, em 1885 conseguiu isolar o vírus em laboratório através de inoculação do vírus em medula espinhais de coelhos e realizar

o primeiro tratamento do vírus parcialmente inativado, o objetivo passou a ser o desenvolvimento de vacinas mais seguras.

A vacina antirrábica, do tipo inativada, estimula a produção de anticorpos específicos, que podem durar meses ou anos. Essa resposta imunológica é resultado da ativação dos linfócitos TH2, que estimulam os linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos e produzirem imunoglobulinas, como a IgM e posteriormente a IgG. Essa resposta, que ocorre em média de 5 a 14 dias, cria uma memória imunológica que permite uma resposta mais rápida e eficiente em um possível contato futuro com o vírus (BRASIL, 2014; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). As vacinas são importantes ferramentas contra doenças infecciosas, e principalmente da raiva que é uma doença infecciosa e letal, auxiliando na proteção de animais e na manutenção da sanidade de rebanhos e segurança a saúde única (GERSHWIN, 1998). São reconhecidas ferramentas de maior sucesso na proteção da saúde pública (ZEPP, 2010; ALMEIDA, 2022).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O experimento foi realizado na fazenda experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizada no município de Cruz das Almas – Bahia. De acordo com dados do IBGE, (2020), a cidade está situada no território de identidade Recôncavo, com regiões geográficas de latitude 12° 39' 11" Sul e longitude 39° 7' 19" Oeste. Sua população é de 63.591 habitantes, e sua área total é de 139.117 km². Conforme informações do SEI – BA (2010), o clima na região é caracterizado como tropical quente e úmido, com temperaturas médias em torno de 25°C. As chuvas são mais frequentes durante os períodos de outono e inverno, com uma média anual de precipitação de 2 mil milímetros. O estudo teve a duração de 1 ano.

4.3 ANIMAIS

Foram selecionados no total de 10 equinos (*Equidae equus*); mestiços, em boas condições de saúde, não vacinados para raiva, divididos em 5 machos e 5 fêmeas com idade \geq a 3 meses (Quadro 1). Para isso os animais foram pesados, identificados e passaram pela avaliação clínica. Também foi realizada colheita de sangue para análise de hemograma, bioquímico (ALT (TGP), AST (TGO), Fosfatase Alcalina, Uréia, creatinina, Albumina, CPK (CK) e GGT (Gamaglutamiltransferase)) e sorologia para raiva, com resultados negativos e titulação de anticorpos vacinais \leq 0,5 UI/mL no dia D-21. Após o término do estudo os animais permanecerem em seu ambiente de rotina nas instalações da Universidade.

Quadro 1 – Identificação dos animais do estudo.

Identificação	Animal	Sexo	Idade
08	1	F	6m
09	2	F	6m
12	3	F	12m
14	4	F	6m
18	5	F	6m
02	1	M	6m
03	2	M	6m
05	3	M	6m
13	4	M	6m
16	5	M	6m

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

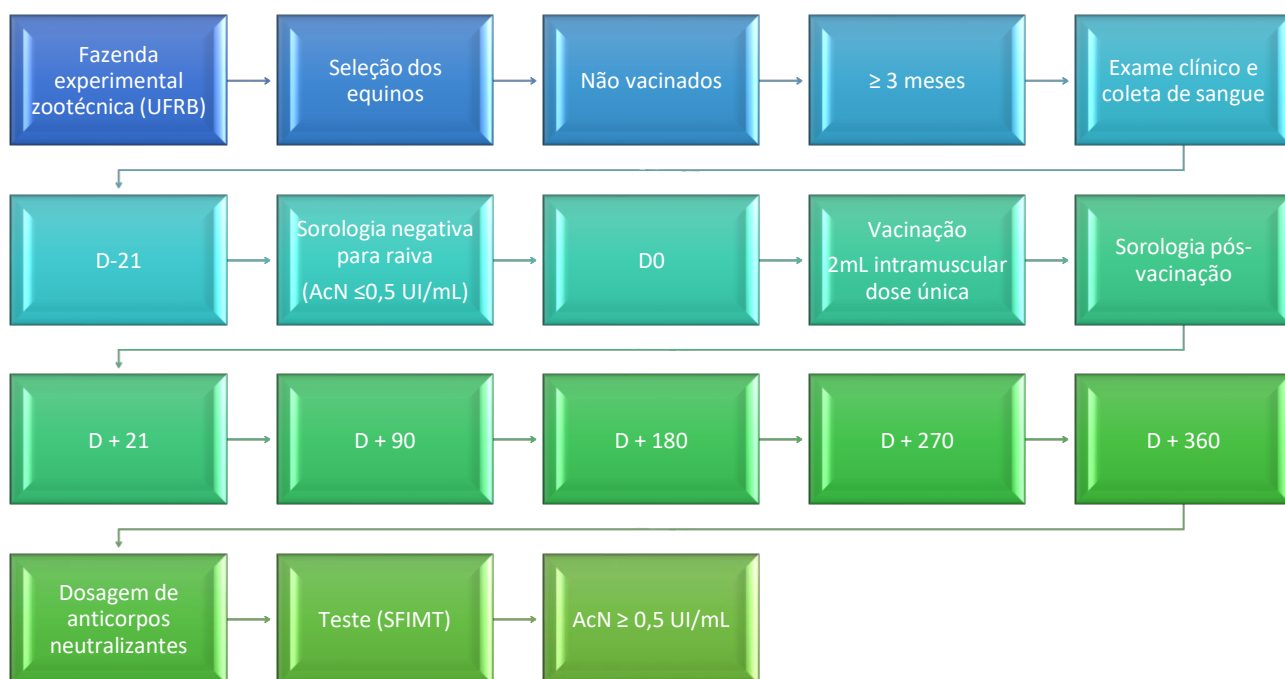
4.4 MANEJO DOS ANIMAIS

O período do experimento foi do dia D-21 ao D+360. Durante todo o período experimental, os cavalos foram mantidos em seu ambiente habitual de pastoreio. Para a realização das avaliações, os animais foram conduzidos com cabresto de nylon até um curral de alvenaria e madeira, com uma área total de 60m² (30m x 30m) e mantidos em tronco de contenção de 250cm altura x 220cm. comprimento x 90cm largura, para coleta das amostras foi realizada na veia jugular e administração da vacina intramuscular na base do pescoço utilizando agulha 40mm x 8mm, e limpeza local com álcool 70 %, e posteriormente soltos no pasto. Durante todo o experimento, os cavalos foram monitorados e gerenciados de acordo com as diretrizes de bem-estar animal e condições do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, assegurando livre de desconforto, ferimentos, dor, doenças, liberdade de expressar comportamento normal, medo e angústia (CONCEA, 2016).

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para melhor entendimento das atividades do experimento, elaborou-se um fluxograma das atividades, descritas a seguir, na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental.



4.6 AMOSTRAS

Os equinos utilizados no experimento foram animais da fazenda experimental da UFRB, sendo selecionados 5 fêmeas e 5 machos com idade ≥ 3 meses, não vacinados, identificados por número e sexo. Para uma melhor avaliação da condição de saúde dos animais, foi realizada a coleta de sangue de cada animal através da venopunção da veia jugular. Antes da coleta, foi realizada uma tricotomia no local e feita a assepsia com álcool etílico 70%. Utilizou-se uma agulha 25x0,8 para colheita a vácuo em tubos estéreis sem anticoagulante, sendo coletados 3 mL de sangue de cada animal para os exames sorológicos e bioquímicos. Além disso, foi utilizado um tubo com EDTA para a coleta de 2 mL de sangue para o hemograma. Esses exames hematológicos foram realizados tanto antes quanto depois da vacinação, a fim de assegurar que os equinos não apresentavam possíveis patologias.

Foi feita a triagem dos animais, no dia D-21, após o exame clínico, foram coletadas amostras de sangue de todos os animais, sendo escolhido 10 animais dentre os que estavam com titulações AcN $\leq 0,5$ UI/mL (negativa para raiva). No dia D0 os animais foram vacinados por via intramuscular 2mL com dose única. Foi feita sorologia pós-vacinação para acompanhamento dos níveis de anticorpos rábicos nos dias D+21, D+90, D+180, D+270, D+360.

A dosagem de anticorpos neutralizantes foi realizada pelo teste SFIMT, todos os animais tiveram títulos de anticorpos AcN $\geq 0,5$ UI/mL. Os animais foram mantidos sempre no local de origem e disponibilidade de alimentados como de rotina, com disponibilidade de alimentação da fazenda experimental - UFRB em regime semiextensivo com pastagens variadas de capim tanzânia e braquiária, durante todo o experimento que durou um ano.

4.7 VACINA

Utilizou-se a vacina antirrábica inativada para herbívoros, feita a partir de suspensão do vírus rábico inativado pela Etilenimina Binária (BEI), utilizando uma cepa Pasteur de vírus fixo (PV), produzido em cultivo celular e adsorção pelo hidróxido de gel de alumínio, mantida entre 2° e 8°C, sem congelar. A dose administrada foi de 2mL por animal, pela via intramuscular, em uma única aplicação. A partida utilizada foi a de número 011/19, com apresentação em frasco de 50 mL e data de fabricação em julho de 2019.

4.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA PRÉ E PÓS-VACINAÇÃO

Um exame físico individual em cada cavalo foi realizado, incluindo a frequência cardíaca, respiratória, temperatura retal, linfonodos, sistema digestório, ocular dentre outros. Essas avaliações foram feitas em todos os equinos antes de coletar o sangue e depois também, nos seguintes dias D-21, D0, D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360. De acordo com os exames clínicos realizados, foram avaliados os seguintes parâmetros: a frequência cardíaca, medida em batimentos por minuto (bpm), foi obtida por ausculta com estetoscópio, durante um minuto. A frequência respiratória, medida

em movimentos por minuto (mpm), foi contada ao observar o número de movimentos torácicos e abdominais do animal em um minuto (FEITOSA, 2014).

Além disso, a ausculta abdominal foi utilizada para avaliar a frequência e os ruídos intestinais. Para isso, a região foi dividida em quatro quadrantes: dorsal direito e esquerdo, ventral direito e esquerdo, e cada ponto foi auscultado por 30 segundos. Os linfonodos palpáveis e avaliados foram mandibulares, retrofaríngeos, pré-escapulares e sub-ilíaco, além disso as mucosas foram avaliadas sua coloração e da cavidade oral realizou-se a avaliação do tempo de preenchimento capilar, sendo observadas as mucosas oculares e nasais, por fim, a temperatura retal foi aferida utilizando-se um termômetro digital. Dessa forma, todos esses parâmetros foram importantes para a avaliação do estado clínico do animal (MARTINS, 2022).

4.9 EXAME SOROLÓGICO

Para a amostra do exame sorológico, bioquímico e hemograma, foi realizada a coleta de sangue de cada animal através da venopunção da veia jugular. Antes da coleta, foi realizada uma tricotomia no local e feita a assepsia com álcool etílico 70%. Utilizou-se uma agulha 25x0,8mm para colheita a vácuo em tubos estéreis sem anticoagulante, sendo que as amostras destinadas aos exames bioquímicos e sorológicos foram colocadas em uma caixa de isopor contendo placas de gelo e transportadas até o laboratório. As amostras foram mantidas a uma temperatura de -20°C até a realização das análises.

A dosagem sérica de anticorpos neutralizantes para a raiva foi realizada utilizando a técnica de ensaio de imunofluorescência. Essa técnica, conhecida como SFIMT (Técnica Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência), envolve várias etapas, como preparação das amostras, diluição dos soros de referência, incubação com células BHK-21, fixação e coloração com um anticorpo fluorescente específico para o vírus da raiva. As amostras sorológicas dos animais que receberam a vacina antirrábica comercial inativada após 21 dias, bem como em outros dias específicos, foram encaminhadas ao Instituto Pasteur (São Paulo) para a aplicação dessa técnica. De acordo com a OMS (2018), considera-se um título protetor quando os animais

apresentam uma titulação de anticorpos antirrábicos neutralizantes igual ou superior a 0,5 UI/mL.

O exame bioquímico foi processado pela máquina Bioquímica BS - 200- Mindray e utilizando os seguintes métodos: ALT (TGP) Cinético UV, AST (TGO) Cinético UV, Fosfatase Alcalina Cinética IFCC, Uréia Cinético-Enzimático UV, Creatinina Enzimático – Trinder, GGT (Gamaglutamiltransferase) Cinético-colorimétrico, CPK (CK) Cinético UV, Albumina Verde-Bromocresol.

O Hemograma foi realizado pelo aparelho de hematologia automático HEMATOCLIN, após isso comparou-se o resultado com a leitura manual das lâminas feita por microscopia, para avaliação da morfologia celular, com o diferencial para leucócitos, assim como a contagem de plaquetas e de leucócitos e eritrócitos, sendo a leitura das proteínas plasmáticas realizada por refratometria.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os parâmetros fisiológicos dos animais foram avaliados nos dias -21, 0, 21, 360, sendo 0, o dia da vacinação dos animais. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento General Linear Models do programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*). Para estudo do efeito dos dias de avaliação aplicou-se o efeito da ANOVA com probabilidade de 5%, segundo Feitosa, 2014. Na análise de Titulação de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva em equinos nos tempos avaliados, foi considerado o Título $\geq 0,5$ UI/mL como sendo o nível eficaz de proteção seguindo a parâmetros da OIE, 2008 e OMS, 2018. Para acompanhamento dos animais, foram realizados os exames de hemograma, leucograma e bioquímico, dos quais foram extraídos as médias e desvio padrão por animal.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS

As análises realizadas nesse estudo, através dos parâmetros fisiológicos realizados com exames físicos nos animais e sorológicos, indicaram que os equinos estavam hígidos, com condições adequadas de manejo e bem-estar estabelecidos pelo estudo. Além disso, nenhum evento adverso foi observado. Os exames clínicos realizados isoladamente em cada um dos 10 animais não mostraram alterações significativas relacionadas ao uso da vacina ou a qualquer outra patologia, com base em parâmetros fisiológicos avaliados, como frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e motilidade intestinal. Esses demonstram que os animais apresentam resultados saudáveis e não apresentam problemas de saúde decorrentes do uso da vacina ou de outras patologias. Como pode ser observado os principais achados clínicos na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias, desvios padrão e análise estatística por ANOVA[†], dos parâmetros fisiológicos dos equinos antes e após a aplicação da vacina.

Avaliação clínica				
Tempo (Dia)	FC (bpm)	FR (mpm)	T	Motilidade ^{††}
D-21	74,8 ^a ±19,5	18,8 ^a ±4,9	38,0 ^a ±0,6	2,4 ^a ±0,5
D0	58,7 ^a ±16,9	18,4 ^a ±2,1	37,8 ^a ±0,3	1,9 ^a ±0,3
D+21	58,4 ^a ±13,8	22,1 ^a ±6,0	38,1 ^a ±0,5	1,8 ^b ±0,4
D+360	44,2 ^b ±8,7	18,2 ^a ±3,6	37,3 ^a ±1,9	1,6 ^b ±0,5
Valor de referência ^{†††}	28 a 40	8 a 16	37,2 - 38,9	1 a 2

FC: frequência cardíaca; bpm: batimentos por minuto; FR: frequência respiratória; mpm: movimentos por minuto; T: temperatura; m/2min: movimentos em dois minutos.

*Aplicação do teste ANOVA. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste ANOVA ao nível de 5% de probabilidade.

**Motilidade intestinal verificada pela ausculta do ceco no Quadrante Dorsal Direito (QDD).

***WHITE, 1990; Feitosa (2014).

A análise estatística da Tabela 1, para a frequência cardíaca, demonstrou que houve diferença significativa entre as médias dos momentos D-21, D0 e D+21, em relação ao D+360, além disso, todos os valores registrados estavam fora do esperado para a espécie em repouso. Como esses valores foram decrescendo com o passar dos dias,

sugere-se que no início do experimento os animais estavam mais agitados e foram se acostumando aos procedimentos. De acordo com Hogdson et al. (2014), a frequência cardíaca de um cavalo em repouso varia entre 25 a 40 bpm. Essa frequência cardíaca pode atingir rapidamente 100 bpm devido a situações que causem excitações no animal como, dor, medo, manejo e exercício (MELO; OÑA et al., 2021). Segundo, Clayton, (1993), Matsuno (2012), considerando que animais jovens tem a frequência respiratória mais elevada devido a maior taxa de consumo de oxigênio que animais adultos esta alteração pode ser justificada, pois, nas primeiras avaliações realizadas (D-21, DO e D+ 21) os animais tinham idade próxima a 6 meses, já na avaliação realizada no dia D+ 360 os animais tinham idade superior a um ano.

Não houve efeito significativo para a FR e nem na temperatura retal, observando-se apenas, leve aumento da FR, possivelmente em decorrência da frequência cardíaca. Ferreira (2006) e Prates (2007) relataram que a temperatura da superfície corpórea e a frequência respiratória são dependentes de condições bioclimáticas, sendo influenciadas pela umidade relativa do ar, temperatura ambiental e intensidade de exercícios. Como o experimento foi em instalações zootécnicas apropriadas com cobertura, para evitando o estresse térmico, promovendo conforto e bem estar durante a manipulação e a realização dos exames físicos, acredita-se que o maior valor registrado, no D+21, seja em decorrência da temperatura ambiental, pois foi na época de maior calor na região.

Para a motilidade intestinal, a análise estatística demonstrou que os resultados obtidos nos dias D+21 e D+360 foram diferentes dos outros dias avaliados, mesmo estando dentro da faixa de referência para a espécie. Diversos fatores podem causar alterações gastrointestinais em equinos, como alimentação de baixa qualidade, instalações inadequadas, longos períodos de viagem, trabalho excessivo, longos períodos sem ingestão de água e comportamento individual. Portanto, não parece haver correlação com a administração da vacina, sendo importante evitar esses fatores e implementar medidas preventivas, como o controle de endoparasitas e ectoparasitas, para manter a saúde gastrointestinal dos animais (HILLYER et al., 2002).

É importante ressaltar que o processo de deslocamento, estabulação, contenção, manipulação, exame clínico, coleta de amostra de sangue e vacinação, representam

uma mudança na rotina em que esses animais são adaptados, o que pode resultar em maior estresse. Além disso, durante todo o processo de avaliação e coleta de amostra, os animais ficaram privados de água e alimentos, o que também pode interferir nas restrições físicas avaliadas.

A avaliação dos parâmetros clínicos após a administração da vacina comercial em equinos, dentro das condições do experimento, fornece informações relevantes para os órgãos de defesa animal. As variações dos parâmetros encontradas no estudo não afetaram a eficiência da vacina. Isso significa que os resultados obtidos com a vacina testada são confiáveis e podem ser usados para o planejamento e estabelecimento de critérios estratégicos no controle da doença em questão.

5.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Antes e após a inoculação do antígeno, é importante que o indivíduo tenha um estado de saúde adequado para que seu organismo seja capaz de produzir os anticorpos necessários (ESCODRO et al., 2013). Por conta disso, optou-se por realizar exames hematológicos antes da vacinação para estimar se haveria alguma influência na segurança e na eficácia da vacina, além de identificar possíveis contraindicações ou necessidade de cuidados especiais durante o processo de imunização.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 estão apresentados os parâmetros dos hemogramas, leucogramas e bioquímicos, respectivamente, dos animais. Ao longo do experimento, pôde-se observar que a maioria dos valores registrados estiveram dentro da normalidade, inclusive a ausência de metarrubricito e metamielocitos, como era esperado, sugerindo não haver interferência da vacina sobre estes parâmetros (KANEKO et al., 2008; SILVA, 2017).

Estes achados estão em acordo com Eduardo Neto et al. (2022), que realizaram uma pesquisa de antígeno para a produção de soro hiperimune, utilizando partículas virais do SARS-CoV-2. Foram utilizados 26 equinos, todos os animais realizaram hemograma, leucograma e testes bioquímicos antes e após as aplicações, e não tiveram efeitos significativos em exames hematológicos, como os relatados neste trabalho.

Observou-se, porém, que os valores registrados para o hematócrito (níveis mais baixos), e RDW (níveis mais altos) estavam limítrofes dos considerados como fisiológicos por Kaneko et al. (2008), como foi registrado desde o D-21, e se mantiveram na mesma faixa, supõe-se que a vacina não interferiu nestes parâmetros sanguíneos (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias e desvios padrão dos parâmetros encontrados no hemograma dos equinos antes e após a aplicação da vacina.

Dia	Hemácias x10 ⁶ /μL	HB g/dL	HT %	VCM μ ³	HCM** %	CHCM %	RDW**
-21	6,7	10,2	29,3	44,0	15,3	34,9	22,4
0	6,8	10,2	28,2	41,9	15,2	34,3	19,6
21	6,2	9,5	26,4	42,7	15,4	36,1	19,1
90	6,5	10,1	26,8	41,8	15,7	37,7	19,0
180	6,6	12,4	27,6	47,3	.	33,1	.
270	7,3	13,0	33,2	46,6	.	32,4	.
360	6,1	9,5	26,9	44,2	.	35,2	.
Média	6,6	10,7	28,3	44,0	15,4	34,8	20,0
DP	0,39	1,4	2,35	2,19	0,23	1,79	1,62
VR*	6,5-12,5	11-19	32-52	34-58	15,2-18,6	31-37	15,0-18,5

HB (hemoglobina), HT (hematócrito), VCM (Volume corpuscular médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), RDW (Red Cell distribution width), DP (Desvio Padrão), VR (Valores de referências). *Fonte: Kaneko et al. (2008).

**Dos dias 180 a 360, os dados para HCM e RDW foram perdidos, sendo alocados com um ponto na tabela, a fim de viabilizar a aplicação das fórmulas.

Sabe-se que o hemograma completo pode ser usado para avaliar o estado geral do paciente e um organismo saudável é capaz de manter um equilíbrio adequado na produção e destruição das células sanguíneas, garantindo a quantidade e qualidade ideais das células em circulação. Esse processo é crucial para prevenir infecções, sangramentos e garantir o funcionamento correto das células do corpo (ROSENFELD, 2012). Apesar desses parâmetros terem ficado fora dos valores de referência, nenhuma destas anormalidades foi registrada, indicando que pode ser uma característica do grupo de animais avaliados.

Segundo Monteiro (2016), as principais causas de linfocitose incluem respostas

fisiológicas, como a observada em gatos e cavalos em resposta à adrenalina, bem como em animais jovens, resultando em uma linfocitose transitória. Além disso, a linfocitose também pode ocorrer após vacinações, com a presença de imunócitos, em doenças infecciosas crônicas, em casos de medo e ansiedade em felinos, na fase crônica da inflamação, em protozoonoses, durante a fase de convalescença e em casos de linfoma e leucemia linfocítica. Ao observar a Tabela 3, nota-se que os equinos avaliados apresentaram no D-21 esinofilia, porém esta não se manteve ao longo do experimento. Além de linfocitose (D+180) e neutrofilia (D+90, D+180 e D+360). Alguns animais, momento das coletas, passaram por pequeno estresse, ao serem colocados no tronco de contenção, de durante a realização dos exames físicos e coleta de sangue (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias e desvios padrão dos parâmetros encontrados no leucograma dos equinos antes e após a aplicação da vacina.

Dia	Leuc	Neut seg	Neut bast	Linf	Mon	Eosin	Bas	Plaq	PPT
				células/ μ l					
-21	12470	5608,9	18,8	5382,0	251,2	1203,8	5,4	176300	7,8
0	11680	6361,6	34,2	4591,0	241,3	451,9	0,0	256300	7,8
21	11450	5894,6	12,1	5063,4	261,4	218,5	0,0	301500	7,5
90	11320	6959,0	0,0	3473,4	173,7	713,9	0,0	245200	7,6
180	11690	3633,2	138,9	6369,2	332,7	638,3	73,7	192800	8,0
270	11060	4801,2	16,6	5322,7	246,1	613,4	60,0	176700	8,2
360	10570	6020,4	874,0	2690,1	641,4	344,1	0,0	201000	7,7
média	11462,9	5611,3	156,4	4698,8	306,8	597,7	19,9	221400	7,8
DP	590,6	1095,1	319,9	1246,8	154,6	319,4	32,4	47375,6	0,24
VR*	5500 - 12500	2700 - 6700	0 - 100	1500 - 5500	0 - 800	0 - 950	0 - 170	90000- 350000	5,8 - 8,7

Leuc (Leucócitos), Neut seg (Neutrófilos segmentado), Neut bast (Neutrófilos bastonetes), Linf (linfócitos), Mon (monócitos), Eosin (eosinófilos), Bas (basófilos), Plaq (plaquetas), PPT (Proteína plasmática), DP (Desvio Padrão), VR (Valores de referências), *Fonte: Kaneko et al. (2008).

A avaliação das enzimas hepáticas, musculares e renais monitora e diagnostica doenças e lesões nestas estruturas orgânicas (GONZÁLEZ; SILVA, 2017). E servem de suporte para estimar a saúde geral do indivíduo. Como o fígado e os rins são órgãos destinados à depuração de metabólitos e agentes tóxicos, bem como o

músculo é sensível ao acúmulo destes, ao monitorar suas funções, pode-se estimar a capacidade do organismo de lidar com situações de risco à vida e se há algum fator estressor desencadeando o seu mal funcionamento. Por serem exames de baixo custo, simples e rápidos, são considerados imprescindíveis em pesquisas, sendo assim, optou-se por realiza-los, cujos resultados foram tabulados a seguir na Tabela 4.

Tabela 4 – Médias e desvios padrão dos parâmetros encontrados no bioquímico dos equinos antes e após a aplicação da vacina

DIA	ALT U/l	AST U/l	FA U/l	GGT U/l	Ureia mg/dl	Creatinina mg/dl	CPK U/l	Albumina g/dl
-21	9,7	338,6	.	15,3	35,5	1,0	.	.
0	9,6	332,4	293,3	11,0	24,1	1,2	448,7	6,0
21	6,8	308,6	223,3	10,2	38,2	1,0	335,2	5,3
90	8,1	371,3	260,9	13,7	41,0	1,0	271,0	2,4
180	16,2	260,9	275,8	19,2	16,2	1,1	259,6	3,1
270	13,5	362,6	211,1	21,8	54,9	0,9	401,4	2,9
360	14,5	357,4	228,2	21,4	38,8	1,2	441,0	5,5
Média	11,2	333,1	248,8	16,1	35,5	1,1	359,5	4,2
DP	3,53	38,21	32,70	4,80	12,43	0,11	83,39	1,59
VR*	34 - 113	226 - 366	143 - 395	4,3 - 13,4	21,4 - 51,36	1,2 - 1,9	86,0 - 140,0	2,6 - 3,7

ALT (Alanina aminotransferase), AST (Aspartato aminotransferase), FA, (fosfatase alcalina), GGT (Gamaglutamiltransferase), CPK (creatinofosfoquinase), DP (Desvio Padrão), VR (Valores de referências), *Fonte: Kaneko et al. (2008).

Assim como nos resultados dos parâmetros sanguíneos, foi possível observar que a maioria dos valores das enzimas musculares, hepáticas e renais esteve dentro da normalidade, ou manteve-se próximo a ela, de acordo com os determinados para a espécie (KANEKO et al., 2008), durante o período analisado, não evidenciando possíveis alterações nesses sistemas, o que sugere que não houve uma ação direta da vacina sobre esses parâmetros sanguíneos.

A despeito disso, observou-se que a média da ALT ($11,2 \pm 3,55$ U/l), durante todo o período de coleta de sangue, manteve-se fora dos valores ditos como normais para espécie equina, o que pode ser uma característica dos animais utilizados no experimento, como explicado por Souza et al. (2016), que analisaram cavalos

saudáveis da raça Campeiro, encontraram média de $5,13 \pm 1,18$ UI/l para a ALT e concluíram que esta raça possui valores específicos e diferentes dos da sua espécie, sugerindo que variações raciais devem ser levadas em conta ao analisar o perfil bioquímico de cavalos.

5.3 PARÂMETROS SOROLÓGICOS

A Tabela 5 mostra os resultados das sorologias dos animais antes e após a vacinação. É possível observar que, 21 dias antes da vacinação, os animais com títulos de anticorpos $\leq 0,5$ UI/mL, e houve um efeito significativo na sorologia 21 dias após a vacinação, quando a titulação atingiu o ponto máximo variando entre 1 e 128 UI/mL. No dia D+90, os valores mínimos foram de 2,0 UI/mL e os máximos de 170,67 UI/mL. No período D+180, os valores variaram entre um mínimo de 0,5 UI/mL e um máximo de 32 UI/mL. Já no dia D+270, o valor mínimo encontrado foi de 0,5 UI/mL e o máximo de 64 UI/mL. Ao final do estudo, no dia D+360, os resultados variaram entre 1,33 UI/mL e 96 UI/mL.

Tabela 5 – Médias da sorologia de equinos vacinados com vacina antirrábica, antes e depois da aplicação.

Identificação	Resultado (UI/mL)*						
	D-21	D0	D+21	D+90	D+180	D+270	D+360
8	<0,08	<0,08	1	2	0,5	0,5	1,33
9	<0,08	<0,08	32	16	4	8	6
12	0,17	0,25	64	16	4	16	12
14	<0,08	0,08	16	2	1	2	1,5
18	0,25	0,25	128	170,67	32	64	96
2	0,08	0,08	32	5,33	2	2	2
3	0,25	0,25	16	16	8	16	12
5	<0,08	<0,08	64	32	8	32	24
13	0,17	0,25	64	32	8	16	24
16	0,17	0,17	64	32	8	16	24

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

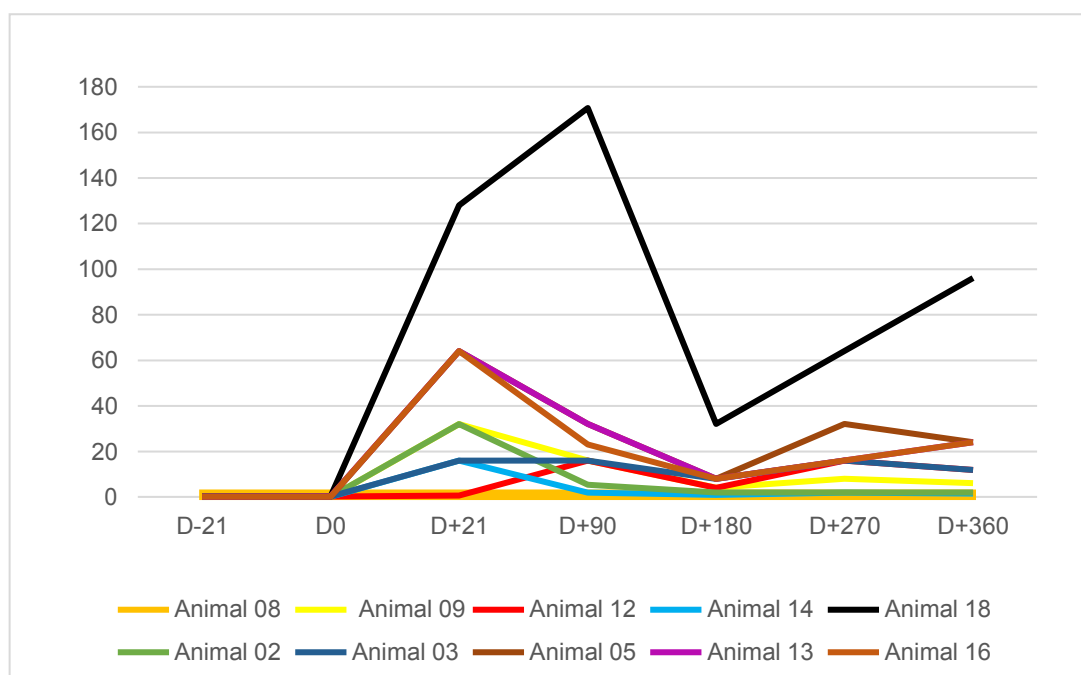
As médias dos níveis de anticorpos rábicos se mantiveram em 100% dos animais do estudo, corroborando os resultados de Rathnadiwakara e colaboradores (2023). Esses pesquisadores aplicaram vacina antirrábica em 31 ovelhas regularmente e

observaram que todas mantiveram os títulos de anticorpos neutralizantes por um período de um ano.

Em outro estudo realizado por Almeida (2022), com bovinos, os animais apresentaram titulações de anticorpos rábicos $> 0,5$ UI/mL a partir de 21 dias, e esses títulos se mantiveram por um ano, reforçando os achados deste experimento e demonstrando a importância do reforço anual.

Para uma melhor compreensão e representação dos resultados, estes foram plotados no Gráfico 1, que mostra a curva de imunidade humoral de cada indivíduo avaliada ao longo de 360 dias após a imunização. Nesses gráficos, é possível visualizar a amplitude da resposta imunológica de cada animal, ou seja, a produção de anticorpos ao longo do tempo. Esta representação gráfica permite uma melhor compreensão da resposta imunológica dos animais após a imunização. É possível observar se ocorreu um aumento gradual na produção de anticorpos, atingindo um pico em determinado momento e, posteriormente, uma possível diminuição.

Gráfico 1 – Curvas da titulação de anticorpos neutralizantes antirrábico (IgG) em equinos nos tempos avaliados.

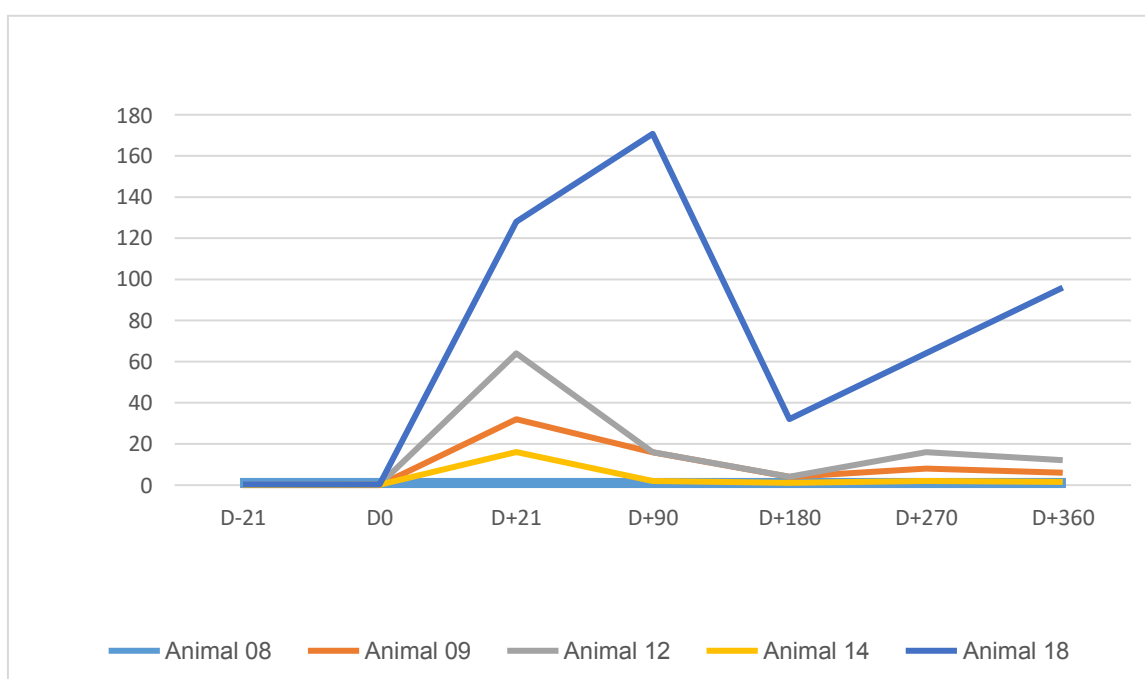


Ao analisar os resultados dos animais do Gráfico 1 e comparar com os da Tabela 2, observa-se que os animais apresentaram níveis de anticorpos com 21 dias após a vacina. O animal 18 no dia D+90 apresentou a maior curva de titulação em

comparação com o animal 08 que apresentou a menor curva no gráfico no tempo de D+360. Os valores obtidos no tempo D+21 variaram entre 1,00 e 128,00 UI/mL. No tempo D+90, os resultados variaram de 2,00 a 170,67 UI/mL. Já no tempo D+180, encontramos um valor mínimo de título de 0,50 UI/mL e um máximo de 32,00 UI/mL. No tempo D+270, os valores variaram entre 0,50 e 64,00 UI/mL. Ao final do estudo, no tempo D+360, um ano após a aplicação da vacina antirrábica comercial inativada testada, os valores de títulos obtidos variaram de 1,33 a 96,00 UI/mL. É importante ressaltar que todos os animais tiveram títulos considerados adequados durante todo o estudo.

Para facilitar a discussão dentro do mesmo sexo, confeccionou-se os gráficos separando os indivíduos por este critério.

Gráfico 2 – Curvas individuais dos títulos de anticorpos (UI/mL) de equinos fêmeas vacinados contra a raiva com uma dose de vacina comercial, obtidas pela técnica SFIMT.

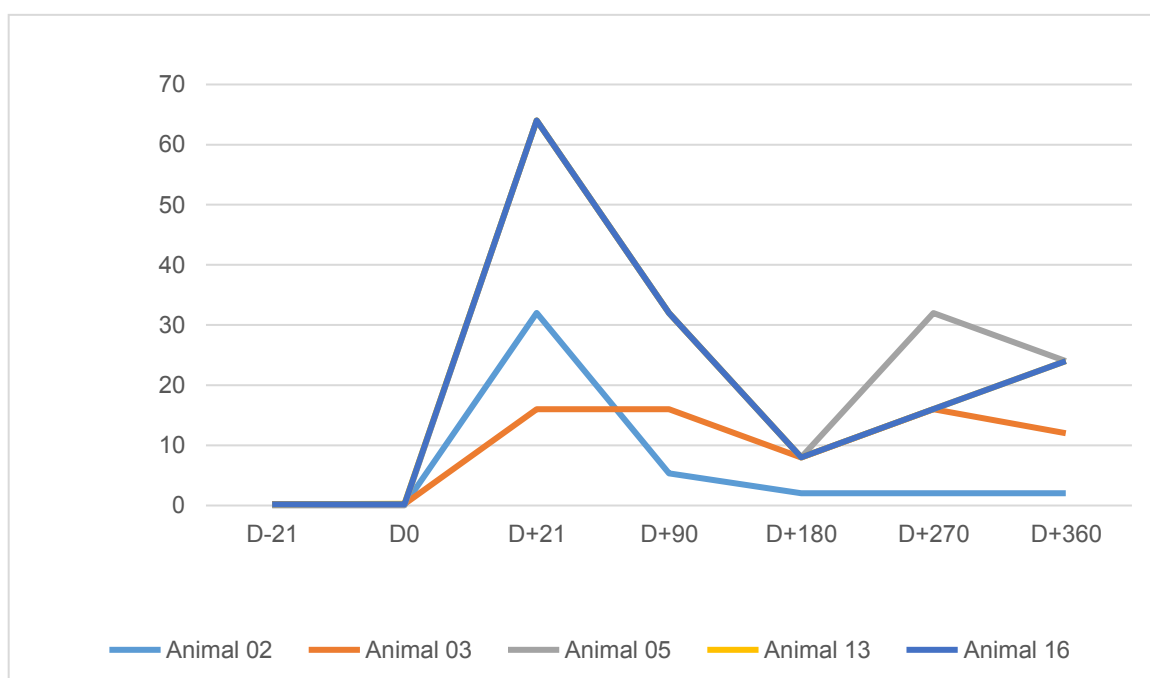


Em relação à idade e sexo dos animais avaliados, observou-se no Gráfico 2 que as fêmeas, no início do experimento, tinham idades variando entre 6 e 12 meses. Nesse grupo, foi apresentado níveis de anticorpos neutralizantes antirrábicos, com valores no D+21 máximos de 128,00 UI/mL e mínimos de 1,0 UI/mL, os valores variaram no D+90 em 2,00 e 170,67 UI/mL, já no tempo de D+ 180 um valor mínimo de título de

0,5 e 32,00 UI/mL máximo. Encontrou-se, no período de D+270, valores que variaram de 0,5 e 64,00 UI/mL máximo. Ao final do estudo esse tempo variou de 1,33 a 94 UI/mL. (Gráfico 1a). Nota-se que a curva de titulação alcança o nível máximo no dia D+90 no animal 18 e mínima D+360 no animal 08.

O ponto de maior soroconversão vacinal ocorreu no dia D+21 e o mínimo, no dia D+360. Os resultados deste estudo mostram que, embora os títulos de anticorpos sejam menores em fêmeas em comparação com os machos, eles alcançaram uma soroconversão satisfatória de pelo menos 0,5 UI/mL após a aplicação da vacina. Isso indica que uma única dose da vacina foi capaz de estimular uma resposta imunológica adequada nesses animais.

Gráfico 3 – Curvas individuais dos títulos de anticorpos (UI/mL) de equinos machos vacinados contra a raiva com uma dose de vacina comercial, obtidas pela técnica SFIMT.



A vacinação é uma das principais estratégias para a prevenção da raiva em animais herbívoros e domésticos, juntamente com o controle dos reservatórios, do morcego *Desmodus rotundus*. A vacinação profilática visa interromper a transmissão da doença entre animais domésticos e selvagens, garantindo a segurança da saúde humana (OLIVEIRA et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2007).

A importância dos estudos de eficácia, soroconversão e segurança das vacinas antirrábicas comerciais, visam avaliar a resposta imunológica em uma ampla população de indivíduos, considerando as particularidades de cada categoria animal. O objetivo é obter informações precisas sobre a eficácia da vacinação e garantir que uma resposta imune seja adequada para proteger os animais contra a raiva.

É importante ressaltar que vários fatores são essenciais para garantir uma conversão vacinal eficiente. Primeiramente, o animal deve estar em boas condições de saúde para obter uma resposta imunológica adequada (KOTAIT et al., 1998). Além disso, segundo Albas et al. (2001), é fundamental garantir o acondicionamento adequado da vacina, mantendo-a refrigerada, a dose correta e a via de administração, além de administrar a dose correta e utilizar a via de administração específica para cada espécie animal.

Esses fatores são fundamentais para garantir a eficácia de uma vacina e fornecer a proteção desejada contra a raiva, uma zoonose fatal que causa grandes perdas econômicas na pecuária em áreas endêmicas. Num programa nacional de controle da raiva, é crucial garantir que a vacinação seja realizada de forma eficiente, garantindo resultados superiores e maximizando a eficácia da imunização.

6 CONCLUSÃO

Após a avaliação sorológica, em equinos vacinados contra raiva, por meio da identificação da titulação de anticorpos IgG nos momentos D+21, D+90, D+180, D+270 e D+360, pela técnica de Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência, durante um ano, conclui-se que esta vacina foi eficiente pois conferiu proteção contra o vírus da raiva.

Os parâmetros fisiológicos, hematológicos e bioquímicos dos animais antes e durante todo o experimento mantiveram-se dentro dos valores esperados, não interferindo na produção de anticorpos.

REFERÊNCIAS

- AAEP, American Association of Equine Practitioners. **Rabies**. Disponível em: <https://aaep.org/guidelines/vaccination-guidelines/core-vaccination-guidelines/rabies>. Acessado em: 28 Ago 2023.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. cap. 2, Rio de Janeiro: Elsevier, p. 83-560, 2015.
- ABUJAMRA, T. **Concursos**: tudo que você precisa saber sobre Raiva. Disponível em: <https://blog.ifope.com.br/raiva-tudo-para-concursos/>. Acessado em: 26 Set 2023.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Rabia**. In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, p. 502-526, 1986.
- ADAB, Agência de Defesa Agropecuária da Bahia, **ADAB regulamenta e fiscaliza abate de equídeos na Bahia**. 2016. Disponível em: <http://www.adab.ba.gov.br/noticias/adab-regulamenta-e-fiscaliza-abate-de-equideos-na-bahia/> acessado em: 04 Jan 2024.
- ALBAS, A.; NOGUEIRA, R. M. B.; FONTOLAN, O.L.; ALBAS, K.S.; BREMER NETO, H. Efeito do congelamento sobre imunogenicidade da vacina contra a raiva produzida em tecido cerebral de camundongo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Uberaba**, v. 34, n. 1, p. 49-52, 2001.
- ALBAS, A.; PARDO, P.E.; BREMER NETO, H.; GALLINA, N.M.F.; FUCHES, M. R.M.; SARTORI, A. Vacinação anti-rábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, n. 2, p. 153-159, 2005.
- ALMEIDA, C. S. Avaliação da resposta imune humoral de bovinos imunizados com vacina comercial antirrábica inativada, 50f. **Dissertação** (Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2022.
- ANDRADE, E. A. A.; MONTEIRO, F.D.O.; SOLORIO, M. R.; RAI, V. A.; XAVIER, D. A.; COLINO, E.; GUIMARÃES, R. J.P.S.; ABEL, I. Livestock rabies in Pará state, Brazil: a descriptive study (2004 to 2013). **Pesq. Vet. Bras. Pesq.**, v. 40, 2020.
- ATOR, K. J. **Introductory Immunology**: Basic Concepts for Interdisciplinary Applications. 2. ed. cap. 4, Amsterdam: Elsevier, p. 45-62, 2019.
- BASILE, R. C. Raiva em equinos. **Revista Ouro Fino Saúde Animal**. 2016. Disponível em: <https://www.ourofino.saudeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/raiva-em-equinos/>. Acesso em: 28 Jun 2023.
- 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.

BATISTA, H.B.; LIMA, F.E.; MALETICH, D.; SILVA, A.C.; VICENTINI, F.K.; ROEHE, L.R.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, PM. Immunoperoxidase inhibition assay for rabies antibody detection. **J. Virol. Methods**, v. 174, p. 65-68, 2011.

BRASIL. Governo do Estado do Ceará, Secretaria da Saúde. **Boletim epidemiológico raiva**. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual técnico para o controle da raiva dos herbívoros**. p. 1-43, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Raiva**. 2022a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Controle da raiva dos herbívoros**: manual técnico. 2ª ed. Brasília: Mapa/ACS, 2009a. 124p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Controle da raiva dos herbívoros**: manual técnico. Brasília: Mapa/ACS, 2º ed., 2022b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Raiva animal**. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia da vigilância epidemiológica**. 7ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de diagnóstico laboratorial da raiva**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de normas e procedimentos para vacinação**. Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, p.18-629, 2014.

CFMV, Conselho Federal de Medicina veterinária. **Por que a raiva é uma questão de saúde pública?** 2022. Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/por-que-a-raiva-e-uma-questao-de-saude-publica/comunicacao/noticias/2021/05/21/>. Acessado em: 12 Ago 2023.

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

CONCEA. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**: fascículo 7B Grandes ruminantes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 2016, 39p.

CLAYTON, M.H. Conditioning Sport Horses. **Saskatoon: Sport Horse Publications**. p. 271,1991.

DAY, M. J.; CRAWFORD, C.; MARCONDES, M.; SQUIRES, R. A. Recomendações sobre a vacinação para médicos veterinários de pequenos animais da América Latina: um relatório do Grupo de Diretrizes de Vacinação da WSAVA. **Journal of Small Animal Practice**, p. 30-38, 2020.

ESCODRO, P. B.; BERNARDO, J. O.; ROVERI, E. G.; ESCODRO, L. O.; OLIVEIRA, C. F.; FONSECA, L. S.; LOPES, C.R. A.; TONHOLO, J.; GOMES DO N. T. Padronização da técnica de plasmaférese automatizada em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1049-1056, 2013.

FAN, L. ZHANG, L., LI, J. ZHU. F. Advances in the progress of monoclonal antibodies for rabies. **Hum. Vaccin. Immunother**, v. 18, 2022.

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

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: A arte do diagnóstico**. 3 ed., Rio de Janeiro: Roca, 2014, 644p.

FERNANDES, E.R.; DE ANDRADE JUNIOR, H.F.; LANCELLOTTI, C.L.P.; QUARESMA, J.A.S.; DEMACHKI, S.; VASCONCELOS, P.F.C.; DUARTE, M.I.S. In situ apoptosis of adaptive immune cells and the cellular escape of rabies virus in CNS from patients with human rabies transmitted by *Desmodus rotundus*. **Virus Res.**, v. 156, n. 1-2, p. 121-126, 2011.

FERNANDES, G. C. Doenças virais, In: RIET-CORREA. F., SCHILD. A.N., MENDEZ. M.D.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed., v. 1, São Paulo: Varels, p. 149, 2001.

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

FIOCRUZ, Ministério da Saúde. **Vacinas virais**. 2022. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-vacinas-menu-topo/131-plataformas/1574-vacinas-virais>. Acesso em: 28 Ago 2023.

FOOKS, A. R.; CLIQUET, F.; FINK, S.; FREULING, C.; HEMACHUDHA, T.; MANI, R. S.; MULLER, T.; NADIN-DAVIS, S.; PICARD-MEYER, E.; WILDE, H.; BANYARD, A. C., Rabie, **Nature Review Dis Primers**, v. 3, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201791#>. Acesso em: 28 Ago 2023.

FU, Z.F.; JACKSON, A.C. Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. **J. Neurovirol**, v .11, p. 101-106, 2005.

GASPAR, E.B. A vacinação de bovinos e o potencial de proteção dos animais.

EMBRAPA, 2016.

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

GOMES, M. N.; MONTEIRO, A. M. V.; LEWIS, N.; GONÇALVES, C. A.; FILHO, V. S. N.; Landscape risk factors for attacks of vampire bats on cattle in Sao Paulo, Brazil, **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p.139-146, 2010.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 3. ed., UFRGS, Porto Alegre, 2017, 538p.

GREEN, S.L.; SMITH, L.L.; VERNAU, W.; BEACOCK, S.M. Rabies in horses: 21 cases (1970-1990). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 8, 1992.

HILLYER, M.H.; TAYLOR, F.G.; PROUDMAN, C.J.; EDWARDS, G.B.; SMITH, J.E.; FRENCH, N.P. Case control study to identify risk factors for simple colonic obstruction and distension colic in horses. **Equine Vet. J.**, v. 34, p. 455-463, 2002.

HOGDSON, D.R.; MCKEEVER, K. H.; MCGOWAN, C. M. **The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**. Cap.2, 2 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 9-17, 2014.

HOOPER, D.C.; OHNISHI, S.T.; KEAN, R.; NUMAGAMI, Y.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. S. A.**, v. 92, n. 12, p. 5312-5316, 1995.

HOOPER, D.C.; MORIMOTO, K.; BETTE, M.; WEIHE, E.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. **J. Virol.**, v. 72, 1998.

IBGE, Instituto brasileiro de Geografia e estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 42, p.1-39, 2014.

ITO, N.; MOSELEY, G.W.; BLONDEL, D.; SHIMIZU, K.; ROWE, C.L.; ITO, Y.; MASATANI, T.; NAKAGAWA, K.; JANS, D.A.; SUGIYAMA, M. Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. **J. Virol.**, v.18, n.13, 2010.

JACKSON, A.C. Update on rabies. **Res. Rep. Trop. Med.**, v. 2, p. 31-43, 2011.

JACKSON, A.C.; KAMMOUNI, W.; ZHEREBITSKAYA, E.; FERNYHOUGH, P. Role of oxidative stress in rabies virus infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons. **J. Virol.**, v. 84, n. 9, p. 4697-705, 2010.

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

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**, 6 ed., San Diego: Academic Press, 2008, 936p.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, San Diego: Academic Press, 1997, 932 p.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; TAKAOKA, N.Y. **Raiva: aspectos gerais e clínica**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2009, 49p.

KOTAIT, I.; GONÇALVES, C. A.; PERES, N. F.; SOUZA, M. C. A. M.; TARQUETA, M. C. **Manual técnico do Instituto Pasteur: Controle da raiva dos herbívoros**, 1 ed., São Paulo: Instituto Pasteur, 1998, 15p.

LECOLLINET, S.; PRONOST, S.; COULPIER, M.; BECK, C.; GONZALEZ, G.; LEBLOND, A.; TRITZ, P. Viral equine encephalitis, a growing threat to the horse population in europe? **Viruses**, v. 12, n. 23, 2019.

LI, X.Q.; SARMENTO, L.; FU, Z.F. Degeneration of neuronal processes after infection with pathogenic, but not attenuated, rabies viruses. **J. Virol.**, v. 79, n.15, 2005.

LIMA, E. F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R. S.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 250-264, 2005.

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

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA, 2016, 53p.

MATSUNO, A. K. Respiratory failure in children. **Medicina (Ribeirão Preto)**. v.45, n.2, p. 168-84, 2012.

MASATANI, T.; ITO, N.; ITO, Y.; NAKAGAWA, K.; ABE, M.; YAMAOKA, S.; OKADERA, K.; SUGIYAMA, M. Importance of rabies virus nucleoprotein in viral evasion of interferon response in the brain. **Microbiol Immunol**, v.57, n. 7, 2013.

MARTINS, E.; ZITKOSKI, E.; TEIXEIRA, J. S.; BATTISTI, R.; BRAZ, P. H. **Semiologia do sistema digestório dos equinos**. In: Open science research VI, cap. 18, São Paulo: Científica Digital, p. 271-287, 2022.

MELO E OÑA, C. M.; CRUZ, Q. C.; CRUZ, M. S.; CAOBIANCO, J. D. R.; SILVA, F. G.; MAGALHÃES, L. C. O. Utilização das frequências cardíaca e respiratória na determinação do bem-estar de cavalos inseridos em programas de equoterapia. **Nucleus Animalium**, v. 13, n. 1, 2021.

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

SILVA, M. N. **Hematologia veterinária**. 1. Ed. Belém: EditAEDI. 2017. 116p. Disponível em: https://livroaberto.ufpa.br/jspui/bitstream/prefix/734/1/Livro_HematologiaVeterinaria.pdf. Acesso em: 19 Dez 2023.

SHIN, T.; WEINSTOCK, D.; CASTRO, M.D.; HAMIR, A.N.; WAMPLER, T.; WALTER, M.; KIM, H.Y. Acland H. Immunohistochemical localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase within neurons of cattle with rabies. **J. Vet. Med. Sci.**, v.66, n.5, p. 539-41, 2004.

SONTHONNAX, F.; BESSON, B.; BONNAUD, E.; JOUVION, G.; MERINO, D.; LARROUS, F.; BOURHY, H. Lyssavirus matrix protein cooperates with phosphoprotein to modulate the Jak-Stat pathway. **Sci. Rep.**, 2019.

MOORE, S. M.; HANLON, C. A. Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, 2010.

EDUARDO NETO, M.; WILBORN, R; SILVA, G. C.; GONÇALVES, V. S.; MÜLLER, V.; CONRAD, N. L.; LEITE, F. P. L.; NOGUEIRA, C. E. W. Monitoramento clínico, hematológico e bioquímico de equinos utilizados para a produção de soro hiperimune anti-sars-cov-2. **Science and animal Health**, v. 11, p. 53-69, 2022.

OIE, World Organization for Animal Health. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Cap 3.1.17: Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses, p. 2-35, 2018. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tah/mf/3.01.17_RABIES.pdf. Acessado em: 20 Dez 2023.

OIE. World Organistation for Animal Health 2008. **WAHID interface**. OIE, Rabies Uruguay, 2008.

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

OLIVEIRA, F.A. S.; CASTRO, R.J. S.; OLIVEIRA, J. F.; BARRETO, F.M.; FARIAS, M. P. O.; MARINHO, G. L. O. C.; SOARES, M. J. S.; DAVID, A. S. J.; SCHWARZ, G. G. Geographical and temporal spread of equine rabies in Brazil. **Acta Tropica**, v. 227, 2022.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **WHO expert consultation on rabies**. 3 ed., 2018, 195p.

PASSOS, E. C.; GERMANO, P. M. L.; FEDULLO, J. D. L.; Resposta imune humoral em macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, após a revacinação com vacina antirábica Fuenzalida e Palácios modificada de uso veterinário. **Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, p. 181-188, 2002.

PIMENTEL, L. A.; OLIVEIRA, D. M.; GALIZA, G. J.N.; REGO, R. DO O.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F. Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semiárido. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, p. 589-597, 2009.

PINHEIRO, P. **Raiva Humana**: transmissão, sintomas e vacina. MD. Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.mdsaude.com/doencas-infecciosas/raiva-humana/#Tratamento>. Acesso em: 16 Ago 2023.

PRATES, R. C. Parâmetros fisiológicos de éguas mangalarga marchador em provas de marcha e alimentadas com dietas suplementadas com cromo. 49f. **Dissertação** (mestre em zootecnia), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

RATHNADIWAKARA, H., GUNATILAKE, M., CLIQUET, F., WASNIEWSKI, M., THAMMITIYAGODAGE, M., KARUNAKARAN, R., THIBAUT, J.C., IJAS, M. Detection of immunity in sheep following anti-rabies vaccination. **Clin. Exp. Vaccine Res.**, v.12, p.97-106, 2023.

ROBINSON, D; SHIBUYA, K; MUI, A; ZONIN, F; MURPHY, E; SANA, T; HARTLEY, S.B; MENON, S; KASTELEIN, R; BAZAN, F; O'GARRA, A. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. v.7, **Immunity**, 1997.

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

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

ROSA, M.T.D. Perfil epidemiológico e avaliação do conhecimento de produtores rurais sobre a raiva bovina e o impacto da doença para a saúde pública e economia pecuária no estado do paraná. 51f. **Dissertação** (Mestre em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável Fronteira Sul), Universidade Federal da Fronteira Sul Campus Realeza, 2023.

ROSENFELD, R. Hemograma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 4, p. 244, 2012.

RUPPRECHT, C. E; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDE, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5 ed., v.1, Geneva, World Health Organization, 2018, p 259-262.

SAZIMA, I. Aspectos do comportamento alimentar dos morcegos hematófago, *Desmodus rotundus*. **Boletim de Zoologia**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 97-120, 1978.

SERVAT, A.; WASNIEWSKI, M.; CLIQUET, F. Tools for rabies serology to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. **Dev. Biol. (Basel)**, 2006.

SMITH, J.S.; YAGER, P.A.; BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. **Bull World Health Organ**, v. 48, n. 5, p.535-541, 1973.

SMITH, L. L.; CLARE, D. A. A. Clinical note on equine rabies. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 13, n. 8, p. 193, 1972.

SOUZA, A. F.; SCHADE, J.; KUNZ, J.R.; RAMOS, A.F.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; FONTEQUE, G.V.; COSTA, D.; SAITO, M.E.; FONTEQUE, J.H. Perfil bioquímico sérico de equinos clinicamente sadios da raça Campeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 4, p. 839-844, 2016.

SOUZA, T. C. P. S. Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados. 82f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, 2019.

TAKAOKA, N. Y.; KOTAIT, I.; REICHMANN, M. L.M. A. B.; CARRIERI, M. L.; PANACHÃO, M. R. I.; HARMANI, N. M. S.; CUNHA, R. S.; OMOTO, T. M.; BOLZAN, V. L.; COSTA, W. A. **Manual técnico Instituto Pasteur: Raiva Controle e profilaxia humana**. 2 ed., v. 4, São Paulo: Instituto Pasteur, 2000, 43p.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 251-276, 1995.

WEBSTER. L.T.; DAWSON. J.R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. **Proc. Soc. Experiment Bio. an Med.**, v. 32, p. 570-573, 1935.

WHO. World Health Organization. **Laboratory techniques in rabies**. 5. ed. Geneva: World Health Organization, 2018.

WITHERS, D.R.; MARRIOTT, C.L. Memória de células TCD4 e papel da família de receptores de TNF. **Enciclopédia de biologia celular**. v. 3, p. 770- 775, 2016.

ZHANG, H.; HUANG, J.; YUMENG, C.; LIU, X.; QIAN, M.; HUANG, P.; LI, Y.; ZHAO, L.; WANG, H. Regulation of innate immune responses by rabies virus. **Animal Model and experimental medicine**, 2022

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

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