

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DE ENDOPARASITAS E AGENTES VIRAIS EM
Callithrix geoffroyi **DE ÁREAS ANTROPISADAS DA GRANDE**
VITÓRIA

MARIA CRISTINA VALDETARO RANGEL

VILA VELHA
MARÇO / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DE ENDOPARASITAS E AGENTES VIRAIS EM
Callithrix geoffroyi **DE ÁREAS ANTROPISADAS DA GRANDE**
VITÓRIA

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestra em Ciência Animal.

MARIA CRISTINA VALDETARO RANGEL

VILA VELHA
MARÇO / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R196a Rangel, Maria Cristina Valdetaro
Avaliação de endoparasitas e agentes virais em *Callithrix geoffroyi* de áreas antropizadas da Grande Vitória / Maria Cristina Valdetaro Rangel – 2017.
50 f.: il.

Orientador: Fabio Ribeiro Braga.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Vila Velha, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Primatas. 2. Virologia veterinária. 3. Zoonoses. 4. Infecção - Doenças. I. Braga, Fabio Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 569.8

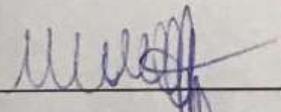
MARIA CRISTINA VALDETARO RANGEL

**AVALIAÇÃO DE ENDOPARASITAS E AGENTES VIRAIS EM
Callithrix geoffroyi DE ÁREAS ANTROPISADAS DA GRANDE
VITÓRIA**

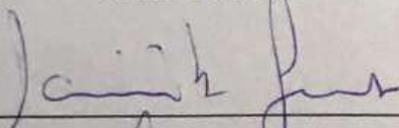
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestra em Ciência Animal.

Aprovada em 06 de março de 2017,

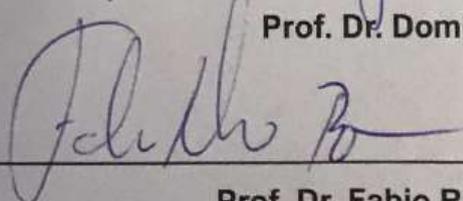
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Moacir Carretta Júnior (UVV)



Prof. Dr. Dominik Lenz (UVV)



Prof. Dr. Fabio Ribeiro Braga (UVV)

Orientador

AGRADECIMENTOS

À minha família, que nunca mediu esforços para me apoiar e incentivar em todas as minhas escolhas, inclusive as acadêmicas. Meu eterno agradecimento por tudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo, que possibilitou a realização deste trabalho.

À Universidade Vila Velha e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Ao meu orientador Dr. Fábio Ribeiro Braga por ter aceitado o desafio de trabalharmos juntos em uma área nova para ambos, sempre presente e atencioso, me mostrando que é possível alcançar os objetivos na vida.

Ao meu coorientador Dr. Fernando Vicentini pela disponibilidade, paciência e carinho mesmo com todas as dificuldades que enfrentamos, não mediu esforços para ajudar e compartilhar seus conhecimentos, gratidão por tudo.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do CEUNES da UFES de São Mateus por todo empenho e dedicação nas análises das amostras, em especial: Iago Mello, Déborah Jacome Rodrigues, Carliane Nogueira dos Passos, Débora Meneses Souza e Mayara Caetano.

À equipe do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Espírito Santo pela parceria para que os exames de detecção da raiva fossem realizados.

As amigas e companheiras de necropsia: Ana Paula Jejesky de Oliveira, Daniela Neris Nossa, Thalita Corrêa e Viviani Fiorot. Vocês foram o incentivo nas horas de desânimo.

A Perla Akiyama, por todos os momentos de ombro amigo e carinho.

Aos funcionários da UVV Carlos Roberto Paiva, Irene da Silva e Lourdes Pereira da Silva pelas inúmeras ajudas em todos os momentos.

Ao Dr. Balazs Harrach da Academia de Ciências da Hungria; Dr. Gyozo Viktor Kajan, Dra. Maria Benko e o Dr Andor Doszpoly pelo apoio e credibilidade dado a pesquisa.

À Concessionária Rodosol e Equipe Sinhá Laurinha pela parceria com a UVV que destinavam os animais atropelados, em especial a bióloga e amiga Franciane Almeida da Silva por todos estes anos de parceria e confiança.

Ao meu maior exemplo de profissional, companheiro e amigo Dr. João Luiz Rossi Junior por me incentivar, apoiar e dar todo o suporte para que as coisas dessem certo. Meu amor é teu.

Aos animais atropelados que perderam a vida, mas que se tornaram um ganho científico para que sua espécie possa ser melhor compreendida e assim preservada.

SUMÁRIO

Resumo	1
Absctract	2
Introdução	3
Adenovírus	7
Vírusda raiva	10
Área de estudo	12
Referências	13
Objetivos	17
Objetivos específicos	18
Capítulo 1: Levantamento da ocorrência do vírus rábico em população silvestre de saguis-da-cara-branca <i>Callithrix geoffroyi</i> (Humboldt, 1812) no sudeste do Brasil	19
Resumo	19
Introdução	20
Material e métodos.....	22
Resultados e discussão.....	23
Considerações finais.....	24
Referencias	25
CAPÍTULO 2: Levantamento da ocorrência de adenovírus em população silvestre de saguis-da-cara-branca <i>Callithrix geoffroyi</i> (Humboldt, 1812) nos sudeste do Brasil.	30
Resumo	31
Introdução	32
Material e métodos.....	34
Resultados e discussão.....	35
Referências	37
Anexo	40

RESUMO

VALDETARO RANGEL, MARIA CRISTINA, MSc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2017 **AVALIAÇÃO DE ENDOPARASITAS E AGENTES VIRAIS EM *Callithrix geoffroyi* DE ÁREAS ANTROPISADAS DA GRANDE VITÓRIA.** Orientador: Fábio Ribeiro Braga, Coorientador: Fernando Vicentini.

O conhecimento das doenças infecciosas em animais selvagens desempenha um papel fundamental tanto na conservação das espécies como na saúde pública, uma vez que a maioria das doenças infecciosas está associada à zoonoses. O papel de muitas zoonoses na cadeia de infecção ainda é pouco compreendido. Infecções por adenovírus e raiva já foram descritas em diversas espécies de mamíferos. Primatas não-humanos são reservatórios de vários agentes infecciosos, e tem grande importância para a saúde pública devido à sua proximidade com os seres humanos em áreas rurais e urbanas. Foram examinadas amostras fecais de 50 espécimes de saguis para adenovírus e vírus rábico, provenientes de atropelamento na rodovia ES-060 Duas amostras (4%) foram positivas para Adenovírus e todas as amostras deram resultados negativos para o vírus rábico. O estudo sugere que a ocorrência do vírus deve ser investigada em outras localidades, principalmente em regiões mais próximas aos locais que já foram notificados casos de raiva, e que o uso de animais atropelados é viável para a melhor compreensão da saúde da vida silvestre. A investigação de doenças infecciosas em animais silvestres tem importante papel em determinar o conjunto de espécies suscetíveis ao mesmo agente infeccioso e estabelecer a possível transmissão de doenças entre espécies selvagens e seu potencial zoonótico. A detecção de duas famílias de adenovírus na mesma espécie hospedeira impacta fortemente o conceito de transmissão e disseminação. O uso de animais mortos em estudos científicos facilita o acesso a material biológico, tornando a perda antropogênica de espécimes em ganho científico, contribuindo para a investigação e monitoramento de infecções virais em espécies selvagens.

Palavras chave: infecção, virologia, zoonoses e primatas.

ABSTRACT

VALDETARO RANGEL, MARIA CRISTINA, MSc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2017. **Evaluation of endoparasites and viral agents in *Callithrix geoffroyi* of antropised areas of the Vitória.** Advisor: Fábio Ribeiro Braga, Co-advisor: Fernando Vicentini.

Knowledge of infectious diseases in wild animals plays a key role both in species conservation and in public health, since most infectious diseases are associated with zoonoses. The role of many zoonoses in the chain of infection is still poorly understood. Adenovirus and rabies infections have been described in several mammalian species. Primates-nonhumans are reservoirs of various infectious agents, and are of great importance to public health because of their proximity to humans in rural and urban areas. Fecal specimens of 50 specimens of adenovirus and rabies virus marmoset specimens from carcasses on the ES-060 highway were examined. Two samples (4%) were positive for Adenovirus and all samples tested negative for rabies virus. The study suggests that the occurrence of the virus should be investigated in other localities, especially in regions closer to sites where rabies has been reported, and that the use of trampled animals is feasible for a better understanding of wildlife health. Research into infectious diseases in wild animals plays an important role in determining the range of species susceptible to the same infectious agent and in establishing the possible transmission of diseases among wild species and their zoonotic potential. Detection of two adenovirus families in the same host species strongly impacts the concept of transmission and dissemination. The use of dead animals in scientific studies facilitates access to biological material, making the anthropogenic loss of specimens to scientific gain, contributing to the investigation and monitoring of viral infections in wild species.

Key words: infection, virology, zoonoses and primates.

1. INTRODUÇÃO

Espécie endêmica da Mata Atlântica, o sagui-de-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*, Humboldt, 1812), tem como hábito dedicar grande parte do seu tempo para alimentação durante a manhã, forrageando nas horas quentes do dia. Sua alimentação é composta de frutos, seiva vegetal, insetos, pequenos répteis e anfíbios (Passamani, 1998). Mesmo bem adaptado às matas degradadas, o *C. geoffroyi* necessita de florestas nativas para sobreviver.

O avançado processo de desmatamento e interferências antrópicas na vegetação nativa do Brasil tem ameaçado a espécie (Mendes, 1997), causando fragmentação e perda do hábitat (Mendes, 1997; Oliveira *et al.* 2006). Segundo a lista vermelha da IUCN (União para a Conservação Mundial), é uma espécie que se encontra vulnerável (IUCN/SSC 2007, Bicca-Marques *et al.*, 2006). O número de indivíduos por grupo pode variar, podendo apresentar 2 a 13 indivíduos (Bicca-Marques *et al.*, 2006), normalmente com uma fêmea reprodutora e um macho dominante (Barbosa e Mota 2004; Bicca-Marques *et al.*, 2006).

A estrutura social, apesar de ainda não ser totalmente entendida, é composta por um casal reprodutor dominante em relação aos demais membros do grupo. Apesar dessa dominância, os demais membros do grupo não apresentam hierarquia bem definida (Decanini, 2006), e em grupos estabelecidos de *Callithrix*, a agressividade é rara (Decanini, 2006; Digby *et al.*, 2007). O casal reprodutor apresenta alto índice de interação social e forma laço afetivo, sendo essas interações importantes em alguns aspectos do sistema social, como cuidado parental, defesa do território e forrageio (Barbosa e Mota, 2004).

Algumas espécies de saguis podem ocupar matas próximas às áreas residenciais, onde se aproximam à procura de alimento. A aproximação frequente dos animais selvagens para com os seres humanos e animais domésticos geram uma série de questões, já que os primeiros podem tornar-se habituados e até dependentes da presença humana (Paula *et al.*, 2005). Um fator preocupante do ponto de vista da saúde é a proximidade filogenética da espécie com a espécie humana, devido à presença de parasitos e vírus (Melo, 2004).

Por compartilharem características genéticas e fisiológicas muito semelhantes aos seres humanos, os primatas-não-humanos têm sido amplamente utilizados em pesquisa (Hoshino *et al.*, 2006).

Doenças infecciosas são uma ameaça para a conservação dos animais selvagens e para a saúde pública. Fatores que estão relacionados com as atividades antrópicas que são consequência do aumento da densidade humana e dos animais domésticos ao redor de áreas protegidas, propiciam o maior contato das populações de animais silvestres, domésticos e com a espécie humana, estreitando a proximidade e a possibilidade de transmissão de diversas doenças (Cleaveland *et al.*, 2001 e Barbosa *et al.*, 2011).

Problemas de saúde em animais silvestres em ambiente natural podem e devem ser identificados e tratados sempre houver necessidade (Rossi *et al.*, 2013). A realização, sempre que possível, de métodos moleculares, sorológicos e parasitológicos, juntamente com exames clínicos e complementares seria ideal para a realização dos estudos sobre a exposição de animais selvagens a agentes patogênicos, porém é importante ressaltar que o diagnóstico positivo de uma espécie ou indivíduo infectado não definirá a sua importância na cadeia de transmissão, especialmente considerando-se que a rede de transmissão de patógenos tem variações diversas (Jorge *et al.*, 2010).

Estudos multidisciplinares de longo prazo, que envolvem aspectos ecológicos e monitoramento de populações de forma contínua, aliados à pesquisa da ocorrência de patógenos, para determinação das relações entre estes fatores, poderão determinar de forma efetiva a importância de agentes infecciosos para a conservação das espécies, assim como sua importância no ciclo epidemiológico dos agentes que afetam o homem e animais domésticos (Jorge, 2010).

Grande parte das enfermidades emergentes humanas vem de origem animal e dessa forma, animais selvagens podem agir como reservatórios de agentes que infectam animais domésticos e seres humanos (Taylor *et al.*, 2001; Hydon *et al.*, 2002). Declínios significativos nas populações selvagens podem ocorrer por causa de doenças provenientes de animais domésticos e de seres humanos (Daszak, 2000).

As zoonoses podem ser de origem bacteriana, viral ou parasitária (Kahn, 2006). Uma das principais causas de morbidade em primatas-não-humanos, com alta mortalidade em colônias é a doença diarreica, de origem viral (Wang *et al.*, 2007).

Dentre os hospedeiros vertebrados de agente virais os primatas não humanos desempenham o papel de animais “sentinelas” na vigilância epidemiológica e atuam como indicadores e da presença de vírus de interesse à saúde pública (Svoboda, 2007).

Uma das zoonoses reemergentes da atualidade que tem gerado grande preocupação com relação à saúde humana e dos animais da atualidade é a Febre Amarela que, segundo o Ministério da Saúde foram confirmados 263 casos da doença até o mês de fevereiro de 2017, sendo ao todo notificados 1.258 casos suspeitos, 882 em investigação e 113 foram descartados. Dos 200 óbitos notificados, 89 foram confirmados, 108 ainda são investigados e 3 foram descartados. Os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Tocantins e Rio Grande do Norte continuam com casos em investigação e/ou confirmados, sendo o maior surto já registrado no país até hoje (Ministério da Saúde, 2017).

No caso dos primatas-não-humanos são mais de 80 animais encontrados mortos com suspeita de Febre Amarela, os animais são de origem da região Sul e Noroeste do estado do Espírito Santo (Fonte: Jornal G1 online, 2017). Em um período de dez anos (2000-2010) foram registrados 324 casos com 155 óbitos em destacando então a alta taxa de letalidade da doença (Brasil, 2011).

No Brasil a morte de animais silvestres por colisões com veículos automotores nas rodovias é uma realidade cada vez mais presente e que teve crescimento devido à fragmentação de habitats para construção de rodovias (Cleaveland *et al.*, 2001). A fragmentação de habitats e disponibilidade de alimento ao longo da rodovia são dois fatores que fazem com que a ocorrência das mortes por colisões sejam frequentes, e o sagui é um dos animais que apresenta maior ocorrência nesses acidentes (Vieira, 1996; Clevenger *et al.*, 2003).

Estudos sobre a saúde dos animais silvestres em vida livre permitem avaliar fatores ecológicos e epidemiológicos que podem influenciar na distribuição de infecções entre populações, e a utilização de animais mortos provenientes de colisões nas rodovias é uma alternativa para que pesquisas possam ser feitas sem a necessidade de captura dos animais em vida livre (Fiorello *et al.*, 2007; Majláthová *et al.*, 2007).

ADENOVÍRUS

Pertencentes a família Adenoviridae, os Adenovírus (AdV) teve essa denominação originada do primeiro vírus do grupo, isolado de células adenoides humanas em 1953, durante estudos de doenças respiratórias agudas (Moraes *et al.*, 2008; Santos, 2008). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) reconhece cinco gêneros: Atadenovírus, Aviadenovírus, Ichtadenovírus, Mastadenovírus e Siadenovírus, que possuem os vertebrados como hospedeiros (Figura 1). Cada espécie de AdV infecta uma única espécie hospedeira porém, estudos recentes sugerem a transmissão interespecífica (Penzes *et al.*, 2014; Loustalot *et al.*, 2015; Kohl *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011).

Para classificação em nível de espécie o hospedeiro original (Figura 1), a distância filogenética em diferenças na sequência do gene de DNA polimerase, a organização do genoma e as propriedades imunológicas são utilizados como base (Harrach, 2014). Mastadenovirus e Aviadenovírus são os AdV que infectam mamíferos e aves exclusivamente; já os Atadenovírus infectam aves, répteis e marsupiais (Harrach, 2014) (Figura 2). São vírus que não possuem envelope e apresentam um capsídeo bem organizado, resistem por longos períodos em meio líquido e até mesmo em agentes químicos desnaturantes, dependendo da concentração e do tempo de incubação (Gordon *et al.*, 1993; Mattner *et al.*, 2008). Alguns adenovírus podem apresentar resistência ao processo de tratamento de água em redes de esgoto (Mena e Gerba, 2009)

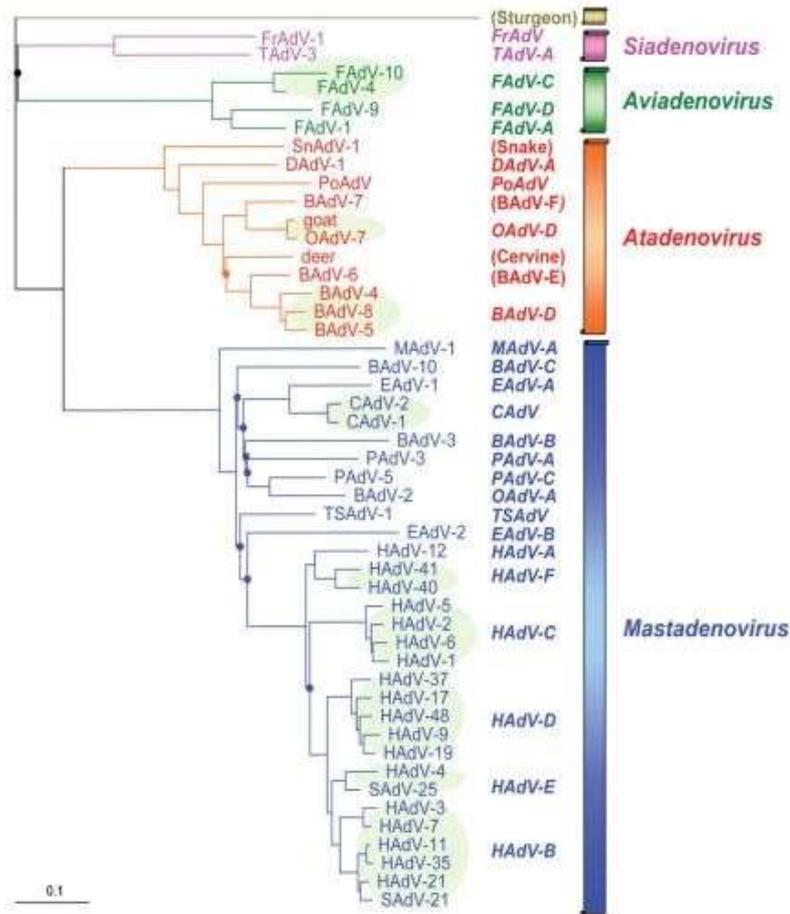


Figura 1. Árvore filogenética da família Adenoviridae. Dentro dos gêneros: os vírus que pertencem à mesma espécie (círculos ovais verdes). As abreviações dos nomes dos vírus são indicadas ao final de cada ramificação. A primeira letra indica o nome do animal do qual foi isolado o vírus: B (bovino); C (canino); D (pato); F (galinha), Fr (sapo); H (humano); M (murino); O (ovino); P (suíno); Po (gambá); Sn (serpente); T (peru) e TS (primata primitivo).

Doenças respiratórias, gastrointestinais, conjuntivites estão associadas à sintomatologia dos adenovírus, que podem ser sintomáticos ou assintomáticos. A transmissão direta ocorre pela via fecal-oral e por meio de aerossóis de forma indireta. Em pacientes imunossuprimidos o quadro pode se tornar ainda mais grave (Ebner *et al.*, 2006; Schrenzelet *et al.*, 2005).

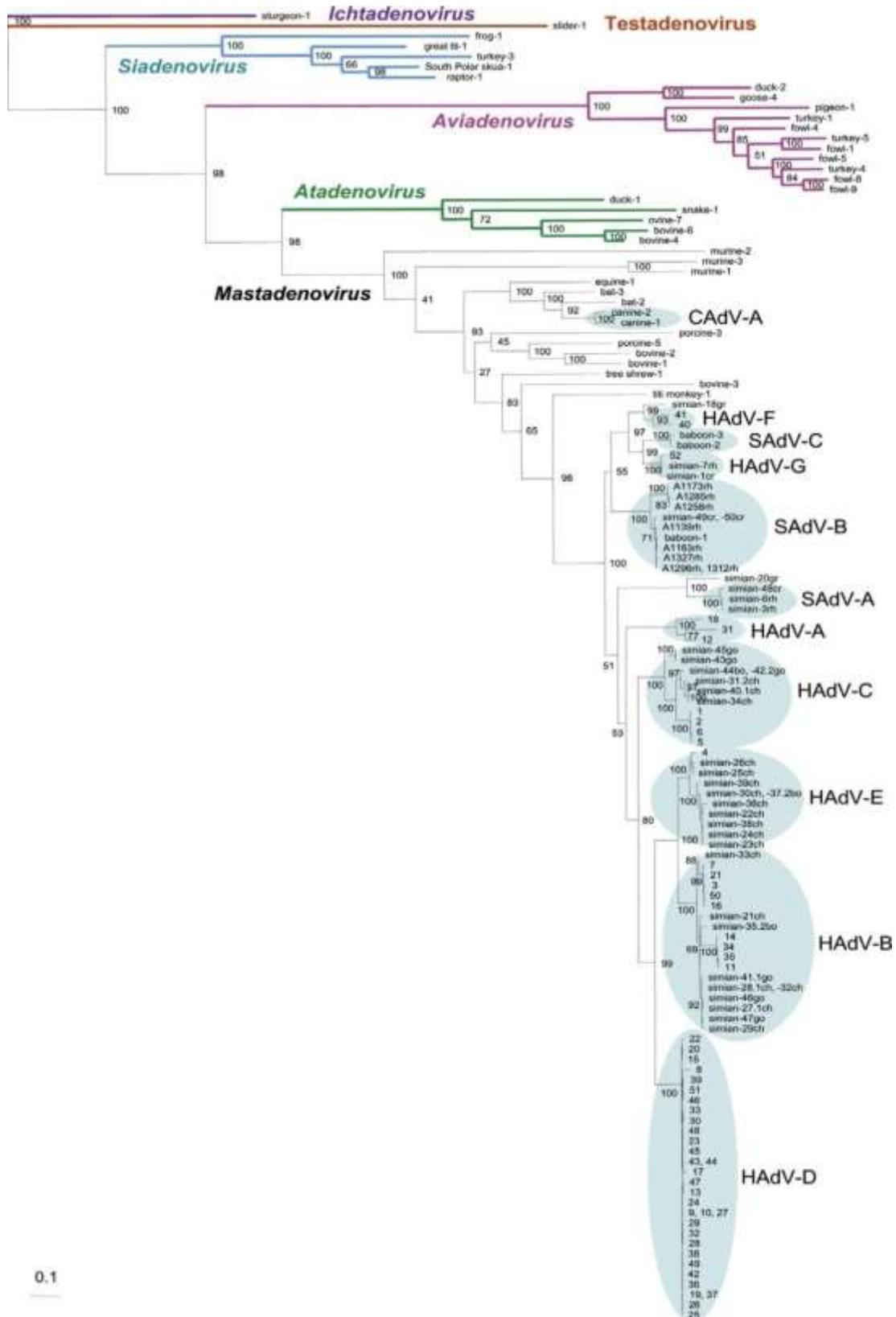


Figura 2: Diversidade filogenética de adenovírus representando seus gêneros *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus* e *Testadenovirus*, *Atadenovirus* e *Siadenovirus*. Fonte: Harrach B, (2014).

VÍRUS DA RAIVA

Enfermidade zoonótica, a raiva ocorre pela ação de um vírus de RNA do gênero do *Lyssavírus*, envelopado com formato de dupla membrana fosfolipídica, com espículas de composição glicoproteica (Fenner *et al.*, 1992). O gênero *Lyssavirus* é composto por sete genótipos, e o vírus da Raiva (RABV) pertencente ao genótipo 1, é o único do gênero que causa a raiva (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE, 2009).

Por ser um vírus envelopado, apresenta sensibilidade a detergentes e solventes lipídicos tais como, por exemplo, o éter e o clorofórmio. Apresenta baixa resistência fora do hospedeiro, sendo rapidamente inativado a temperaturas altas (acima de 50° C). Tem sensibilidade a luz solar, radiação ultravioleta, hipoclorito de sódio, soda cáustica (2%), sabões, formalina (10%), glutaraldeído (2%), fenóis (5%), ácidos e bases em extremos de pH. O vírus se mantém estável em temperaturas abaixo de 4°C, e a -70°C pode se manter viável indefinidamente (Batista *et al.*, 2007).

Devido à evolução letal e ao número elevado de casos em humanos, a doença é um problema de saúde pública em todo o mundo (Rupprecht *et al.*, 2002). Estima-se que, anualmente mais de 55 mil pessoas morrem infectadas com o vírus da raiva em todo mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Grande parte dos diagnósticos é baseado apenas em sinais clínicos, tornando muitas vezes a doença pouco notificada. A maioria dos casos notificados ocorreram na Ásia e na África, porém a doença está se expandindo pelo mundo (Clifton, 2010).

Em vários países europeus, as principais fontes de infecção e reservatórios do vírus rábico são animais silvestres. Após a criação de um programa de prevenção nos Estados Unidos, a ocorrência da doença em animais domésticos teve queda, porém o número de casos em animais silvestres teve um aumento significativo (Rupprecht *et al.*, 1995).

Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde dos 428 casos de raiva humana registrados no Brasil entre os anos de 1999 e 2012, 28% foram causados por animais silvestres, dentre eles, morcegos e saguis (BRASIL, 2013). No Brasil, a raiva é endêmica em diversos estados, e no ciclo silvestre observa-se um maior número de registros em casos de canídeos e primatas-não-humanos, sendo o sagui (*Callithrix spp*) um dos principais reservatórios silvestres do vírus (Albas *et al.*, 2011; Wada *et al.*, 2011;

Aguiar, 2011). A forma mais comum de exposição ao vírus é por meio de inoculação do vírus pela mordida do animal infectado, porém, a exposição sem mordida também pode acontecer quando o vírus é introduzido em cortes na pele ou em membranas mucosas. A transmissão do vírus entre humanos se dá por meio de transplante de órgãos ou tecidos infectados com o vírus rábico (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005).

No Nordeste do Brasil, vários casos de raiva humana têm sido associados a primatas-não-humanos e em um dos casos um sagui atacou um homem com uma mordida ao se aproximar da residência. Em outros casos, os animais eram mantidos como animais de estimação, prática bastante comum no Nordeste brasileiro. (Morais, 1998; De Sousa *et al.*, 2013).

ÁREA DE ESTUDO

A Rodovia do Sol atravessa os municípios de Vitória, Vila Velha e Guarapari (Figura 3). A vegetação marginal da rodovia é composta por Restinga, sendo uma área fundamental para a biodiversidade (Incaper, 2015). Ao longo do Sistema Rodovia do Sol existem três importantes reservas ambientais: o Parque Natural Municipal de Jacarenema (307 ha), Área de Preservação Ambiental de Setiba (12.960 ha) e Parque Estadual Paulo César Vinha (1,500 ha).

A Rodosol monitora 67,5 km de pista, a cada 1h e 30min, 24 horas por dia, para averiguação da ocorrência de incidentes, acidentes e atropelamentos de fauna. Os animais que são encontrados mortos e/ou vivos são prontamente recolhidos, registrados quanto ao local, hora da ocorrência e espécie. As carcaças dos animais mortos são identificadas, congeladas e posteriormente são encaminhadas para instituições parceiras de pesquisa.



Figura3:Mapa do Brasil e do Estado do Espírito Santo, indicando a extensão da Rodovia do Sol. Fonte:www.e-pedagio.com.br.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T.; COSTA, E.C.; ROLIM, B.N.; ROMIJN, P.C.; MORAIS, N.B.D.; & TEIXEIRA, M.F.D.S. Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo de sagui (*Callithrix jacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 356-363. 2011.
- ALBAS, A.; SOUZA, E.A.N.D.; PICOLO, M.R.; FAVORETTO, S.R.; GAMA, A.R.D., & SODRÉ, M.M. Os morcegos e a raiva na região oeste do Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 201-205. 2011.
- BARBOSA, A.D.; DA SILVA M.; NELSON R.; DE MAGALHÃES, D.F. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 14, n. 1, 2, 3, p. 1-9, 2011.
- BARBOSA, M.N.; MOTA.T.S. "A influência da rotina de manejo na interação social entre pares heterossexuais do sagui, *Callithrixjacchus* (Linnaeus, 1758). *Revista Brasileira de Zootecias* 6 : 2943. 2004.
- BATISTA, H.B.C.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Raiva: uma breve revisão. *Acta ScientiaeVeterinariae*, v. 35, p. 125-144, 2007.
- BICCA-MARQUES, J.C.;SILVA, V.M.; e GOMES, D.F. Ordem Primates. Em: Mamíferos do Brasil, Reis, N. R., Peracchi, A. L., Pedro, W. A., Lima, I. P. (eds.), 437 p. Londrina-PR. 2006.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION CDC.Human rabies - Mississippi.Morbidity and Mortality Weekly Report, v. 55, n. 8, p. 207–208, 2005.
- CHEN E.C.; YAGI S.; KELLY K.R; MENDOZA S.P.; MANINGER N.; Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoSPathog*.jul; 7 (7): e1002155. doi:10.1371/journal.ppat.1002155. 2011.
- CLEAVELAND, S.M.K.;LAURENSEN, TAYLOR, L.H. "Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 356.1411 : 991-999. 2001.
- CLEVENGER, A.P., CHRUSZCZ, B., & GUNSON, K.E. Spatial patterns and factors influencing small vertebrate fauna road-kill aggregations. *Biological conservation*, 109(1), 15-26. 2003.
- CLIFTON, M. How not to fight a rabies epidemic: a history in Bali. *Asian Biomed*, v. 4, p. 663–670, 2010.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *science*, v. 287, n. 5452, p. 443, 2000.

DAVISON A.J.; BENKO M.; HARRACH B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of Genetic Virology*. ago; 84: 2895–2908. doi: 10.1099/vir.0.19497- 0. 2003.

DE SOUSA, M.S., RIBEIRO, W.L.C., DUARTE, N.F.H., ANDRE, W.P.P., & SANTIAGO, S. L.T.. Transmissão da Raiva por Sagui (*Callithrix jacchus*) no Estado do Ceará, Brasil.: Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA*, 7(2), 270-287. 2013.

DECANINI, D.P. Socialidade em Saguis do Cerrado (*Callithrix penicillata*): Estratégias comportamentais nas relações intra e intergrupo. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. 2006.

DIGBY L.J.; FERRARI S.F.; SALTZMANN, W. Callitrichines: the role of competition in cooperatively breeding species. In: Campbell CJ, Fuentes AF, Mackinnon KC, Panger M, Bearder S (Ed) *Primates in Perspective*. Oxford University Press, pp. 85-106. 2007.

EBNER K.; RAUCH M.; PREUNER S.; LION T. Typing of Human Adenoviruses in Specimens from Immunosuppressed Patients by PCR-Fragment Length Analysis and Real-Time Quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2006 ago; 44 (8): 2808-2815. doi: 10.1128/JCM.00048-06. 2006.

FENNER, R.; BACHMANN, P.; GIBBS, E.P; MURPHY, F.A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. *Virologia Veterinária*. Zaragoza; Acribia, p 551-556, 1992.

FIORELLO, C.V.; NOSS, A.J.; DEEM, S.L.; MAFFEI, L.; DUBOVI, E.J. Serosurvey of small carnivores in the Bolivian Chaco. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(3), 551-557. 2007.

G1 notícias : <http://g1.globo.com/espírito-santo/noticia/2017/01/febre-amarela-sobe-para-80-o-numero-de-macacos-mortos-no-es.html>. Acesso em: fevereiro de 2017.

GORDON, Y.J.; GORDON, R. Y.; ROMANOWSKI, E.; & ARAULLO-CRUZ, T.P. Prolonged recovery of desiccated adenoviral serotypes 5, 8, and 19 from plastic and metal surfaces in vitro. *Ophthalmology*, 100(12), 1835-1840. 1993.

HARRACH B. Adenoviruses: general features. In: Reference module in Biomedical Sciences. Amsterdam: Elsevier. p.1-10. doi:10. 1016/B978-0- 12-801238-3.02523-X. 2014.

HAYDON, D. T., CLEVELAND, S., TAYLOR, L. H., & LAURENSEN, M. K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases*, 8(12), 1468-1473. 2002.

HOSHINO, Y.; HONMA, S.; JONES, R.W.; SANTOS, N.; NAKAGOMI O.; NAKAGOMI T.; KAPIKIAN A.Z.; THOULESS, M.E. A rotavirus strain isolated from pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*) with diarrhea bears a P6[1]:G8 specificity. *Virology*, v. 345, n. 1, p. 1–12, Feb. 2006.

JORGE, R. S. P., ROCHA, F. L., JÚNIOR, J. A. M., & MORATO, R. G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *CEP*, 21040, 900. 2010.

KAHN, L.H. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 4, p. 556-561, April 2006.

- KOHL C.; VIDOVSZKY M.Z.; MÜHLDORFER K.; DABROWSKI P.W.; RADONIĆ A.; NITSCHKE A. Genome analysis of bat adenovirus 2: indications of interspecies transmission. *Journal Virology*. nov; 86 (3): 1888–1892. doi:10.1128/JVI.05974-11. 2011.
- LOUSTALOT F.; CREYSSELS S.; SALINAS S.; BENKŐ M.; HARRACH B.; MENNECHET F.J.D.; KREMER E.J.; Les adenovirus non-humains: Un risque zoonotique? *Médecine/sciences.dez*; 31(12):1102-8. doi: 10.1051/medsci/20153112013. 2015.
- MAJLÁTHOVÁ, V.; HURNÍKOVÁ, Z.; MAJLÁTH, I.; & PEŤKO, B. Hepatozooncanis infection in Slovakia: imported or autochthonous?. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), 199-202. 2007.
- MATTNER, F.; SYKORA, K. W.; MEISSNER, B.; & HEIM, A. An adenovirus type F41 outbreak in a pediatric bone marrow transplant unit: analysis of clinical impact and preventive strategies. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(5), 419-424. 2008.
- MELO, F. R. Primatas e áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade no vale do rio Jequitinhonha, Minas Gerais. Tese de Doutorado, 2004.
- MENA, K. D., & GERBA, C. P. Waterborne adenovirus. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 133-167). Springer New York. 2009.
- MENDES, S. Padrões biogeográficos e vocais em *Callithrix* do Grupo Jacchus (Primates, Callitrichidae). Doctoral dissertation, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1997.
- MINISTERIO DA SAÚDE
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27648-ministerio-da-saude-atualiza-casos-notificados-de-febre-amarela-no-pais-17-02>.
 Acesso em : 28 de fevereiro de 2017.
- MORAIS, N.B. Wild rabies in Ceará and its implications for public health. *Virus: reviews and research*. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 1998, São Lorenzo. Proceedings v. III, São Lorenzo, Mato Grosso, v. 3, suppl. 1. 1998.
- MORAES M.P.; COSTA P.R.S. Adenoviridae. In: Flores, E.F. (org.). *Virologia Veterinária*. 1. ed. Santa Maria: editora UFSM. p. 413-431. 2008.
- OLIVEIRA, A.G.D.; GALATI, E.A.B.; OLIVEIRA, O.D., OLIVEIRA, G.R.D., ESPINDOLA, I.A.C., DORVAL, M.E.C., & BRAZIL, R.P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 8, p. 869-874, 2006
- PASSAMANI, M. "Activity budget of Geoffroy's marmoset (*Callithrix geoffroyi*) in an Atlantic forest in southeastern Brazil." *American Journal of Primatology* 46.4: 333-340. 1998.
- PAULA H.M.G.; TÁVORA R.S.; ALMEIDA, M.V.; PELEGRINI L.S.; SILVA G.V.; ZAGANINI R.L.; LUCINDO A. Estudos Preliminares da Presença de Saguis no Município de Bauru, São Paulo, Brasil. *Neotropical Primates* 13: 6-11. 2005.
- PÉNZES J.J.; MENÉNDEZ-CONEJERO R.; CONDEZO G.N.; BALL I.; PAPP T.; DOSZPOLY A. Molecular characterization of a lizard adenovirus reveals the first atadenovirus with two fiber genes and the first adenovirus with either one short or three

long fibers per penton. *Journal Virology*; 88(19): 11304-11314. doi: 10.1128/JVI.00306-14. 2014.

ROSSI JR, J.L., MENDES, C.M., DRUMOND, B., SIMONETTI, L.M., CRUZ, E., FERNANDES, S.L., & RANGEL, M.C.V. Manejo pós-captura de *Callithrix geoffroyi*(Humboldt, 1812) e soltura em fragmento de Mata Atlântica urbana em Vila Velha, ES. *CEP*, 29, 770. 2013.

RUPPRECHT, C.E. *et al.* The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? *Emerging Infectious Diseases*, v. 1, n. 4, p. 107-114, 1995.

RUPPRECHT, C.E.; HALON, C.A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 327-343, 2002.

SANTOS N.O.S. Viroses entéricas. In: Santos, NOS, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução a Virologia Humana*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 59-70. 2008.

SCHRENZEL M.; OAKS J.L.; ROTSTEIN D.; MAALOUF G.; SNOOK E.; SANDFORT C.; RIDEOUT B. Characterization of a New Species of Adenovirus in Falcons. *Journal Clinical Microbiology*. jul; 43 (7): 3402–3413. doi:10.1128/JCM.43.7. 2005.

SVOBODA, W. K. Vigilância de epizootias em primatas não humanos (PNH) como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de interesse em Saúde pública. 136 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

TAYLOR, L. H., LATHAM, S. M., & MARK, E. J. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 356(1411), 983-989. 2001.

VIEIRA, E. M. Highway mortality of mammals in central Brazil. *Ciência e Cultura*(São Paulo). São Paulo, 48(4), 270-272. 1996.

WADA, M.Y.; ROCHA, S. M.; & MAIA-ELKHOURY, A.N.S. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 20(4), 509-518. 2011.

WANG, Y.; TU, X.; HUMPHREY, C.; MCCLURE, H.; JIANG, X.; QIN, C.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. *Journal of Medical Primatology*, v. 36, n. 2, p. 101-107, 2007.

WOODS, L. M. Adenoviral diseases. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. (eds) *Infectious diseases of wild mammals*, 3. Ed. Ames: Iowa State University Press, p. 202–213, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2013: Rabies - Bulletin – Europe. 37, 2.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo fazer o levantamento da ocorrência de vírus rábico e adenovírus em uma população de saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) provenientes de Mata Atlântica, ao longo da Rodovia ES-060.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar exames necroscópicos em saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) provenientes de colisões por veículos automotores e recolhidos pela Concessionária da Rodovia do Sol para encaminhamento científico na Universidade Vila Velha.

Investigar DNAs viral de adenovírus realizado no laboratório de Microbiologia do CEUNES- UFES de São Mateus.

Investigar por meio de Técnica de Imunofluorescência direta e prova biológica por meio de inoculação intracerebral em camundongos o vírus da raiva em amostras de tecido nervoso de *Callithrix geoffroyi*, realizado pelo Laboratório de Diagnóstico do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo.

CAPÍTULO 1

O artigo científico foi confeccionado seguindo as Instruções aos Autores estabelecidas pela revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 1678-4162 (online).

Levantamento da ocorrência do vírus rábico em população silvestre de saguis-da-cara-branca *Callithrix geoffroyi* (Humboldt, 1812) no Sudeste do Brasil

Occurrence of Rabies virus in wild population of marmosets *Callithrix geoffroyi* (Humboldt, 1812) in southeastern Brazil

RESUMO

Zoonose causadora de uma encefalite aguda e letal, a raiva é transmitida por meio da inoculação do vírus presente na saliva de mamíferos de diversas espécies. No Brasil, a raiva silvestre é um desafio para a vigilância epidemiológica e já foi constatado um aumento significativo em casos humanos. Alguns dos principais reservatórios silvestres são: cachorro-do-mato (*Cerdocyonthus*), saguis (*Callithrix* sp) e morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*). Levando em consideração casos de positividade em saguis no Nordeste do Brasil, juntamente com o crescente aumento de casos em animais silvestres, este trabalho objetivou fazer um levantamento da ocorrência do vírus em uma população silvestre. Foram necropsiados 44 animais, provenientes de atropelamento na rodovia ES-060, todos da espécie *Callithrix geoffroyi*. O material coletado para análise do vírus rábico consistia em encéfalo, que foi acondicionado e identificado para posterior análise no Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF). As 44 amostras deram resultados negativos. O estudo sugere que a ocorrência do vírus deve ser investigada em outras localidades, principalmente em regiões mais próximas aos locais que já foram notificados casos de raiva, e que o uso de animais atropelados é viável para a melhor compreensão da saúde da vida silvestre.

Palavras-chave: zoonose, primatas-não-humanos, animais selvagens, raiva silvestre

INTRODUÇÃO

Nas últimas cinco décadas 60% dos patógenos humanos estudados e 75% das doenças emergentes que afetaram humanos são provenientes de zoonoses (Silva, 2009). Mesmo sendo uma enfermidade conhecida desde a antiguidade, a Raiva é uma das zoonoses que ainda causa sérios problemas à saúde pública nos diversos países em desenvolvimento. É uma doença infectocontagiosa ocasionada por um vírus neurotrópico que acomete todos os mamíferos, levando a uma encefalomielite aguda com alta mortalidade (Kouznetzoff *et al.*, 1998; Kotaitet *et al.*, 2009).

A transmissão do vírus pode ocorrer pela saliva de animais infectados, ocasionando um quadro de encefalomielite aguda, progressiva com alto nível de mortalidade (Kotaitet *et al.*, 2009). O vírus pertence à ordem Mononegavirales da família Rhabdoviridae e do gênero Lyssavirus, com 7 genótipos atualmente identificados, sendo que no Brasil apenas o genótipo 1 (Rabies 1,2 virus – RABV) foi descrito (Badraneet *et al.*, 2001). Este genótipo é o mais amplamente distribuído e tem maior importância epidemiológica por causa da sua associação com um maior número de casos de encefalite por Lyssavirus em humanos em comparação aos outros genótipos (Oliveira, 2009)

Possui características como RNA de fita simples envelopado e morfologia que se assemelha a um projétil de revólver, com tamanho de 75nm de diâmetro e de 100 a 300nm de comprimento. Seu envoltório possui uma camada dupla de membrana fosfolipídica com espículas glicoproteicas com um tamanho aproximado de 9nm. (Kotaitet *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2001; MAPA, 2005; Favorettoet *et al.*, 2002).

Para o diagnóstico *post mortem* existem diferentes técnicas, uma delas é a de imunofluorescência direta, é realizada pelo exame do encéfalo do animal suspeito, utilizando anticorpos fluorescentes contra o vírus rábico. A prova biológica para o isolamento viral é o exame confirmatório preconizado pelo Ministério da Saúde e é realizado por meio de inoculação em camundongos ou cultivo celular (Levinson, 2010). Os principais reservatórios silvestres do vírus rábico no Brasil são o cachorro-do-mato (*Cerdocyonthous*), o sagui (*Callithrixsp*) e o morcego hematófago (*Desmodusrotundus*)(Kotaitet *et al.*, 2007; Sodr e *et al.*, 2010; Aguiar *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a cada 15 minutos uma pessoa morre infectada pelo vírus da raiva. De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde dos 428 casos de raiva humana registrados no Brasil durante os anos de 1999 e 2012, 28% foram causados por agressões de animais silvestres, incluindo: morcegos, saguis, cachorros-do-mato e mão-pelada (Brasil, 2013). A raiva silvestre assumiu maior importância devido aos hábitos sinantrópicos dos animais silvestres, que com o passar do tempo alcançaram as áreas urbanas (Kotaitet *et al.*, 2007). O diagnóstico laboratorial é uma das ferramentas de vigilância de fundamental importância (Brasil, 2012). Entre 1990 e 2010 foram relatados 35 casos de raiva em saguis no Estado do Ceará (Favoretto *et al.*, 2006; Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, 2010), local onde estes animais representam um grande problema em relação ao controle da doença (Moraes *et al.*, 2010), principalmente pelo fato de haver a posse destes como animais de estimação (Aguiar *et al.*, 2011).

De 2000 a 2009 foram registrados 163 casos de raiva em humanos no Brasil e 5 destes, tiveram como fonte de infecção primatas (Wadaet *et al.*, 2011). A transmissão da raiva pode ocorrer também entre indivíduos de espécies diferentes que não são considerados reservatórios naturais do vírus e é um fenômeno conhecido como “spillover” e resulta do contato interespecies que pode levar à determinação de novas variantes do vírus (Corona, 2016).

Mesmo que todos os mamíferos sejam suscetíveis à infecção, apenas algumas espécies tem maior importância como reservatório da doença (CDC, 2015). Sabe-se que os primatas-não-humanos são reservatórios de diversos agentes infecciosos com implicações para a saúde pública (Souza, 2012). Em virtude da grande diversidade de espécies no Brasil, é necessário que pesquisas com as diversas espécies sejam realizadas com mais frequência, visando o melhor conhecimento dos patógenos e das enfermidades relacionadas, que servirão futuramente de base para trabalhos de conservação das espécies e prevenção de zoonoses (Catão-Dias, 2003)

Alguns estudos antigênicos e genéticos com os isolados de vírus da raiva nessa espécie mostraram que a variante encontrada é a mais divergente já isolada no Brasil (Favoretto *et al.*, 2002). O *Callithrix* é uma espécie de sagui encontrada principalmente no Brasil (Accioly, 2000), sendo a espécie *Callithrix geoffroyi* (Humboldt, 1812) conhecida, popularmente, como

sagui-de-cara-branca endêmica da Mata Atlântica. É um primata neotropical que ocorre no sul da Bahia, região leste de Minas Gerais e, praticamente, em todo estado do Espírito Santo (Passamani e Rylands, 2000).

É uma espécie que investe grande parte do tempo forrageando nas horas mais quentes do dia. Sua alimentação consiste em frutos durante o período da manhã, seiva vegetal, nas primeiras horas do dia e no final da tarde pequenos répteis e insetos, que constituem fonte de proteínas (Passamani e Rylands, 2000).

MATERIAL E METODOS

Foram coletadas amostras de encéfalos em 44 exemplares de *C. geoffroyi* provenientes de atropelamento. Dos 44 animais, 27 eram machos e 17 fêmeas. Apesar de serem animais provenientes de atropelamento, todos estavam com o crânio íntegro. O material coletado durante a necropsia foi embalado e identificado de acordo com as normas de biossegurança (Comissão Técnica de Biossegurança, 2005) e transportado sob refrigeração de 2 a 8°C.

As amostras foram armazenadas numa temperatura de -20°C em freezer e posteriormente foram analisadas por meio da técnica de imunofluorescência direta e prova biológica por inoculação intracerebral em camundongos.

Os procedimentos que foram empregados no preparo e leitura das lâminas seguiram as diretrizes preconizadas por Dean *et al.*, (1996) com as alterações no período de incubação do conjugado propostas por Roeheet *al.*, (2002), anexo 1.

A leitura da reação foi executada no microscópio binocular de imunofluorescência da marca Zeiss®, equipado com uma lâmpada de vapor de mercúrio HBO 50, filtro excitador VGI e filtro barreira Zeiss® 43, no aumento de 400X em campo escuro. Cada impressão foi examinada independentemente e classificada por dois observadores sob sistema duplo- cego, considerando-se a modalidade de controle de vias de mensuração (Rouquayrol e Almeida 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Animais oriundos de atropelamento ficam expostos às variações de temperaturas até que sejam coletados, porém estudos tem demonstrado que a variação de temperatura tem pouca interferência nos exames para raiva, já que carcaças de animais que se encontravam em altas temperaturas e avançado estágio de putrefação apresentaram resultados positivos quando foram testados (Mcelhinney *et al.*, 2014; Beltranet *et al.*, 2014), descartando assim a possibilidade dos resultados deste estudo serem falsos negativos. Todas as 44 amostras foram negativas e apesar do resultado, é importante ressaltar que no Brasil a doença é endêmica em diversas partes do país, e no ciclo silvestre é observado um número maior de registros em canídeos e primatas-não-humanos (Albas *et al.*, 2011).

No Ceará os animais silvestres que apresentam importância emergente são o mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) e saguis (*Callithrix sp.*) (Araujo *et al.*, 2008), onde é comum a criação de *C. jacchus* como animal de companhia e já foram registrados casos de agressões com notificações de casos de Raiva humana. Só em 2005 foram registrados um total de 44 óbitos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, incluindo casos com ataques de saguis a humanos que mantinham como animais de companhia (Wadaet *et al.*, 2011), e devido a proximidade com as regiões onde são registrados casos positivos, faz-se necessário a investigação e controle do agente viral nas populações adjacentes.

Com uma mastofauna ampla e complexa, cada região do Brasil tem sua espécie de interesse envolvendo casos positivos para raiva (Silva *et al.*, 2012). O contato estreito entre humanos e saguis é um fator de risco (Aguilar *et al.*, 2011), principalmente porque esses animais se adaptam bem a ambientes urbanos e despertam o interesse da aproximação em parques e áreas onde ocorrem.

Determinar a incidência e distribuição de patógenos infecciosos em populações selvagens é uma necessidade urgente (Otto, 1998), principalmente porque o risco da ocorrência de uma determinada doença e o seu impacto sobre a biodiversidade depende do conhecimento epidemiológico dos agentes e das relações com os possíveis hospedeiros (Ballouet *et al.*, 2000). O vírus da raiva tem grande importância no que tange a saúde pública, mas também deve ser levado em consideração como ameaça da conservação de diversas espécies de mamíferos (Gascoyne *et al.*, 1993).

O monitoramento da circulação viral em animais selvagens ainda é muito escasso, e em 20 anos menos de 150 amostras foram analisadas no Espírito Santo até o ano de 2013 (Marinho, 2015), já neste estudo, 44 animais foram analisados em menos de um ano, sugerindo que o aproveitamento de carcaças para fins científicos é de grande valia para ajudar no monitoramento da saúde dessas espécies sem precisar que estes animais sejam capturados no seu habitat, aproveitando então de materiais que seriam descartados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A circulação do vírus da raiva em animais silvestres já foi relatada em saguis no Brasil, porém, a circulação deste vírus e as reais características devem ser mais bem investigadas. A utilização de material biológico de animais atropelados facilita o acesso às informações e pesquisas para compreender, monitorar e conhecer os agentes infecciosos das populações, sem que haja a necessidade de coleta de animais em vida livre, utilizando-se da perda ambiental para um ganho científico.

REFERENCIAS

ACCIOLY, A. P. C. Ecologia e comportamento de *Callithrixpenicillata* (Primates-Callitrichidae). repositorio.uniceub.br.2000.

ALBAS, A., SOUZA, E. A. N. D., PICOLO, M. R., FAVORETTO, S. R., GAMA, A. R. D., & SODRÉ, M. M. Os morcegos e a raiva na região oeste do Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 201-205. 2011.

AGUIAR, T.; COSTA, E. C.; ROLIM, B. N.; ROMIJN, P. C.; MORAIS, N. B. D.; TEIXEIRA, M. F. D. S. Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo de sagui (*Callithrixjacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 356-363. 2011.

AGUIAR D.F., T.; JÚNIOR, R. Q. B.; COSTA, E. C., ROLIM, B. N., ROMIJN, P. C.; DE MORAIS, N. B.; DA SILVA TEIXEIRA, M. F. Risco de transmissão da raiva humana pelo contato com saguis (*Callithrixjacchus*) no estado do Ceará, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, 19(3), 326-331. 2012.

AGUIAR, T.D.F. Risco de transmissão para o homem do vírus da Raiva oriundo de Saguis (*Callithrixjacchus*) na região metropolitana de Fortaleza, Ceará. 97p. Dissertação (Pós-graduação em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Ceará. 2011.

ARAUJO D.B.; MEDINA A.O.; CUNHA S.E.M.; FAVORETTO S.R.; DURIGON E.L. Estudo Epidemiológico do vírus da Raiva em mamíferos silvestres provenientes de área de soltura no litoral norte do estado de São Paulo, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 2008; Gramado. Gramado: Conbravet; p.35. 2008.

BALLOU, J.D.; LOWENSTINE, L.J.; CATÃO-DIAS, J.L.; ZICCARDI, M.; COOK, R.; CURRO, M.; DEIN, J.; WOODFORD, M.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; WILD, D. Report on modeling information. Proceedings of the Disease Risk Workshop – Omaha, Nebraska, USA. Edited by International Union for Conservation of Nature/Conservation Breeding Specialist Group. Pp.81-88, 2000.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; & TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Journal of virology*, 75(7), 3268-3276. 2001.

BELTRAN, F. J., DOHMEN, F. G., DEL PIETRO, H., & CISTERNA, D. M. Diagnosis and molecular typing of rabies virus in samples stored in inadequate conditions. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(08), 1016-1021. 2014.

BRASIL. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, n. 36, p. 23, 22 fev. 2012. Seção 1, pt. 1. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2013.

CATÃO-DIAS, J. L. "Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade." *Ciência e Cultura* 55.3 : 32-34. 2003.

CDC: Centers For Disease Control And Prevention: Rabies Homepage. Disponível em: <https://www.cdc.gov/> .Acesso em: 12/12/2016.

CORONA, T. F. "Investigação do vírus da raiva (Gênero Lyssavirus) em animais do Estado do Paraná (PR) por protocolo laboratorial modificado: uma contribuição à saúde pública, à saúde do trabalhador e ao bem-estar animal." (2016).

Comissão Técnica de Biossegurança. Fundação Oswaldo Cruz. Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2005.

DEAN D.J.; ABELSET M.K.; ATANASIU P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 88-95.

FAVORETTO S.R.; CARRIERI M.L.; CUNHA E.M.S. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002; 44:91-5

FAVORETTO, S. R., DE MATTOS, C. C., MORAIS, N. B., ARAÚJO, F. A., & DE MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6), 1062-1065. 2006.

GASCOYNE, S. C., LAURENSEN, M. K., LELO, S., & BORNER, M. Rabies in African wild dogs (*Lycaonpictus*) in the Serengeti region, Tanzania. *Journal of Wildlife Diseases*, 29(3), 396-402. 1993.

ITO, M., ARAI, Y. T., ITOU, T., SAKAI, T., ITO, F. H., TAKASAKI, T., & KURANE, I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology*, 284(2), 214-222. 2001.

KOUZNETZOFF, A.; BUCKLE, M.; TORDO, N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. *Journal of general virology*, v. 79, p. 1005-1013, 1998.

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

KOTAIT I.; CARRIERI M.L.; CARNIELI JUNIOR P.; CASTILHO J.G.; OLIVEIRA R.N.; MACEDO C.I. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública [Internet]. São Paulo: Secretaria Estadual de Saúde. Publicação Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. Abril 2007. [Acesso em outubro de 2016]. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40_raiva.htm/.

LEVINSON, W. Microbiologia médica e imunologia. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MCELHINNEY, L. M., MARSTON, D. A., BROOKES, S. M., & FOOKS, A. R. Effects of carcass decomposition on rabies virus infectivity and detection. *Journal of virological methods*, 207, 110-113. 2014.

MORAIS N.B.; ROMIJN P.C. Doenças emergentes [Internet]. Agência Fundação Oswaldo Cruz de Notícias, Saúde e Ciência para todos. Julho 2004 [Acesso outubro 2016]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=1003&sid=12/>.

OLIVEIRA, R.N. Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2009.

OTTO, A.A. Psittacosis outbreak in Costa Rica associated with pet birds imported from the United States. Proceedings of the Joint Meeting of the American Association of Zoo Veterinarians and American Association of Wildlife Veterinarians, 258- 260, 1998.

PASSAMANI M.; RYLANDS A.B. Feeding behavior of Geoffroy's marmoset (*Callithrix geoffroyi*) in an Atlantic Forest fragment of South-eastern Brazil. Primates 41: 27- 38. 2000.

RYLANDS, A.B. Sympatric brazilian callitrichids: the black tufted-ear marmoset, *Callithrix kuhli*, and the golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*. Journal of Human Evolution, 18:679-695. 1989.

ROUQUAYROL M.Z.; ALMEIDA FILHO N. Epidemiologia & Saúde. Rio de Janeiro: MEDSI; 2003

ROEHE P.M.; SCHAEFER R.; PEREIRA A.S. Otimização da imunofluorescência direta para diagnóstico de raiva. Acta Sci Vet 2002; 30:53-57

SILVA, L. A., OLIVEIRA, T. E. S., & JUNIOR, M. C. Raiva em animais silvestres. ANAIS SIMPAC, 4(1). 2015.

SOUZA, F. M. Investigação de vírus entéricos de interesse em saúde pública (Rotavírus A, B e C, Norovírus e Sapovírus) em primatas não humanos em localidades do Sul do Brasil. 2012.

Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Evite contato com animais silvestres. Soins transmitem raiva [Internet]. Novembro 2010 [Acesso outubro 2016]. Disponível em: http://www.saude.ce.gov.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=1060:evite-contato-com-animais-silvestres-soins-transmitem-raiva&catid=14:lista-de-noticias&Itemid=248/. 2010.

SEAL, U.S; ARMSTRONG, D. Comments on the Executive Summary and recommendations. Report of the Disease Risk Workshop – Omaha, Nebraska, USA. Edited by International Union for Conservation of Nature/Conservation Breeding Specialist Group. Pp. 9-11, 2000.

SILVA, P. L. Zoonoses emergentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 21, Porto Alegre. Anais do 21º Congresso Brasileiro de Avicultura. Porto Alegre: CBA, 2009.

SODRÉ, M. M.; GAMA, A. R. D.; ALMEIDA, M. F. D. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(2), 75-81. 2010.

SUSSMAN, R.W. & KINZEY, W.G. 1984. The ecological role of the Callitrichidae. *American Journal of Physical Anthropology*, 64: 49-419.

TORDO N.; CHARLTON K.; WANDELER A.I. Rhabdoviruses: Rabies. In: Collier LH, editor. *Microbiology and microbial infections*. London: Arnold Press; 1998. p. 665-692

WADA, M.Y.; ROCHA, S.M.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 20(4), 509-518. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Expert Consultation on Rabies. 1º Report. (Technical Report Series, 931). World Health Organization, Geneva. 2004.

CAPÍTULO 2:

**LEVANTAMENTO DA OCORRÊNCIA DE ADENOVÍRUS EM
POPULAÇÃO SILVESTRE DE SAGUIS-DA-CARA-BRANCA *Callithrix geoffroyi*
(HUMBOLDT, 1812) NO SUDESTE DO BRASIL**

Levantamento da ocorrência de adenovírus em população silvestre de saguis-da-cara-branca *Callithrix geoffroyi* (Humboldt, 1812) no Sudeste do Brasil

Survey of the occurrence of adenovirus in the wild population of marmosets
Callithrix geoffroyi (Humboldt, 1812) in Southeast Brazil

RESUMO

O conhecimento das doenças infecciosas em animais selvagens desempenha um papel fundamental tanto na conservação das espécies como na saúde pública, uma vez que a maioria das doenças infecciosas está associada à zoonoses. O papel de muitas zoonoses na cadeia de infecção ainda é pouco compreendido. As infecções por adenovírus já foram descritas em peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Primatas-não-humanos são reservatórios de vários agentes infecciosos, e tem grande importância para a saúde pública devido à sua proximidade com os seres humanos em áreas rurais e urbanas. Foram examinadas amostras fecais de 50 espécimes, provenientes de atropelamento na rodovia ES-060. Duas amostras (4%) foram positivas para Adenovírus. A análise filogenética mostra que os vírus detectados estão relacionados com o gênero *Atadenovirus* *Mastadenovirus*, no entanto, a não especificidade sugere que se trata de um vírus de origem alimentar. Estes gêneros são muito comuns em infecções humanas, e afetam outras espécies de vertebrados, podendo causar infecções oculares, gastrointestinais e respiratórias. Este é o primeiro relato da ocorrência de Adenovírus em uma população de animais selvagens de *Callithrix geoffroyi*. A investigação de doenças infecciosas em animais silvestres tem importante papel em determinar o conjunto de espécies suscetíveis ao mesmo agente infeccioso e estabelecer a possível transmissão de doenças entre espécies selvagens e seu potencial zoonótico. A detecção de duas famílias de adenovírus na mesma espécie hospedeira impacta fortemente o conceito de transmissão e disseminação. O uso de animais mortos em estudos científicos facilita o acesso a material biológico, tornando a perda antropogênica de espécimes em ganho científico, contribuindo para a investigação e monitoramento de infecções virais em espécies selvagens.

Palavras-chaves: calitriquídeos, doenças virais, conservação, atropelamento de fauna.

INTRODUÇÃO

Infecções virais emergentes e reemergentes são, na sua maioria, provenientes de animais selvagens, chegando a um percentual de 70% das doenças com essa origem, sendo esses os principais reservatórios de várias infecções, incluindo as de origem viral (Chomelet *et al.*, 2007; Travis *et al.*, 2011). Interações entre o hospedeiro, o ambiente e o agente etiológico podem determinar se uma espécie é susceptível ou resistente à infecção (Vicentini *et al.*, 2013). Barreiras geográficas, ecológicas e até mesmo comportamentais podem impedir que a transferência do vírus ocorra de um reservatório para outro hospedeiro (Parrish *et al.*, 2008).

Ao longo dos últimos anos o impacto das doenças em populações de animais selvagens tem chamado à atenção de estudiosos e conservacionistas da área (Murray *et al.*, 1999). Estudos sobre doenças em animais selvagens contribuem para o melhor conhecimento a respeito de quais são os agentes que ocorrem nas populações, seus ciclos, métodos de controle e, principalmente, preservação das espécies (Deem *et al.*, 2012; Bodewes *et al.*, 2013). A fragmentação de habitat, destruição de ambientes naturais, aumento da população humana e conseqüentemente dos animais domésticos, tem feito com que o contato entre animais selvagens e domésticos ficasse mais estreito e doenças de origem de animais domésticos começaram a ser relatadas em animais selvagens (Funk *et al.*, 2001).

A possibilidade de transmissão tanto de animais domésticos para selvagens e vice-versa não é descartada, assim como a possibilidade da transmissão de doenças para os seres-humanos (Carnieli *et al.*, 2008). Mudanças na interação entre patógeno e hospedeiro podem ser naturais ou antrópicas, permitindo um possível o maior contato entre as espécies de patógenos e as novas populações de hospedeiros (Daszak *et al.*, 2001).

Infecções por adenovírus (AdVs) já foram descritas em aves, mamíferos, anfíbios, peixes e répteis, e partículas virais já foram isoladas em 40 espécies de vertebrados (Davison *et al.*, 2003; Benko e Harrach, 2003; Wellehan *et al.*, 2004). Os adenovírus pertencentes ao gênero *Mastadenovirus* tem grande importância clínica por infectarem diversas espécies de mamíferos, incluindo primatas humanos e não humanos (*International committee on taxonomy of viroses*, 2013).

Com o uso como vetor de AdVs de primatas-não-humanos para utilização em oncoterapias, vacinas e terapia genética, houve um maior interesse do estudo desses vírus, resultando na descoberta de vírus com relações filogenéticas complexas com os AdVshumanos. Como características, os adenovírus possuem diâmetro de aproximadamente 90nm, sem envelope, icosaédricos e com genoma constituído por DNAfd (Russel *et al.*, 2009). Cinquenta e dois sorotipos de adenovírus (HAdVs) já foram identificados e classificados de acordo com características biológicas, imunológicas, genéticas e bioquímicas. A transmissão desses vírus pode ocorrer via fecal-oral, respiratória, transplante de órgãos e fômites (Center for Disease Control and Prevention 2011; Wold e Ison 2013).

Em humanos os AdVs podem causar doenças respiratórias, conjuntivite e gastroenterites. Na maioria dos casos os AdVs são espécie-específicos (Woods, 2001). O gênero Mastadenovírus é responsável pela infecção de mamíferos, enquanto Aviadenovírus infecta aves. Atadenovírus consiste de vírus isolados de ovinos, bovinos e algumas aves, e foi proposto um quarto gênero, Siadenovírus que engloba vírus isolados de anfíbios e invertebrados (Davison *et al.*, 2003). As infecções por adenovírus em sua maioria são assintomáticas, porém em alguns casos as manifestações clínicas podem ser observadas. Adenovírus entéricos, como o sorotipo humano 41 (AdHu41), causam diarreias, e AdHu26, pode levar à conjuntivites, e adenovírus não entéricos tais como AdHu5 que está associado a infecções respiratórias. As partículas de adenovírus se apresentam resistentes à radiação Ultravioleta, pH ácido, cloro e calor, levando a uma longa permanência no ambiente (Schlindwein, 2009).

Os *Callithrix* tem como base alimentar frutos e presas animais (lagartos, sapos e serpentes) além de exsudatos de plantas e insetos (Rylands & Faria, 1993). A exploração de exsudatos de árvores, ricos em carboidratos e disponíveis em todas as estações faz com que em épocas de escassez de outros recursos, sejam supridas as necessidades energéticas, que são essenciais para manter o hábito de escalada destes animais (Ferrari, 1993). É uma espécie que investe grande parte do tempo forrageando nas horas mais quentes do dia. Sua alimentação consiste em frutos durante o período da manhã, seiva vegetal, nas primeiras horas do dia e no final da tarde pequenos répteis e insetos que constituem fonte de proteínas (Passamani, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram recebidos 50 exemplares de *Callithrix geoffroyi* provenientes de atropelamento na rodovia ES-060 e encaminhados para posterior exame de necropsia. Foram coletadas durante exame necroscópico, amostras de fezes diretamente da ampola retal. Cada amostra recebeu a identificação “VS” (Viroma Silvestre) com número específico e posteriormente eram mantidas a uma temperatura de 4 °C e diluídas a uma concentração de 20% (g/mL) em tampão Tris-Cálcio pH 7,2, homogeneizadas em agitador tipo Vortex (Biomixer)® e centrifugadas na microcentrífuga a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi mantido a - 20 °C até a extração do ácido nucleico viral, que foi realizada de acordo com o método descrito por BOOM *et al.*, (1990), utilizando isotiocianato de guanidina- EDTA seguido de adsorção de ácido nucleico em partículas de sílica. O ácido nucleico extraído foi estocado a - 20 °C até ser submetido à detecção de AdV por PCR. Para assegurar que todos os membros da família Adenoviridae sejam detectados, foram utilizados iniciadores que tem a capacidade de atingir a região mais conservada do DNA dos adenovírus, no caso o gene DNA-polimerase. Foi realizada reação de PCR seguida por nested-PCR utilizando os pares de iniciadores POL_OUT_RE/POL_OUT_FO e POL_IN_RE/POL_IN_FO, gerando fragmento de 550 pb e 300 pb, respectivamente, conforme descrito por Wellehanet *al.*, 2003. Os fragmentos de DNA foram purificados com a utilização do kit NucleoSpin® II (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). O sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi determinado com iniciadores internos apropriados em volume de 10 µl usando o kit “Big Dye Terminator® v1.3 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado sequenciador de DNA por eletroforese capilar ABI PRISM® 3100. As sequências de DNA foram avaliadas e comparadas a outras sequências disponíveis no banco de dados GenBank, usando o BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis na base de dados de nucleotídeos GenBank utilizando BLASTn. A edição de sequências e alinhamento foram realizados pelo BioEdit versão 7.2.5 usando o CLUSTALW 40. A análise filogenética de adenovírus foram inferidas pelo método Neighbor-Joining com o modelo de substituição de distância p usando Software Análise de Genética Evolutiva Molecular versão 7 (MEGA) 41 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 50 amostras coletadas, 2 (4%) foram positivas para Adenovírus no teste de detecção de adenovírus. Análises filogenéticas dos adenovírus encontrados nas duas amostras classificaram uma amostra como sendo do gênero *Atadenovirus* e a outra de *Mastadenovirus*.

O sagui-da-cara-branca (*C. geoffroyi*) tem uma dieta variada que inclui frutas, insetos, lagartos e sapos (Passamani *et al.*, 2000; Caine 1996). Analisando os hábitos alimentares destes animais, é possível fazer uma correlação da presença de *Atadenovirus* como possível de ter corrido devido ao fato de que *Callithrix* se alimentam de pequenos répteis que são os hospedeiros do gênero em questão. Com relação à filogenia do AdvS encontrado em uma outra amostra de sagui pertencente ao gênero *Mastadenovirus*, sugere que o *C. geoffroyi* possa ser um hospedeiro ou suscetível à infecção por este vírus.

Os resultados encontrados neste estudo são condizentes com a descrição de que animais selvagens são reservatórios de diversas zoonoses e que consideram os primatas- não-humanos como “sentinelas naturais” para a investigação de doenças de interesse na saúde pública (Svoboda, 2007). Estudos focados na investigação de Adv em símios do Novo Mundo ainda são escassos (Weverset *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2012). Este trabalho representa o primeiro relato de *Atadenovirus* e *Mastadenovirus* em saguis-da-cara-branca de vida livre no Espírito Santo, entretanto, a não especificidade do vírus leva a crer que seja um achado de origem alimentar, já que não foi comprovada a infecção. Gálet *et al.*, 2013 encontraram em uma carcaça de *Callithrix pygmaea* levado à óbito devido a complicações do sistema respiratório, um novo Adv, filogeneticamente relacionado aos AdvS de morcegos e canídeos, o que sugere ser uma possível explicação para a transmissão interespecífica como resultado de coadaptação com o hospedeiro natural, provocando infecções moderadas (Gálet *et al.*, 2013; Weverset *et al.*, 2011).

O papel das espécies de animais selvagens que contribuem para a manutenção de viroses com potencial zoonótico na cadeia de transmissão ainda é pouco conhecido, e o risco da transmissão dos patógenos para seres humanos é um dos fatores que deve ser levado em consideração (Daszka *et al.*, 2000). Para uma melhor caracterização das espécies virais, se faz

necessário um sequenciamento completo do genoma. Infecções experimentais “in vivo” e “in vitro”, serão de fundamental importância na conclusão destas análises.

Mesmo que os resultados tenham sugerido que os vírus detectados possam ser provenientes de presas que fazem parte da alimentação destas espécies, não é descartada a hipótese de que o vírus possa ter a capacidade de acometer diversas espécies, já que o mesmo tem uma evolução muito rápida quando comparada aos demais organismos.

Foram detectados adenovírus em duas amostras fecais de *Callithrix geoffroyi*, possivelmente provenientes da alimentação destes animais. A caracterização mais detalhada dos vírus encontrados se faz necessária para que haja a avaliação do genoma por completo. Estudos com animais de vida livre são de grande importância principalmente de primatas-não-humanos, devido a proximidade filogenética com os humanos e a possibilidade de vírus com potencial zoonótico.

REFERÊNCIAS

- BENKÖ, M.; HARRACH, B. "Molecular evolution of adenoviruses." *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions*. Springer Berlin Heidelberg.3-35. 2003.
- BOOM R.C.J.A.; SOL C.J.; SALIMANS M.M.; JANSEN C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN P.M.; VAN D.E.R.; NOORDAA J.P.M.E. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal Clin. Microbiology* 28(3): 495-503. 1990.
- BODEWES, R., VAN DER GIESSEN, J., HAAGMANS, B. L., OSTERHAUS, A. D., & SMITS, S. L. Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a herpesvirus, in feces of red foxes. *Journal of virology*, 87(13), 7758-7764. 2013.
- CAINE, NANCY G. "Foraging for animal prey by outdoor groups of Geoffroy's marmosets (*Callithrix geoffroyi*)." *International Journal of Primatology* 17.6: 933-945. 1996.
- CARNIELI, P., DE OLIVEIRA FAHL, W., CASTILHO, J.G., DE NOVAES OLIVEIRA, R., MACEDO, C.I., DURYMANOVA, E., & DE SÁ, J.E.U. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus research*, 131(1), 33-46. 2008.
- CHOMEL, B.B., BELOTTO A., MESLIN F.X. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerging Infectious Disease journal*.jan; 13(1): 1-6. 2007.
- DAVISON A.J.; BENKO M.; HARRACH B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*.ago; 84: 2895–2908.doi: 10.1099/vir.0.19497-0. 2003.
- DASZAK, P., CUNNINGHAM, A. A., & HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *science*, 287(5452), 443-449. 2000.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A. & HYATT, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *ActaTropica*, 78: 103-116. 2001.
- DEEM S.L; CRUZ M.B.; HIGASHIGUCHI J.M.; PARKER P.G. Diseases of poultry and endemic birds in Galapagos: implications for the reintroduction of native species. *Animal Conservation*.jul, 15(1), 73-82. doi:10.1111/j.1469-1795.2011.00489. 2012.

FERRARI, S.F. Ecological differentiation in the Callitrichidae. Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology. Oxford University Press, Oxford, 315-328. 1993.

FUNK S.M.; FIORELLO C.V.; CLEVELAND, S. & GOMPPER, M.E. The role of disease in carnivore ecology and conservation. Pp. 443–466. In: J.L. Gittleman; S.M. Funk; R.K. Wayne & D. Macdonald (eds). Carnivore Conservation. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 675p. 2001.

GÁL J, HORNYÁK Á, MÁNDOKI M, BAKONYI T, BALKÁ G, SZEREDI L, et al. Novel mastadenovirus infection and clinical disease in a pygmy marmoset (*Callithrix [Cebuella] pygmaea*). Veterinary Microbiology Microbiol; aug; 167(3):695-699. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.008>. 2013

HALL, N.H., ARCHER, L.L., CHILDRESS, A.L., & WELLEHAN JR, J.F. Identification of a novel adenovirus in a cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 24(2), 359-363. 2012

MURRAY, D.L.; KAPKE, C.A.; EVERMAN, J.J. & FULLER, T.K. Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. Animal Conservation, 2: 241-254. 1999.

PARRISH C.R.; HOLMES E.C.; MORENS D.M.; PARK E.C.; BURKE D.S.; CALISHER C.H. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. Microbiology Molecular Biology. 72(3): 457-470. doi:10.1128/MMBR.00004-08. 2008.

PASSAMANI, M., & RYLANDS, A.B. Feeding behavior of Geoffroy's marmoset (*Callithrix geoffroyi*) in an Atlantic forest fragment of south-eastern Brazil. Primates, 41(1), 27-38. 2000.

SVOBODA, W. K. Vigilância de epizootia em primatas não humanos como instrumento de monitoramento de arbovirose e outras viroses de Interesse em Saúde Pública. Diss. Doctors Thesis]. [Londrina (PR)]: Universidade Estadual de Londrina, 2007.

RUSSEL W.C. Adenoviruses: update on structure and function. J Gen Virol.; 90: 1–20. doi: 10.1099/vir.0.003087-0. 2009.

RYLANDS, A. B.; FARIA, D. S. Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus *Callithrix*. *Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology*. Oxford University Press, Oxford, 263-272. 1993.

SCHLINDWEIN, A. D. Pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras de lodo da estação de tratamento de esgoto (Sistema Insular) de Florianópolis, SC: padronização e avaliação de técnicas moleculares e de cultura celular na detecção e viabilidade viral. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

TRAVIS D.A.; WATSON R.P.; TAUER A. The spread of pathogens through trade in wildlife. *Revue Scientifique et Technique-OIE*; 30(1): 219. 2011.

VICENTINI, F., DENADAI, W., GOMES, Y. M., ROSE, T. L., FERREIRA, M. S., LE MOULLAC-VAIDYE, B., & SPANO, L. C. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo State, Brazil. *PloS one*, 8(7), e69348. 2013.

WEVERS D, METZGER S, BABWETEERA F, BIEBERBACH M, BOESCH C, CAMERON K, ET AL. Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *Journal of Virology*; 85(20): 10774-10784. doi: 10.1128/JVI.00810-11. 2011.

WELLEHAN, J.F.; JOHNSON, A.J.; HARRACH, B.; BENKÖ, M.; PESSIER, A.P.; JOHNSON, C.M.; & JACOBSON, E.R. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the adenoviruses. *Journal of virology*, 78(23), 13366-13369. 2004.

WOLD, W.S.; & ISON, M. G. Adenoviruses, p 1732–1767. *Fields virology*, 2. 2013.

WOODS, L.W. Adenoviral diseases. *Infectious diseases of wild mammals*, 3, 202-212. 2001

ANEXO

Anexo da instrução normativa do idaf do IFD e PB

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº8, DE 12 DE ABRIL DE 2012

O SECRETÁRIO SUBSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe conferem os arts.10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, tendo em vista o disposto no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, na Instrução Normativa MAPA nº 1, de 16 de janeiro de 2007, na Instrução Normativa MAPA nº 5, de 1º de março de 2002, na Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005, e o que consta do Processo nº 21000.003435/2008-41, resolve:

Art. 1º Definir os requisitos e critérios para a realização do diagnóstico de raiva, por meio dos métodos denominados Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD) e Prova Biológica em camundongos (PB), a serem adotados pelos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, em atendimento ao Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH).

Art. 2º Aprovar os métodos previstos nos Anexos I e II desta Instrução Normativa.

Art. 3º O laboratório de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa deverá designar um responsável técnico e um responsável técnico substituto, com experiência comprovada de, no mínimo, dois anos na realização dos métodos de que trata esta Instrução Normativa. Parágrafo único. O responsável técnico e o responsável técnico substituto não poderão responder por mais de um laboratório.

Art. 4º O laboratório de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa deverá dispor das seguintes instalações:

I - área específica para recebimento das amostras;

II - área destinada à manipulação das amostras, preparo das lâminas e da

suspensão de Sistema Nervoso Central - SNC;

III - sala escura destinada à leitura e interpretação de lâminas por microscopia de fluorescência;

IV - infectório ou biotério de experimentação destinado à manutenção de camundongos durante a Prova Biológica;

V - área de desinfecção e lavagem, destinada à esterilização de materiais e amostras biológicas potencialmente infectadas, assim como à lavagem e secagem dos materiais previamente esterilizados; e

VI - área de esterilização destinada à embalagem e esterilização de vidraria e de outros materiais não descartáveis.

Art. 5º São consideradas amostras para o diagnóstico de raiva: I - o Sistema Nervoso Central; e II - o animal inteiro, no caso de animais silvestres pequenos, menores ou iguais a 20 cm (vinte centímetros) de comprimento.

Art. 6º As amostras para o diagnóstico de raiva deverão ser encaminhadas resfriadas ou congeladas, dependendo do período de tempo transcorrido entre a coleta e a sua chegada ao laboratório, nos seguintes termos:

I - a amostra será encaminhada refrigerada quando o período entre a coleta e o recebimento no laboratório não ultrapassar 24 (vinte e quatro) horas, devendo estar acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com tampa e tamanho adequado, ou saco plástico duplo devidamente lacrado, identificada individualmente e mantida à temperatura de 2 a 4 °C (dois a quatro graus Celsius), por meio de gelo reciclável, em caixa isotérmica perfeitamente vedada, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL";

II - a amostra será encaminhada congelada quando o período entre a coleta e o recebimento no laboratório ultrapassar 24 (vinte e quatro) horas, devendo estar acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com tampa e tamanho adequado, ou saco plástico duplo devidamente lacrado, identificada individualmente e contida em caixa isotérmica perfeitamente vedada, de forma a manter o congelamento, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL".

§ 1º O gelo reciclável utilizado para encaminhamento das amostras para o diagnóstico de raiva ao laboratório não deverá ser reutilizado. § 2º Excepcionalmente, as amostras poderão ser encaminhadas ao laboratório conservadas em glicerol, caso não seja possível a sua refrigeração ou congelamento. § 3º A amostra conservada em glicerol, nos termos do § 2º, deverá ser acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com

tampa e tamanho adequado, contendo solução de glicerina 50% (cinquenta por cento) em tampão fosfato pH 7,4, identificada individualmente e contida em embalagem secundária impermeável perfeitamente vedada, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL".

Art. 7º O Formulário Único de Requisição de Exames para Síndromes Neurológicas deverá acompanhar toda amostra suspeita de raiva enviada ao laboratório, conforme definido no Manual Técnico - 2009 - Controle da Raiva dos Herbívoros, do PNCRH, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, aprovado pela Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005.

Art. 8º As amostras deverão ser registradas em livro próprio contendo, no mínimo, as informações referentes ao número do protocolo, responsável pelo recebimento, espécie, sexo, idade, raça, data da coleta, data do encaminhamento, data do recebimento, data de emissão do relatório de ensaio, número de partida e título do conjugado.

Art. 9º O laboratório deverá manter uma alíquota da amostra congelada e devidamente identificada, à temperatura de - 20 °C (vinte graus Celsius negativos) ou inferior, por um período mínimo de 6 (seis) meses. Parágrafo único. As amostras deverão ser conservadas em congeladores exclusivos a esta finalidade, de capacidade suficiente ao volume de análises realizadas, estocadas de forma ordenada e em local de acesso restrito.

Art. 10. Toda amostra oriunda do sistema de vigilância do PNCRH deverá ser submetida ao TIFD e à PB. § 1º O relatório de ensaio do TIFD deverá ser liberado no prazo máximo de 48 (quarenta e oito) horas úteis, contadas a partir da entrada do material suspeito no laboratório. § 2º A PB deverá ser iniciada no prazo máximo de 48 (quarenta e oito) horas úteis, contadas a partir da entrada do material suspeito no laboratório. § 3º No caso de utilização de camundongos desmamados, o relatório de ensaio da PB deverá ser liberado no prazo máximo de 28 (vinte e oito) dias, contados a partir do dia da inoculação ou eventualreinoculação.

§ 4º No caso de utilização de camundongos lactentes, o relatório de ensaio da PB deverá ser liberado no prazo máximo de 21 (vinte e um) dias, contados a partir do dia da inoculação ou eventualreinoculação.

Art. 11. O resultado deverá vir destacado no relatório de ensaio pelas expressões POSITIVO ou NEGATIVO. § 1º O relatório de ensaio com resultado NEGATIVO deverá ser emitido, no mínimo, em 3 (três) vias, das quais uma será encaminhada à

Superintendência Federal de Agricultura na Unidade Federativa de origem da amostra, outra ao requisitante e a outra deverá ser mantida no laboratório. § 2º O relatório de ensaio com resultado POSITIVO, no TIFD ou na PB, deverá ser imediatamente informado à Superintendência Federal de Agricultura na Unidade Federativa de origem da amostra, ao órgão estadual de defesa sanitária animal da Unidade Federativa, às autoridades de Saúde, ao requisitante e à Coordenação- Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/SDA, aos quais será obrigatório o envio de uma via do relatório de ensaio, enquanto outra via deverá ser mantida no laboratório.

Art. 12. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

RICARDO DA CUNHA CAVALCANTI JÚNIOR

ANEXO I

TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (TIFD)

1. Objetivo

O Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD) tem o objetivo de pesquisar a presença de antígenos do vírus da raiva, por imunofluorescência direta, em impressões de amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de animais suspeitos ou de tecido cerebral de camundongos inoculados com amostras suspeitas para diagnóstico de raiva.

2. Material a ser pesquisado As regiões anatômicas do SNC de predileção a serem pesquisadas para o diagnóstico da raiva são o hipocampo (corno de Ammon), o cerebelo, o córtex e a medula espinhal. Para as amostras de equídeos, deverá ser incluída, sempre que possível, a medula espinhal. É recomendado pesquisar no mínimo 3 (três) regiões anatômicas do SNC antes de se concluir por um resultado negativo.

3. Método

3.1. Preparação dos controles do teste

3.1.1. Todo ensaio ou série de ensaios deverá incluir lâminas para controle positivo e controle negativo. 3.1.2. O controle positivo deverá ser preparado antecipadamente, a partir de duas impressões em lâmina, do cérebro de camundongo albino suíço, inoculado por via intracerebral com amostra positiva para raiva, submetido à eutanásia na fase parálitica da doença.

3.1.3. O controle negativo deverá ser preparado a partir de duas impressões, em lâmina, de cérebro de camundongo albino suíço sadio.

3.1.4. As lâminas poderão, a critério do laboratório, ser fixadas por imersão em acetona PA a -20°C , por, no mínimo, 15 (quinze) minutos. Após este período, retirar as lâminas da acetona, escorrer e deixar secar em temperatura ambiente.

3.1.5. As lâminas para controle deverão estar identificadas e datadas, podendo ser mantidas em temperatura de -20°C e utilizadas por até 10 (dez) dias.

3.2. Diluição do conjugado em Cérebro de Camundongo Normal (CCN) e Cérebro de Camundongo Infectado (CCI) - diluições de trabalho

3.2.1. A diluição do conjugado em suspensão de Cérebro de Camundongo Infectado (CCI) e em suspensão de Cérebro de Camundongo Normal (CCN) - diluição de trabalho - deverá ser determinada encontrando-se o melhor título a ser empregado no exame das amostras suspeitas. Este título é representado pela diluição que proporciona a melhor fluorescência específica com o mínimo de fluorescência inespecífica pela TIFD, utilizando diluições seriadas das suspensões de CCN + conjugado e CCI + conjugado, perante lâminas positivas.

3.2.2. A avaliação do conjugado deverá ser realizada a cada novo lote ou sempre que necessário, pois repetidos congelamentos, descongelamentos e filtragens podem alterar o título do conjugado. O laboratório deverá manter registro desta avaliação.

3.2.3. Para o preparo do CCN e CCI, o seguinte protocolo deverá ser adotado:

a) preparar duas suspensões a 20% de cérebro de camundongo em salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,4, suplementada com 2% de soro de equino livre de anticorpos antivírus da raiva ou com uma suspensão a 10% de gema de ovos de galinha embrionados de 6 a 7 dias: a.1) uma suspensão a partir de cérebro de camundongo normal - CCN; a.2) uma suspensão a partir de cérebro de camundongo infectado- CCI, coletado de animais na fase paralítica da doença, após inoculação de 0,03 mL de suspensão de vírus da raiva fixo (CVS - ChallengeVirus Standard, com título mínimo de 10^5 DL₅₀/0,03mL em camundongos), diluído na proporção de 1/100 ou 1/1000;

b) homogeneizar adequadamente as suspensões de cérebro;

c) centrifugar por 10 (dez) minutos a 1000 x g (força centrífuga relativa);

d) coletar o sobrenadante e distribuir em alíquotas devidamente identificadas;

e) conservar em temperatura de -20°C ou inferior;

f) utilizar as alíquotas dos sobrenadantes para diluir o conjugado na proporção

indicada pela titulação previamente encontrada.

3.3 Preparação do material para ensaio em lâminas de microscopia - impressão ou

decalque 3.3.1 Para a preparação do material suspeito para o ensaio em lâminas de microscopia por impressão ou decalque, deverá ser adotado o seguinte protocolo:

- a) identificar as lâminas, de acordo com a amostra a ser examinada;
- b) cortar fragmentos de hipocampo, cerebelo, córtex e medula espinhal;
- c) colocar cada fragmento em espátula, papel filtro ou pinça cirúrgica, com o corte voltado para cima;
- d) secar o fragmento com papel de filtro, passando-o levemente sobre o material;
- e) fazer a impressão ou decalque do material em lâmina. Devem ser feitas pelo menos duas impressões de cada fragmento de SNC. Se necessário, retirar o excesso de tecido com papel de filtro e deixar secar;
- f) as lâminas poderão, a critério do laboratório, ser fixadas por imersão em acetona PA a -20°C, por, no mínimo, 15 (quinze) minutos. Após este período, retirar as lâminas da acetona, escorrer e deixar secar em temperatura ambiente.

3.4. Coloração e montagem das lâminas

3.4.1. Para a coloração e montagem das lâminas, deverá ser adotado o seguinte protocolo:

- a) o conjugado deverá ser adicionado a volume apropriado de CCN ou CCI, de forma a constituir a diluição trabalho;
- b) demarcar, com lápis demográfico, esmalte ou semelhante, as impressões de tecido nervoso do material sob exame e dos controles de prova, ou utilizar lâminas de vidro extrafina, com dois círculos e extremidade fosca;
- c) recobrir a área delimitada com algumas gotas do conjugado de diluição de trabalho. A disposição de utilização da solução de conjugado + CCN e solução de conjugado + CCI deve estar prevista na documentação do laboratório e ser sempre a mesma. Sugere-se a seguinte forma: c.1) lâminas de controle positivo e controle negativo: recobrir a impressão de tecido nervoso localizada próximo à descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCN. Recobrir a impressão de tecido nervoso mais distante da descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCI; c.2) lâminas de material suspeito: recobrir a impressão de tecido nervoso localizada próximo à descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCN. Recobrir a impressão de tecido nervoso mais distante da descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCI;
- d) colocar as lâminas em câmara úmida (bandeja forrada com papel de filtro ou

similar umidificado e provida de tampa) e levar à estufa a 37°C por 30 (trinta) minutos;

e) lavar as lâminas com PBS, pH 7,4 a 7,8, mantendo-as levemente inclinadas horizontalmente e evitando a mistura entre as duas soluções (conjugado+CCI e conjugado+CCN);

f) submergir as lâminas em PBS, pH 7,4, por dez minutos. Repetir este procedimento por, no mínimo, três vezes;

g) secar as lâminas ao ar em posição vertical. Colocar uma gota de solução de glicerol a 50% em PBS (pH 7,6) sobre cada impressão e sobrepor com lamínula. Esta etapa poderá ser suprimida, desde que as lâminas sejam mantidas em PBS (pH 7,4 a 7,8);

h) proceder imediatamente à leitura em microscópio de fluorescência.

3.5. Leitura

3.5.1. A leitura deverá ser realizada em microscópio de fluorescência, em magnitude de 10 x 40, abrangendo todas as áreas demarcadas, inicialmente nas lâminas-controle e, em seguida, no material suspeito.

3.6. Interpretação dos resultados

3.6.1 Validação do ensaio: para que o ensaio tenha validade, as lâminas-controle deverão apresentar o seguinte padrão de visualização:

3.6.1.a) Controle positivo: apresentar fluorescências características na impressão onde foi acrescentado o conjugado + CCN, e não apresentar tais fluorescências na impressão onde foi acrescentado o conjugado + CCI;

3.6.1.b) Controle negativo: não apresentar quaisquer fluorescências características nas 2 (duas) impressões.

3.6.2. Resultado do material suspeito

3.6.2.1. Resultado positivo: quando qualquer uma das impressões das lâminas contendo conjugado + CCN apresentar fluorescência característica.

3.6.2.2. Resultado negativo: quando não houver qualquer fluorescência característica em todas as impressões das lâminas da amostra suspeita.

3.6.3. Fluorescências características são reações antígeno-anticorpo, de fluorescência brilhante, em cor de maçã verde ou verde amarelada, de tamanho variável. Algumas são minúsculas (chamadas comumente de poeiras ou areia) e as maiores têm as dimensões e formas comparáveis aos corpúsculos de Negri. As inclusões são geralmente circulares ou ovais e possuem a margem mais brilhante que a área central.

PROVA BIOLÓGICA (PB) - ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CAMUNDONGOS

1. Objetivo

A Prova Biológica (PB) é o teste complementar ao Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD), utilizada para detectar infectividade de uma suspensão de material suspeito de raiva, em animais de laboratório.

2. Material a ser pesquisado As regiões anatômicas de predileção a serem utilizadas no preparo do inóculo para diagnóstico de raiva são o hipocampo (corno de Ammon), o cerebelo, o córtex e a medula espinhal. É recomendada a inclusão de fragmentos de pelo menos três regiões anatômicas distintas. Para as amostras de equídeos, deverá ser incluída, sempre que possível, a medula espinhal.

3. Método

3.1. Seleção dos animais Para a PB, deverá ser selecionado um grupo de no mínimo oito camundongos da linhagem albino suíço, sadios, adultos jovens desmamados, de 21 (vinte e um) a 28 (vinte e oito) dias de idade (12 a 14 g), do mesmo sexo, ou uma ninhada de no mínimo dez camundongos albinos suíços, sadios, lactentes, de 1 (um) a 2 (dois) dias de idade.

3.2. Preparo do inóculo

- a) retirar pequenos fragmentos do tecido nervoso suspeito, elegendo áreas que melhor representem as regiões anatômicas a serem pesquisadas;
- b) pesar os fragmentos de tecido nervoso, macerar, homogeneizar e acrescentar volume de PBS (pH 7,4 a 7,8), de forma a obter uma suspensão de 10 a 20% (p.v.);
- c) centrifugar em centrífuga refrigerada a 200 x g durante cinco minutos ou deixar em repouso por, no mínimo, 01 (uma) hora à temperatura de 4°C;
- d) retirar o sobrenadante e adicionar 1.000 UI de penicilina e 2 mg de estreptomicina por mL. Esta etapa poderá ser suprimida, desde que estes antibióticos sejam adicionados em etapa anterior;
- e) o inóculo deverá ser mantido à temperatura de 4°C até ser utilizado. A inoculação deverá ser realizada no mesmo dia e o inóculo mantido em banho de gelo durante o procedimento de inoculação.

3.3. Inoculação

- a) aspirar o inóculo utilizando seringa de 0,25 mL a 1,0 mL (tuberculina) com agulha de calibre 0,40-0,45 mm por 1-1,5 cm de comprimento;
- b) com uma das mãos, conter o animal pela pele da região dorso-cervical,

mantendo-o aprisionado com o dedo polegar e o indicador, pressionando-o levemente sobre uma superfície plana. Com a outra mão, posicionar o conjunto agulha-seringa perpendicularmente à cabeça e distante 1-2 mm do arco frontal, na direção de um dos hemisférios cerebrais;

c) introduzir 1 a 2 mm da agulha, através da caixa craniana, no tecido cerebral e inocular a dose de 0,03 mL por camundongo desmamado ou a dose de 0,02 mL por camundongo lactente;

d) substituir os animais que porventura morrerem durante ou imediatamente após o procedimento de inoculação.

3.4. Observação dos animais

a) manter o grupo de animais em gaiola adequada e devidamente identificada, com livre acesso à água e ração, e em ambiente com luz, temperatura e umidade controladas (infectório) de acordo com normas técnicas;

b) observar os animais diariamente e registrar na ficha de observação, que deverá conter todos os dados do material suspeito, as alterações ocorridas com os camundongos, assim como aqueles que se mantêm saudáveis;

c) o registro será feito por meio de símbolos, que deverão estar indicados em legenda, para as categorias abaixo listadas, para as quais são sugeridos: S = para animal sadio; D = para animal doente; P = para animal paralítico; M = para animal morto; E = para animal submetido à eutanásia; NC = para animal não considerado (exemplo, sem condições de análise);

d) observar os camundongos desmamados até o 28º dia pós-inoculação e os camundongos lactentes até o 21º dia pós-inoculação;

e) examinar pelo TIFD o cérebro dos camundongos desmamados que, entre o 5º e o 28º dia pós-inoculação, morreram ou foram submetidos à eutanásia por estarem doentes ou paralíticos. Seguir o mesmo procedimento para os camundongos lactentes que, entre o 4º e o 21º dia pós-inoculação, morreram ou foram submetidos à eutanásia por estarem doentes ou paralíticos;

f) para apressar o resultado da inoculação em camundongos neonatos, poderá ser realizada eutanásia de um camundongo por vez, aos 5, 7, 9 e 11 dias pós- inoculação, seguidos da realização da IFD.

3.4.1. Quando uma amostra, depois de inoculada, causar a morte, durante o período de observação dos animais, de um quantitativo superior a 3 (três) animais em 8 (oito) inoculados, e os mortos, após examinados, resultarem negativos para raiva no TIFD ou, ainda, caso seu exame seja impossível, dever-se-á proceder a uma nova

inoculação da amostra em um lote com o dobro de animais inicialmente inoculados.

3.4.2. O diagnóstico será concluído como "Negativo" se ao menos 5 (cinco) dos animais inoculados sobreviverem saudáveis aos 28 (vinte e oito) dias de observação, no caso de desmamados, e 21 (vinte e um) dias, no caso de lactentes, e os mortos apresentarem-se negativos para raiva ao TIFD. Caso contrário, e não se tratando de material Positivo, o diagnóstico pela PB é considerado "Impossível".

3.5. Interpretação dos resultados

3.5.1. Resultado positivo: quando a impressão em lâmina do cérebro de um ou mais camundongos que morreram ou foram submetidos à eutanásia durante o período de observação apresentar fluorescência característica do vírus da raiva, pelo TIFD.

3.5.2. Resultado negativo: quando, durante o período de observação, não ocorrer morte ou sintomatologia característica para a raiva, no grupo de camundongos inoculados com o material suspeito ou quando a impressão em lâmina do cérebro de um ou mais camundongos, que morreram ou foram submetidos à eutanásia durante o período de observação, não apresentar fluorescência característica do vírus da raiva pelo TIFD.

D.O.U., 13/04/2012 - Seção 1