

amostras de sistema nervoso central (SNC) de equinos que morreram apresentando sinais neurológicos e tiveram amostras colhidas e enviadas para o LSA/IMA. Nove diferentes agentes que causam doença neurológica em equinos foram pesquisados: raiva, herpesvírus equino 1 (EHV-1), herpesvírus equino 4 (EHV-4), vírus da encefalite equina do leste (EEEV, do inglês *Eastern equine encephalitis virus*), vírus da encefalite equina do oeste (WEEV, do inglês *Western equine encephalitis virus*), vírus da encefalite venezuelana (VEEV, do inglês *Venezuelan equine encephalitis virus*), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV, do inglês *Saint Louis encephalitis virus*), vírus da encefalite de West Nile (WNEV) e *Sarcocystis neurona*, agente da mieloencefalopatia protozoária. Das 217 amostras de SNC, 47 (21,7%) foram positivas para o vírus da raiva pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos. Nas 170 amostras restantes, negativas para o vírus da raiva, o DNA do EHV-1 foi detectado em 20 (11,8%) e o cDNA do SLEV em uma amostra, pelas técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR), respectivamente. Das amostras de SNC acondicionadas em formol, 10% foram avaliadas histologicamente. Alterações circulatórias como hiperemia e hemorragias multifocais, associadas ou não a trombo vascular, foram frequentes nas infecções por EHV-1 e raiva e obtiveram diferença significativa quando comparadas com os animais negativos. Para confirmar o diagnóstico, os produtos de PCR obtidos foram sequenciados e os vírus isolados em cultivo celular. O presente estudo demonstrou que o vírus da raiva é o principal agente causador de encefalite em equinos, apesar do crescente número de casos de encefalomielite associados ao EHV-1 no Estado de Minas Gerais. No entanto, apesar de evidências sorológicas comprovarem a circulação do SLEV no Brasil, este foi o primeiro relato de isolamento do SLEV do sistema do SNC de um equino que morreu com sinais neurológicos no País.

\*Bolsista DTI-1 do Edital CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008, projeto 578385/2008-2.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.  
E-mail: rsantos@vet.ufmg.br

<sup>2</sup>Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Investigation of neurological diseases in equine tested negative for rabies

*Investigação de doenças neurológicas em equinos testados negativos para raiva*

Cunha, E.M.S.<sup>1</sup>; Lara, M.C.C.S.H.<sup>1</sup>; Villalobos, E.M.C.<sup>1</sup>; Nassar, A.F.C.<sup>1</sup>; Del Fava, C.<sup>1</sup>; Scannapieco, E.M.<sup>1\*</sup>; Cunha, M.S.<sup>1</sup>; Mori, E.<sup>2</sup>; Gomes, M.N.<sup>3</sup>

There are several central nervous system (CNS) diseases that can infect horses, and the differential diagnoses are therefore necessary. Clinically these diagnoses are often difficult once the degrees of ataxia and paresis are similar. The most commonly encountered abnormalities that may result in neurological dysfunction include trauma, equine herpesvirus, Eastern, Western and Venezuelan equine encephalomyelitis (EEE, WEE, VEE), leukoencephalomalacia, protozoan myeloencephalitis and bacterial encephalitis. The aim of this work was to identify the main diseases with neurological signs in equine after negative diagnosis for rabies. From April 2007 to June 2011, 167 samples of CNS

from animals that have died with neurological signs were submitted for rabies diagnosis by FAT (fluorescent antibody test) and MIT (mouse inoculation test). Those tested negative were further submitted to other analysis. Samples of the CNS were inoculated in cell culture and submitted to PCR for detection of herpesvirus and equine encephalomyelitis. In order to investigate the growth of bacteria, isolation in 5% blood agar and biochemical identification was performed. For the histological examination, CNS tissue samples were placed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin eosin. Our data confirmed rabies in 23 (13,8%) cases. Of 144 samples tested negative for rabies, 10 (7,0%) were positive for leukoencephalomalacia, 4 (2,8%) for herpetic myeloencephalitis and 12 (8,3%) for bacterial encephalitis. This study highlights the importance of including different diagnosis in samples from equine with neurological disease.

Financial support: CNPq/Mapa.

\*Bolsista CNPq/MAPA.

<sup>1</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: cunha@biologico.sp.gov.br

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Defesa Animal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

### Caracterização molecular do genoma de cepas do vírus da raiva correlacionadas à imunopatologia e desenvolvimento de RT-PCR em tempo real

*Molecular Characterization of rabies virus strains correlated with immunopathology and the development of a real-time RT-PCR*

Casseb, L.M.N.<sup>1</sup>; Barbosa, T.F.S.<sup>1</sup>; Travassos da Rosa, E.S.<sup>1</sup>; Pereira, A.S.<sup>1</sup>; Nunes, M.R.T.<sup>1</sup>; Medeiros, D.B.A.<sup>1</sup>; Quaresma, J.A.S.<sup>2</sup>; Fernandes, E.R.<sup>3</sup>; Duarte, M.I.S.<sup>3</sup>; Vasconcelos, P.F.C.<sup>1</sup>

O projeto visa a caracterizar molecularmente o genoma de cepas de raiva (variantes antigênicas 2 e 3) e sua associação com a patogenicidade, bem como realizar a quantificação do RNA viral por RT-PCR em tempo real. Foram realizados os procedimentos de infecção experimental em camundongos albinos suíços com idade de 21 dias com duas cepas em diferentes vias de administração. Os animais foram observados diariamente e as coletas iniciaram-se a partir do 5º dia pós-inoculação. Foram obtidas sequências nucleotídicas do genoma completo do VRab em sequenciador 454 e também foram obtidos amplicons de 490 pb determinados entre as posições 868 e 1359 da nucleoproteína pelo método de Sanger. Os produtos obtidos pelo método de pirosequenciamento estão sendo montados para análise filogenética e genômica. Observou-se que os animais infectados pela via intracerebral foram a óbito até o 15º dia PI, e alguns animais infectados pelas vias musculares permanecem em observação sem apresentar sinais de doença, mesmo após 90 dias. Das amostras coletadas dos animais, parte está armazenada em freezer a -70º C para estudos posteriores e parte foi fixada em formol e está sendo incluída em parafina para proceder aos estudos histológicos e de imunohistoquímica. O estudo desenvolvido até o momento permitiu as seguintes conclusões: foi possível obter produtos do genoma completo pelo método de pirosequenciamento das amostras em estudo, que estão em análise; os anticorpos para imunohistoquímica estão sendo adquiridos, bem como o treinamento de recursos humanos para realização das técnicas histológicas e de imunohistoquímica.

Apoio Financeiro: MCT/ CNPq/ Mapa / SDA n° 64/2008.

<sup>1</sup>Instituto "Evandro Chagas", Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Rod. BR-316, km 7, CEP 67030-000, Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil.  
E-mail: liviacasseb@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Laboratório de Imunohistoquímica, Belém, PA, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Laboratório de Patologia, São Paulo, SP, Brasil.

### Producing farms of beef and dairy cattle in northern and northwestern of Rio de Janeiro State, Brazil: analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies and profile economic-sanitary\*

*Fazendas produtoras de bovino de corte e leite no norte e nordeste do Estado do Rio de Janeiro: análises da raiva transmitida aos bovinos por morcegos hematófagos e perfil econômico-sanitário*

Florido, V.A.; Pereira, S.R.F.G.; Meireles, M.A.D.; Bernardo-Pedro, T.; Oliveira, A.C.; Linhares, J.M.; Galante, A.C.; Vieira, L.F.P.

Rabies is an infectious disease of viral origin and lethal course that affects domestic animals of economic interest (domestic herbivores). The main transmitter for domestic herbivores is the common vampire bat *Desmodus rotundus*. The objective of this work is to trace the profile economic-sanitary of the producing farms of beef and dairy cattle with rabies transmitted by *D. rotundus*. Survey of farms with rabies cases in Northern and Northwestern of Rio de Janeiro State was made from the data of the Centers for Agricultural Defense (NDA) in the study area, and questionnaires were delivered to farmers. Data were analyzed by drawing a profile of these farms according to their production type, size and breeding system, identifying the occurrence of rabies and the degree of knowledge of the farmers about the virosis at the following locations: Batatal, Boa Vista, Cardoso Moreira, Caxeta, Dores de Macabu, Espírito Santinho, Hatobá, Italiana, Itálva, Pedra Santa, Santa Maria, São Francisco de Itabapoana e Vila Nova. Mixed farming (37%), dairy farms (36%) and beef producing (27%) were typed. For size, 47% were small-scale farming (up to 100 animals), 18% of medium farms (100 to 300 animals) and 35% of large (over 300 animals). The farms had an extensive creation system, even with pasture rotational; 55% of extensive system, 27% of extensive system with pasture rotational, and 18% of pasture rotational. The presence of the vampire bat bite was reported in animals (75%); most farmers showed that knowing the dangers that the vampire bat-transmitted cattle rabies can bring, but often there was negligence on their farms. The "vampiricid topic" and the contact with NDA were the main control measures; 20% of the farmers were applying the "vampiricid topic" on animals attacked, 30% applying the "vampiricid topic" and sought NDA, and 50% sought NDA. All farms had more suspected cases of cattle rabies than confirmed laboratory; 20% of the farmers reported suspected cases in their properties and of these, 50% did not have sent samples for laboratory examination. Regarding the rabies vaccination, most farmers vaccinate their cattle (80%), however in a mistaken way; 75% made in the wrong period, 80% made not strengthening the first dose, and 20% have never used rabies vaccine. The results show that, as in most of Brazil, in Northern and Northwestern of Rio de Janeiro there are underreported cattle rabies cases. Through a greater number of data and a focused effort to cattle farmers, more information on prevention and control of rabies can be transmitted.

\*CNPq/Mapa/SDA auxílio financeiro edital N° 064/2008. CNPq Bolsas. Proex-UENF Bolsas. Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Virologia

e Viroses, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

E-mail: vanessa\_florido@hotmail.com

### Phylogeographic analysis of rabies virus from domestic herbivores and vampire bats in the Rio de Janeiro State, Brazil, between the years 2001 and 2006\*

*Análise filogeográfica de vírus rábico isolado de herbívoros domésticos e de morcegos hematófagos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre os anos de 2001 e 2006*

Pereira, S.R.F.G.<sup>1</sup>; Chicarino, C.N.<sup>1</sup>; Vieira, L.F.P.<sup>1</sup>; Castilho, J.G.<sup>2</sup>; Bernardo-Pedro, T.<sup>1</sup>; Kotait, I.<sup>2</sup>; Câmara, F.P.<sup>3</sup>

Rabies is an enzootic disease in Brazil, including Rio de Janeiro state, especially rabies transmitted by vampire bats. All years are accounted large losses of livestock due to this disease in the State. The aim of this study was perform a phylogeographic analysis of rabies virus in the Rio de Janeiro state. It was analyzed a dataset of 58 genetic sequences from the coding region of the N gene. We isolated 35 samples in the Rio de Janeiro between 2001 and 2006 from vampire bats and domestic herbivores in 18 cities of the State. It was retrieved from GenBank 15 and 8 sequences from São Paulo and Minas Gerais states, respectively. With the Beast v1.6 software package, the group of sequences was analyzed by Bayesian Markov chain Monte Carlo method with the nucleotide substitution model K3Puf + G, strict molecular clock and an exponential growth tree prior. The reconstruction of the spatial-temporal dispersion of the samples, with viewing on Google Earth software, was performed by continuous phylogeographic analysis using relaxed random walks (RRW). The tree topology showed at least four main clusters of rabies virus in the Rio de Janeiro state. In a region of the state can exist, concomitantly, more than one virus lineage. In the South region circulate two lineages, three in the Centre, two in the Metropolitan and only one in the Northern region of the Rio de Janeiro state. It can be noticed among the main clusters the formation of sub-clusters, which consist of samples of nearby cities. Only a single sample from Itaboraí (metropolitan region) is included in a cluster with samples from the south of state. The space-time analysis showed the rapid movement of this sample, leaving the South toward the metropolitan region. Probably, this bovine was transported during the incubation period of the disease. In the Rio de Janeiro city was isolated a sample that has no close relationship with any other sequence analyzed. Probably the horse also was introduced in the Rio de Janeiro state during the incubation period of the disease. The movement of the virus among the States showed a spread of the virus from the Rio de Janeiro state towards the Minas Gerais and São Paulo states. In this case, the samples were genetically closer to those of municipalities near the border between the States. The results show an intense movement of rabies across the Rio de Janeiro state. These data can assist in disease control measures in the State.

\*CNPq/Mapa/SDA Auxílio Financeiro Edital N° 064/2008. CNPq Bolsa.

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Virologia e Viroses, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

E-mail: silvia.goncalves@pq.cnpq.br

<sup>2</sup>Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Microbiologia Professor "Paulo de Góes", Setor de Epidemiologia de Doenças Infecciosas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.