

Marcia Ester Parreira Vasconcellos

**Caracterização biológica, genética e sorológica de uma
amostra de vírus da raiva isolada de eqüino de uma
região próxima de São Paulo, Sudeste do Brasil**

São Paulo

2003

Marcia Ester Parreira Vasconcellos

Caracterização biológica, genética e sorológica de uma amostra de vírus da raiva isolada de eqüino de uma região próxima de São Paulo, Sudeste do Brasil

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

São Paulo

2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1292 FMVZ	<p>Vasconcellos, Marcia Ester Parreira</p> <p>Caracterização biológica, genética e sorológica de uma amostra de vírus da raiva isolada de equino de uma região próxima de São Paulo, Sudeste do Brasil / Marcia Ester Parreira Vasconcellos. -- São Paulo : M. E. P. Vasconcellos, 2003.</p> <p>118 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2003.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Fumio Honma Ito.</p> <p>1. Raiva animal. 2. Equinos. 3. Vacinas. I. Título.</p>
----------------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização genética, sorológica e biológica de uma amostra de vírus da raiva recém-isolada de um eqüino na região de Sorocaba-SP, sudeste do Brasil." Protocolo nº 264/2003, utilizando 1500 camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fumio Honma Ito, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/02/2003.

(We certify that the Research "Genetic, serologic and biologic characterization of a recently isolated equine rabies virus from a region of Sorocaba-SP, Southeastern Brazil" protocol number 264/2003, utilizing 1500 mouses, under the responsibility of Prof. Dr. Fumio Honma Ito, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 02/27/2003 meeting.)

São Paulo, 07 de março de 2003


Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Vasconcellos, Marcia Ester Parreira

Título: Caracterização biológica, genética e sorológica de uma amostra de vírus da raiva isolada de equino de uma região próxima de São Paulo, Sudeste do Brasil

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Dalmo (*in memorian*) e Esterina (*in memorian*)

por semearem em solo fértil
a semente de minha existência, regando-a com carinho e amor, até que ela crescesse se tornando
uma árvore...
Que as raízes profundas desta planta possam sustentá-la viva, gerando bons frutos neste planeta.

Aos mestres Prof. Dr. Fumio Honma Ito, Prof. Dr. José de Angelis Côrtes e Prof. Dr. Omar Miguel; que me sustentaram regando com as suas lições de sabedoria, capacidade, discernimento, paciência e estímulo, dedico a concretização deste trabalho.

Aos frutos que gerei, meus queridos filhos, Fernando, Marcelo, Mauricio e Juliana; agradeço pela seiva de amor, paciência, força e estímulo que me dedicaram no transcurso desta caminhada.

Ao meu marido Silvio, exemplo de conduta profissional, dedico este projeto e divido as alegrias que sinto por concluí-lo.

Às novas sementes geradas, meus netos: Stela e Thiago que representam a continuidade desta planta, dedico este trabalho e que eles no futuro possam semear novas plantas, espalhando paz e justiça social.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Takeo Sakai e Takuya Itou, Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine, da Nihon University, de Fujisawa-shi, Kanagawa, Japão, pela caracterização genética e análise filogenética das amostras do vírus da raiva isoladas no Brasil.

À Dra. Fernanda Bernardi, pela análise antigênica das amostras do vírus da raiva isoladas no Brasil, realizada no Canadian Food and Inspection Agency de Ottawa, Canadá.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela acolhida dedicação de todos os seus componentes, tanto mestres quanto funcionários.

Aos técnicos de laboratório Rosana e Antonio, pelo carinho, colaboração, dedicação e presteza em todos os momentos da execução do projeto.

Ao funcionário Bispo, técnico de comunicação áudio visual, pela paciência e incentivo na montagem da apresentação deste trabalho.

À equipe da biblioteca, em especial a Mara, Margarete e Cláudia, pela disponibilidade e serviços prestados.

Ao médico veterinário Thiago Salles Gomes, pela obtenção de amostras de soros dos equinos em campo.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial àqueles que mais nos incentivaram : Albério, Maria Conceição, Renata, Ricardo, Fábio e Sérgio.

Aos professores Dr. José Soares Ferreira, Dra. Sônia Regina Pinheiro e Dr. Cláudio Camargo, pela colaboração, apoio e inestimável contribuição.

Às secretárias Cristina, Sandra, Tânia e Virgínia, pela colaboração na documentação, formatação e digitação desta pesquisa.

Aos colegas profissionais da Prefeitura Municipal de Santo André, Moreira, Tico, Miguel (*in memorian*), Oscar (*in memorian*), Nivaldo, Jorge, Margarida, Nice, Geni, Dr. Seitiro Assanuma, Dra. Andréia, Dr. Antonio Tancredi Neto, Dr. Robson e Dra. Elma, companheiros de jornada profissional.

Ao Dr. Moacir Rossi Nilsson (*in memorian*) e ao funcionário José Calixto Silva (*in memorian*), pelos valiosos ensinamentos que me proporcionaram no início de minha trajetória em busca do conhecimento nesta área da ciência.

À Universidade Metropolitana de Santos, pelo estímulo recebido para concluir este trabalho.

Ao Marcelo, aluno de graduação da FMVZ-USP, pelo auxílio prestado no processo de tabulação de dados.

A minha irmã Elsa, aos cunhados Célio, Regina e Luis Carlos, pelo apoio.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste projeto.

Obrigada.

RESUMO

VASCONCELLOS, M. E. P. **Caracterização biológica, genética e sorológica de uma amostra de vírus da raiva isolada de equino de uma região próxima de São Paulo, Sudeste do Brasil.** [Biologic, genetic and serologic characterization of an equine rabies virus isolated from a neighbor region of São Paulo, Southeastern Brazil]. 2003. 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

O comportamento biológico de uma amostra de vírus recém-isolada de equino (M82-02), procedente de uma região próxima de São Paulo, foi estudado em camundongos, inoculados pelas vias intracerebral e intramuscular, avaliando-se as características relacionadas com a infectividade, patogenicidade, período de incubação, período do curso clínico e capacidade invasiva do vírus para outros tecidos não-nervosos. A amostra, com uma passagem em cérebro de camundongos, foi tipificada antigenicamente, utilizando um conjunto de anticorpos monoclonais (MABs), desenvolvido pela "Canadian Food and Inspection Agency", de Ottawa, Canadá, correspondendo ao perfil de morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Após ser submetida à extração do material genético, a amostra foi caracterizada geneticamente no "National Institute of Infectious Diseases", de Tóquio, Japão, confirmando pertencer ao genótipo 1 do gênero *Lyssavirus*, com característica próxima a do "Vampire -bat related virus-VRRV", comuns entre as amostras brasileiras isoladas de herbívoros e morcegos hematófagos. As sucessivas passagens da amostra em camundongos, por via intracerebral e intramuscular, provocaram ligeiro aumento no título do vírus e estabilização do período de incubação, quando então foi utilizado como antígeno para a prova de soroneutralização, para avaliar o comportamento deste vírus frente aos soros de equinos vacinados com uma vacina comercial de vírus PV inativado. Os soros de equinos vacinados foram titulados em paralelo com o antígeno viral constituído de vírus CVS. Com o uso da amostra M82-02 como antígeno para a prova de soroneutralização não foi possível

demonstrar diferença significativa, quando comparado com o antígeno fixo de vírus CVS, no entanto, alguns soros de eqüinos vacinados foram encontrados com níveis de anticorpos acima de 0,5UI/mL. Pela prova de imunofluorescência direta (IFD), a presença do antígeno do vírus da raiva foi evidenciada no pulmão e nos rins de animais inoculados por via IM, notadamente nos materiais de passagem mais elevada. No teste de avaliação da vacina comercial, pelo método do CDC de Atlanta, o resultado do desafio com a amostra M82-02 foi inferior ao do vírus fixo CVS, no entanto, este método ainda necessita ser melhorado para sua utilização na rotina.

Palavras chaves: Raiva animal. Eqüinos. Vacinas.

ABSTRACT

ABSTRACT

VASCONCELLOS, M. E. P. **Biologic, genetic and serologic characterization of an equine rabies virus isolated from a neighbor region of São Paulo, Southeastern Brazil.** [Caracterização biológica, genética e sorológica de uma amostra de vírus da raiva isolada de equino de uma região próxima de São Paulo, Sudeste do Brasil]. 2003. 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

The biologic behavior of a rabies virus recently isolated from an equine raised at a region neighbor to São Paulo, Southeast Brazil, the isolate M82-02, was studied in mice by inoculating through intracerebral and intramuscular route, for evaluation of characteristics related to its infectivity, pathogenicity, incubation period and course of clinical illness and also the virus capacity to invade other non-nervous tissues. The first intracerebrally passaged mouse brain was submitted for antigenic typing by using a set of monoclonal antibodies (MABs) prepared at the Canadian Food and Inspection Agency, Ottawa, Canada, and it was found to be a variant of vampire-bat related rabies virus. After extraction of genetic material, the sample was characterized genetically at the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan, and the isolate belonged to genotype 1 of the *Lyssavirus* gene, closely related to the Vampire-bat related virus group-VRRV, common among the Brazilian rabies virus isolates from herbivores and vampire bat *Desmodus rotundus*. The successive intracerebral and intramuscular passages in mice provoked a slight increase in the virus titer, and the stabilization of the incubation period. In its 10th passage, the isolate was used as the antigen in mouse serum neutralization test, for the assessment of equine sera which had been vaccinated with a commercial PV rabies inactivated virus vaccine, the equine sera were tested in parallel with the CVS strain and some sera were found with neutralizing titer >0.5 IU/mL. Using the isolate M82-02 of rabies virus as an antigen in the neutralization test, no significant difference

could be detected, when the results were compared to that of the CVS strain. By means of direct fluorescent antibody (dFA) test, the presence of rabies virus antigen was detected in tissues of brain, lung and kidneys of mice inoculated by intramuscular route, especially in serially passaged materials. The CDC-potency test for evaluation of a commercial vaccine using the field isolate M82-02 as a challenge virus showed a poorer result than the challenge with the fixed CVS strain, however, this method needs further modifications for the routine use.

Key words: Animal rabies. Equines. Vaccines.

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1- Casos de raiva confirmados laboratorialmente em diferentes espécies animais no Estado de São Paulo, nos anos de 1999 a agosto de 2003, segundo a Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva - São Paulo – 2003.....31
- Quadro 2- Resultados da análise do viscerotropismo da amostra M82-02 do vírus da raiva isolada de equino, após inoculação por via intramuscular no membro posterior dos camundongos - São Paulo – 2003.....56
- Quadro 3- Resultados do teste de potência do CDC de Atlanta, expressos em logaritmo de dose protetora (logDP50), desafio com vírus da raiva amostra CVS e amostra de equino M082-02 e doses utilizadas no desafio por via intramuscular - São Paulo – 2003.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da inoculação intracerebral com suspensão a 1:5 (p/v) da amostra isolada de eqüino M82-02, até a 10 ^a passagem e média aritmética do período de incubação, período clínico e desvio padrão - São Paulo - 2003.....	54
Tabela 2 - Resultados da titulação da amostra do vírus da raiva M82-02, isolada de eqüino, após passagens intracerebral e intramuscular sucessivas em camundongos, período de incubação, período clínico e desvio padrão - São Paulo – 2003.....	55
Tabela 3 - Resultados da prova de soroneutralização de soros de equinos vacinados com vacina anti-rábica comercial de vírus inativado, tendo como antígeno a amostra M82-02 e o vírus fixo CVS - São Paulo – 2003.....	58
Tabela 4- Resumo dos resultados do comportamento biológico, sorológico e teste de potência de vacina do CDC de Atlanta realizada com a amostra do vírus da raiva CVS e M82-02, isolada de eqüino São Paulo – 2003.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC = Centers for Disease Control
CVS = "Challenge Virus Standard"
DFA = direct fluorescent antibody
DIRA = Divisão Regional Agrícola
DLIC₂₅ = dose letal intracerebral 25%
DLIC₅₀ = dose letal intracerebral 50%
DLIC₇₅ = dose letal intracerebral 75%
DLIM₅₀ = dose letal intramuscular 50%
DP₅₀ = dose protetora 50%
DRRV = "Dog-related rabies virus"
FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC = intracerebral
IFD = imunofluorescência direta
ICC = inoculação intracerebral em camundongos
IM = intramuscular
log = logarítimo de base 10
M82-02 = amostra isolada de equino, sob registro No. 82, em 2002.
MABs = anticorpos monoclonais
µg = micrograma
mL = mililitros
NIH = National Institutes of Health
nm = nanômetro
OIE = Office International de Epizooties
OMS = Organização Mundial da Saúde
p/v = peso/volume
PBS = Phosphate buffered saline
pH = potencial hidrogeniônico
PV = Pasteur virus
RNA = Ribonucleic acid
RT-PCR = Reverse transcriptase - polymerase chain reaction
SAD = Street Alabama Dufferin
SE(DLIC₅₀) = erro padrão da média DLIC₅₀
SN₅₀ = Título soroneutralizante 50%
SP = São Paulo
UI/mL = unidade internacional por mililitro
UNIMS = Universidade Metropolitana de Santos
USP = Universidade de São Paulo
Vs = versus
v/v = volume/volume
VPS = Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
VRRV = "Vampire-bat related rabies virus"
WHO = World Health Organization

Nota: tendo em vista o uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

α = nível de confiança “alfa”

\div = dividir

US\$ = dólar norte-americano

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

= = igual

$>$ = maior que

+ = mais

\pm = mais ou menos

® = marca registrada

$<$ = menor que

% = porcentagem

ϕ = pseudogene da região intergênica G-L

$\sqrt{\quad}$ = raiz quadrada

x = vezes

Z = símbolo estatístico, variável normal padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1	MATERIAIS	40
2.1.1	Animais	40
2.1.1.1	Camundongos.....	40
2.1.1.2	Equinos.....	41
2.1.2	Diluyente	41
2.1.3	Vacina anti-rábica	41
2.1.4	Soros	42
2.1.4.1	Soros eqüinos.....	42
2.1.4.2	Soro anti-rábico padrão.....	42
2.1.5	Conjugado anti-rábico imunofluorescente	42
2.1.6	Amostra do vírus da raiva	43
2.1.6.1	Amostra do vírus da raiva de equino M82-02.....	43
2.1.6.2	Amostra CVS (Challenge Virus Standard).....	44
2.2	MÉTODOS	44
2.2.1	Caracterização biológica da amostra isolada de equino M82-02	45
2.2.2	Teste de potência de vacina de CDC de Atlanta	46
2.2.3	Prova de inoculação intracerebral em camundongos (ICC)	46
2.2.4	Prova de imunofluorescência direta (IFD)	47
2.2.5	Titulação do Vírus	47
2.2.6	Prova de soroneutralização	48
2.2.7	Caracterização antigênica com MABs	49
2.2.8	Caracterização genética	49
2.2.9	Reação em cadeia pela polimerase-transcriptase reversa - RT-PCR	49
2.2.10	Seqüenciamento de vírus	50
2.2.11	Análise filogenética	50
2.2.12	Estatística descritiva e analítica	51
3	RESULTADOS	53
4	DISCUSSÃO	62
5	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

A raiva em eqüinos é descrita na literatura internacional como sendo uma zoonose de ocorrência esporádica, altamente fatal, causada por um *Lyssavirus*. Na América do Norte, a doença, como zoonose, oferece pequeno risco de infecção aos seres humanos e até o presente, não existem casos documentados de transmissão do vírus da raiva de eqüinos aos seres humanos, embora exista uma possibilidade remota (GALLAGHER, 1998).

A doença no ser humano é conhecida desde o século XXII a.C., sendo relatada no mais antigo registro de infecções da Humanidade, o código de Eshununna, escrito há mais de 2.500 anos, na Mesopotâmia (STEELE, 1975). Apesar dos avanços tecnológicos nos vários campos da medicina, a enfermidade representa um desafio para o homem, por ser incurável (CAMPBELL, 1988; COSTY, 1985).

O vírus da raiva pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, que agrupa vírus que infectam vertebrados, invertebrados e plantas. Os vírus do gênero *Lyssavirus*, aonde se incluem os vírus da raiva, são constituídos por um filamento simples de RNA com aproximadamente 12K bases, não segmentado, de sentido negativo (3' - 5'), possuindo cinco proteínas, designadas de N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína da matriz), G (glicoproteína) e L (lipoproteína) (TORDO, 1996).

No gênero *Lyssavirus*, estavam incluídos diferentes sorotipos (KING; CRICK, 1988) que, a partir de 1994, passaram a ser denominados de genótipos, em virtude do desenvolvimento de técnicas de anticorpos monoclonais (MABs), permitindo identificar as variantes antigênicas do vírus da raiva (FLAMAND; WIKTOR; KOPROWSKI, 1980; PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2000) e de técnicas moleculares, que possibilitaram o estabelecimento da filogenia e o estudo da distribuição espacial e temporal do agente, ferramentas importantes para a epidemiologia molecular (BOURHY; KISSI; TORDO, 1993). O vírus clássico da raiva, o sorotipo I, recebeu a denominação de “genótipo I”, e os demais foram denominados de “genótipo II”, “genótipo III”, “genótipo IV”, correspondendo, respectivamente, aos sorotipos “Lagos Bat virus”, “Mokola virus” e “Duvenhage virus” (TORDO, 1996). Destes, o “Mokola virus” é o mais

diferente de todos os genótipos conhecidos, a primeira amostra foi isolada em 1968, de um "pool" de vísceras de um mussaranho, da província de Ibadan, na Nigéria (BLANCOU, 1988).

Os vírus isolados de morcegos insetívoros da Europa, denominados de EBL1 e EBL2 (European Bat Lyssaviruses 1 e 2) foram classificados respectivamente como "genótipos 5 e 6" (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994) e o vírus ABL (Australian Bat Lyssavirus), de morcegos frugívoros, como genótipo 7. Os genótipos 5, 6 e 7, isolados de morcegos não hematófagos, são conhecidos no mundo como "lyssavírus" e até o presente, a existência destes vírus não tem sido registrada nas Américas (TORDO et al., 2000). Recentemente, ARAI et al. (2003) propuseram a inclusão de um novo genótipo, o "Aravan virus", isolado de um morcego insetívoro *Myotis blythi*, no Kirguistão, Ásia Central. Este provável novo genótipo apresenta características filogenéticas mais próximas às dos genótipos EBL1 e EBL2.

Para a classificação em genótipos, têm sido utilizados os genes N, G e P do vírus da raiva, com maior frequência do gene N por ser mais conservador, com amplificação inicial do gene utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), com posterior seqüenciamento dos nucleotídeos (KISSI; TORDO; BOURHY, 1995). No estudo de filogenia, Ito et al. (2003), com seqüenciamento do gene N, relataram a ocorrência de duas variantes do vírus da raiva nas amostras de vírus isoladas no Brasil: variante do vírus da raiva relacionada ao cão (DRRV - Dog-related rabies virus) e variante do vírus da raiva relacionada ao morcego hematófago (VRRV - Vampire bat-related rabies virus), indicando que a variante canina é um legado da colonização européia e a de morcego hematófago, autóctene das Américas. A proteína G, por outro lado, está envolvida com a formação do envelope e do capsídeo mais externo do vírus e é responsável pela adsorção do vírus à superfície da célula e fusão com a membrana, relacionada com a imunogenicidade, patogenicidade e neurotropismo do vírus (TUFFEREAU et al., 1989). Para a investigação da patogenicidade do vírus, é importante analisar a proteína G, e a região intergênica G-L, conhecida por região não codificadora (pseudogene ϕ), também utilizada por alguns autores para o estudo da epidemiologia molecular (SABETA; BINGHAM; NEL, 2003)

Na América Latina, o cão ainda é o principal reservatório do vírus da raiva aos seres humanos (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1992), no entanto, existe a participação de outros animais silvestres na transmissão do vírus. Historicamente, Carini (1911)

foi quem pela primeira vez descreveu, no Estado de Santa Catarina, região Sul do Brasil, a participação do morcego hematófago como reservatório do vírus da raiva, sendo a idéia, na época, interpretada pela comunidade científica, como uma “fantasia tropical”. Anos mais tarde, com o registro da raiva em morcegos hematófagos na ilha de Trinidad, situada no Caribe (PAWAN, 1936), o mundo científico aceitou definitivamente a comunicação científica de que os morcegos hematófagos eram mesmo os reservatórios do vírus da raiva. As pesquisas realizadas após o reconhecimento deste fato, efetuadas nas Américas, indicaram que os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii* só habitavam as regiões compreendidas entre o norte da Argentina até o norte do México e algumas ilhas do Caribe (CARNEIRO, 1936).

A raiva dos herbívoros, transmitida pelos morcegos hematófagos, recebeu a denominação de “raiva parálitica”, com grande repercussão na pecuária, especialmente da América do Sul e Central (QUEIROZ LIMA, 1934). Acha (1967) calculou uma perda de cerca de 500.000 cabeças de bovinos por ano, em conseqüência da infecção pelo vírus da raiva. Estimativa mais recente no Brasil indica um prejuízo direto de cerca de U\$25 milhões de dólares a cada ano, com morte de 40.000 bovinos e prejuízos indiretos de cerca de U\$32 milhões de dólares (KOTAIT, 2001).

Em relação aos eqüinos, não existe uma estimativa dos prejuízos causados pela doença, como nos bovinos, no entanto, foi estimada para o país, a existência de um efetivo animal de cerca de 5.801.055 eqüinos, somando-se ainda 1.239.025 asininos e 1.345.656 muares (IBGE, 2001).

Contrariamente ao que é observado na América Central e América do Sul, onde predomina a raiva transmitida por morcegos, na América do Norte a doença é transmitida aos eqüinos principalmente por “raccoons” e “skunks” e a raiva em eqüinos é rara, sendo de menor importância, acometendo cerca de 5% dos casos relatados, ocorrendo em ciclos de oito a 10 anos (KENTUCKY COOPERATIVE EXTENSION SERVICE, 2003).

Em certas regiões da Europa, a raiva em eqüinos também é de ocorrência esporádica e muito rara. Na Finlândia, o último registro de ocorrência da raiva aconteceu em 1989, com um caso envolvendo um animal silvestre. No entanto, em 2003 foi registrado um caso de raiva num

eqüino importado de um país vizinho, apontando ser este o primeiro registro da raiva em eqüinos no país. (OIE, 2003).

Por outro lado, nas Américas, foram notificados 313 casos de raiva em eqüídeos e no Brasil, um total de 230 casos, para o ano de 2001 (OMS. OPS, CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA, VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA RABIA EN LAS AMÉRICAS, 2001). Em relação ao Estado de São Paulo, entre os anos de 1999, 2002 e 2003 (dados parciais), os eqüinos representam a segunda espécie animal com maior número de casos de raiva, diagnosticados laboratorialmente, considerando as diferentes espécies, conforme os dados apresentados no quadro 1.

Espécie animal \ Ano	1999 ⁽¹⁾	2000 ⁽²⁾	2001 ⁽³⁾	2002 ⁽⁴⁾	2003 ⁽⁵⁾	Total por espécie
Canina	4	4	8	1	0	17
Felina	1	0	4	1	0	6
Bovina	431	623	424	143	61	2675
Eqüina	104	231	185	86	35	606
Muar	1	6	14	2	4	23
Asinina	1	1	0	3	1	5
Ovina e Caprina	3	9	8	1	1	21
Bubalina	3	0	2	1	1	6
Suína	0	4	9	0	0	13
Quiróptera	28	69	60	76	75	233
Outras	-	-	-	7	0	7
Total	576	947	714	314	178	3790

Quadro 1 - Casos de raiva confirmados laboratorialmente em diferentes espécies animais no Estado de São Paulo, nos anos de 1999 a agosto de 2003, segundo a Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva - São Paulo - 2003

Nota:

(1) Acessível at <http://www.pasteur.saúde.sp.gov.br/coordenação.1999.htm>

(2) <http://www.pasteur.saúde.sp.gov.br/coordenação.2000.htm>

(3) <http://www.pasteur.saúde.sp.gov.br/coordenação.2001.htm>

(4) <http://www.pasteur.saúde.sp.gov.br/coordenação.2002.htm>, acessado em 28/01/2003.

(5) Dados não publicados, Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva do Estado de São Paulo, agosto de 2003.

Fonte: Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva do Estado de São Paulo.

Em 1999, dos 576 casos positivos para a raiva, 349 foram notificados pela região administrativa da Divisão Regional Agrícola (DIRA) de Campinas e na DIRA de São João da Boa Vista, 56 casos. Em 2000, dos 947 casos positivos, 469 ocorreram na DIRA de Campinas e 227 na de São João da Boa Vista. Em 2001, do total de 714 casos, 259 ocorreram novamente em Campinas e região e em São João da Boa Vista, 277 casos. Em 2002, dos 314 casos registrados, 86 foram em eqüinos, com 30 casos na DIRA de Campinas e 25, na região de São João da Boa Vista. Para o ano de 2003, até o mês de agosto, no Estado de São Paulo já tinham sido registrados 35 casos de raiva em eqüinos, notadamente nas regiões mais próximas da capital, indicando ser esta uma região de elevada endemicidade, porém, sem constatação da doença em cães e gatos. Por outro lado, a ocorrência de casos de raiva em eqüinos não tem sido registrada em regiões mais distantes da capital de São Paulo.

A raiva em eqüinos é considerada de difícil diagnóstico clínico, por compreender uma grande variação de sinais. Historicamente, as descrições dos sintomas iniciais se referiam à forma "furiosa", "silenciosa" e "paralítica" da doença, no entanto, estes sinais podem ser enganosos. Após um período de incubação de duas a 10 semanas, a manifestação mais característica da raiva é a alteração do comportamento. Os sinais e sintomas observados são semelhantes aos de bovinos, com predominância da fase de excitação. Frequentemente são observados coices, ou mordem outros animais ou os objetos em movimento. As orelhas permanecem levantadas e observa-se uma salivação intensa, a saliva se escorre por meio de lábios torcidos, seguindo-se uma fase de disfagia marcante. Em seguida, podem ocorrer cólicas, convulsões e paralisia, que se estende da cabeça à região do pescoço e às musculaturas da locomoção e a morte ocorre após um período de decúbito e prostração. Os sintomas nervosos usualmente progredem rapidamente dentro de cinco a sete dias, resultando invariavelmente na morte do animal. Por outro lado, se o animal não manifestar os sinais característicos da doença e permanecer sem a piora dos sinais e sintomas, por um período de cinco ou mais dias, outras possibilidades devem ser investigadas, pois, o episódio final da raiva é sempre marcado pela fatalidade (GALLAGHER, 1998; KENTUCKY COOPERATIVE EXTENSION SERVICE, 2003).

O diagnóstico laboratorial da raiva é realizado rotineiramente com os materiais obtidos do sistema nervoso central, incluindo-se os fragmentos do encéfalo, cerebelo e medula espinhal. Ao exame microscópico, alguns membros da família *Rhabdoviridae*, como no caso dos vírus da raiva, são distinguidos de outros membros do grupo pela formação de corpúsculo de inclusão intracitoplasmática característica, descrito pela primeira vez por Negri, conforme Atanasiu (1975).

Antes da descoberta de Negri, a descrição das lesões histológicas da raiva se baseava nos processos inflamatórios, com alterações na conformação e tamanho das células nervosas e outros fenômenos como cariólise, vacuolização no citoplasma e desaparecimento dos corpúsculos de Nissl. Os corpúsculos de Negri, considerados patognomônicos para a raiva, foram descritos com diferentes formas e tamanhos, variando de 0,25 μm a 27 μm , arredondados, ovais ou oblongos, encontrados principalmente nas células piramidais do corno de Ammon, nas células de Purkinje do cerebelo, nas células da medula espinhal e de vários gânglios nervosos (MATSUMOTO, 1975). As lesões de encefalite podem apresentar uma hiperemia marcante, seguida de diapedese e

formação de nódulos perivasculares, com participação de células mononucleares, tais como os linfócitos, monócitos e plasmócitos, encontradas nas áreas de neuronofagia. As lesões ganglionares consistem de uma proliferação de células endoteliais, oriundas da cápsula da medula espinhal ou do nervo simpático ganglionar, com substituição de células normais por células arredondadas e pequenas, com alterações no núcleo da célula. A abundância dos corpúsculos de Negri varia conforme a espécie animal, amostra do vírus e da passagem do vírus em sistemas biológicos, acreditando-se ainda que o desenvolvimento do corpúsculo de Negri está relacionado com o período de duração clínica da doença antes da morte (ATANASIU, 1975).

A técnica histológica nem sempre é adequada para demonstrar a presença de corpúsculos de Negri, que pode ser evidenciada em 50 a 80% dos casos (CHARLTON, 1994; VURAL; BERKIN, 2001) e para o diagnóstico de rotina da raiva, a técnica histológica foi substituída pela imunofluorescência direta (IFD), com o uso de conjugado anti-rábico policlonal marcado pelo isotiocianato de fluoresceína, após o relato de Goldwasser e Kissling (1958). Porém, permanece ainda a questão de resultados falsos positivos e falsos negativos, decorrente do uso desta técnica. Para minimizar estes erros, os especialistas que contribuem para a Organização Mundial da Saúde recomendam o uso de pelo menos duas técnicas para o estabelecimento do diagnóstico: a IFD e a inoculação intracerebral em camundongos (ICC) (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996; KOPROWSKI, 1996).

Como materiais de escolha para o diagnóstico laboratorial da raiva, tradicionalmente têm sido recomendados os fragmentos do cérebro, região do hipocampo e do cerebelo, bulbo e medula cervical. Existe, no entanto, uma polêmica a respeito do melhor material a ser enviado para o laboratório, para possibilitar um diagnóstico rápido e acurado, especialmente quando se refere à raiva de eqüinos. Neste aspecto, Silva, Silva e Menezes (1974) relataram vários casos de raiva natural em eqüinos, com isolamento de vírus infectante em camundongos e positivo na prova de IFD, nos materiais colhidos da medula e do bulbo e com ausência do antígeno ou do vírus em outras partes do sistema nervoso central, afirmando que o fragmento do corno de Ammon não era adequado para o diagnóstico da raiva nesta espécie.

Mesmo na atualidade, a polêmica persiste, não só na espécie eqüina, mas em diferentes espécies animais. Bingham e van der Merwe (2002) relataram que os fragmentos do tálamo,

ponte e medula foram os que apresentaram 100% de resultados positivos à imunofluorescência , no entanto, os fragmentos do cerebelo, hipocampo e diferentes partes do cérebro foram encontrados com resultados falsos negativos, respectivamente, em 4,5%; 4,9%; e 3,9% a 11,1%. Carrieri et al. (2003)⁽¹⁾ relataram a dificuldade em diagnosticar raiva em materiais colhidos de eqüinos: em 111 amostras positivas para raiva, examinadas no período de 1980 a 1994, 20% delas resultaram em falsos negativos pela prova de IFD.

No Instituto Pasteur de São Paulo, órgão da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, a raiva em eqüinos é considerada de difícil diagnóstico. Nos casos humanos envolvendo contato com um eqüino suspeito de raiva, o procedimento adotado é o de tratamento com vacina, semelhante ao tratamento pós-agressão adotado para outras espécies animais. Mesmo no caso de resultado negativo à prova de IFD, é recomendado o tratamento anti-rábico de pós-exposição (Instituto Pasteur de São Paulo, dados não publicados), uma vez que a prova de ICC é mais demorada e usualmente o resultado é obtido após o término da vacinação.

A modificação ambiental ocorrida nas últimas décadas, especialmente nas regiões próximas às áreas intensamente urbanizadas ((FRANCO NETTO; CARNEIRO, 2002) poderia explicar o aumento dos casos de raiva no Brasil. Os casos de raiva em eqüinos com confirmação laboratorial, indicados no quadro 1, foram registrados com maior freqüência na divisão administrativa (DIRA) de Campinas e na próxima a Grande São Paulo. Nas regiões próximas da cidade de São Paulo predominam haras de criação mais sofisticada, com assistência veterinária especializada em eqüinos. É comum ouvir reclamação por parte dos veterinários de campo, suspeitando da eficácia das vacinas anti-rábicas disponíveis no mercado brasileiro para a

¹CARRIERI, M. L.; PEIXOTO, Z. M.; FAVORETTO, S. R.; CARNIELI JR., P.; KOTAIT, I. Diagnóstico laboratorial da raiva dos eqüídeos: dados preliminares. Seminário Internacional da Raiva: Centenário do Instituto Pasteur. **Programa e Resumos**. 5-7 de agosto, 2003, Hotel Crowne Plaza, São Paulo, SP, Brasil.

imunização desta espécie animal. Fala-se em falhas de vacinas, em virtude da existência de amostras antigenicamente distintas (WIKTOR; KOPROWSKI, 1980), ou da maior susceptibilidade dos eqüinos às variantes dos vírus circulantes na região, porém todas estas colocações carecem de um estudo científico mais apurado.

As vacinas anti-rábicas comerciais fabricadas a partir de amostras do vírus da raiva incluídas no genótipo 1 são eficazes contra os vírus clássicos do vírus da raiva (genótipo 1) e mais ou menos eficazes contra outros vírus dos genótipos 4, 5, 6 e 7 do gênero *Lyssavirus*. São, por outro lado, completamente ineficazes contra os genótipos 2 e 3. Até o momento, não se tem registros da ocorrência da doença causada por um lyssavirus em eqüinos, nem mesmo o papel desempenhado pelos morcegos não hematófagos na transmissão dos lyssavirus para os herbívoros tem sido esclarecido, embora os pesquisadores já imaginam a possibilidade de se obter vacinas quiméricas com base na proteína G, para se prevenir contra a maioria dos vírus de diferentes genótipos do gênero *Lyssavirus* (TORDO et al., 2000).

Os testes para avaliar a capacidade de uma vacina anti-rábica em induzir a proteção nos indivíduos vacinados foram desenvolvidos há décadas, com uso de modelos animais vivos. No entanto, o uso de animais de laboratório, como os camundongos (*Mus musculus*) para a pesquisa e diagnóstico da raiva iniciou-se com Webster e Dawson (1935), de acordo com Steele (1975), que relataram, pela primeira vez a grande susceptibilidade desta espécie animal à inoculação intracerebral do vírus da raiva, reproduzindo prontamente os corpúsculos de inclusão intracitoplasmática. Os camundongos desenvolveram a doença dentro de sete dias, em alguns casos demoraram até 28 dias. Quando inoculados por via intracerebral ou intraplantar com um vírus de rua, o antígeno da raiva foi detectado no tecido da córnea, glândula salivar, gordura marrom, pulmão, intestino, rim, coração, fígado, baço, útero, músculo esquelético e glândula adrenal. Foi também mostrado que o vírus da raiva se replica na glândula salivar, e o título do vírus é muito mais elevado que no cérebro e à microscopia eletrônica, observou-se o brotamento dos vírions através das membranas marginais das células mucogênicas acinares (DIERKS, 1975).

Em 1939, Webster e Dawson, de acordo com Steele (1975), desenvolveram um teste em camundongos para a avaliação da potência de uma vacina anti-rábica, demonstrando que um vírus virulento, inoculado intraperitonealmente como uma vacina desenvolvia imunidade dentro

de 10 dias, persistindo por um período de pelo menos nove meses. A grande variação nas potências das vacinas comerciais culminou com o desenvolvimento de outros testes de potência, como os de Habel, NIH (National Institutes of Health) e Koprowski, entre outros (STEELE, 1975). Apesar da grande variabilidade, baixa reprodutibilidade e falta de acurácia nos resultados do teste de potência do NIH (MESLIN; KAPLAN, 1996), este teste ainda é considerado como sendo o mais padronizado para a avaliação de vacinas de vírus inativado, tendo como o vírus de desafio intracerebral, a amostra fixa CVS (WILBUR; AUBERT, 1996).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) coordenou os estudos sobre os testes de potência das vacinas anti-rábicas, investigando a possibilidade de substituir o teste de NIH por um teste *in vivo* modificado, alterando a amostra do vírus de desafio, número de vacinações, via de inoculação da vacina, e via de inoculação do vírus de desafio (REPORT OF A WHO CONSULTATION ON POTENCY TESTS FOR RABIES VACCINES, 1988).

O teste de potência do CDC (Centers for Disease Control) de Atlanta, Georgia, EUA, surgiu como uma alternativa, com ligeira modificação dos testes anteriormente conhecidos, isto é, ao invés da inoculação intracerebral do vírus fixo, o desafio é intramuscular, realizado com amostras de campo. O argumento principal a favor do teste de potência do CDC de Atlanta é que o vírus inoculado no desafio reproduz uma via mais natural, pois, em outros testes, o desafio é por via intracerebral (BAER, 1997; SIZARET, 1996; WILBUR; AUBERT, 1996).

Bernardi (2002) comparou a eficácia de duas vacinas comerciais (uma importada e outra, de fabricação nacional) de vírus PV, replicado em células BHK21 e inativado pela beta propiolactona, tendo como adjuvante o hidróxido de alumínio, com uso de amostras de vírus de campo para o desafio, utilizando os testes de potência do NIH e do CDC de Atlanta. A vacina importada conferiu melhor proteção quando o desafio foi realizado com amostra de vírus isolada de um morcego insetívoro, tanto no teste do NIH (Dose protetora 50%, $DP_{50} = 144,54$) como no do CDC ($DP_{50} > 250$). O pior desempenho foi observado com a amostra de desafio de um morcego hematófago, no teste do CDC ($DP_{50} = 4,57$) e, com uma amostra de equino, no teste

do NIH ($DP_{50} = 8,91$). Por sua vez, a vacina de fabricação nacional mostrou melhor desempenho no teste do CDC, frente aos vírus de desafio de origem canina e equina ($DP_{50} > 250$). A amostra que apresentou maior proteção no teste do NIH foi a de morcego insetívoro com $DP_{50} = 123,27$. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre o desempenho das vacinas, quando comparado para um mesmo teste de potência e amostra de desafio.

Smith et al. (2000) analisaram a relação filogenética para prever o efeito de diferentes amostras do vírus de desafio utilizados nos testes de soroneutralização para a titulação de anticorpos anti-rábitos, após vacinação com diferentes amostras vacinais. Foram observadas diferenças de até 10% na seqüência dos amino ácidos entre as glicoproteínas das amostras vacinais e das amostras de desafio, porém, o uso de sistemas homólogos de vacina-vírus de desafio não é prático e é desnecessário para indicar a presença de anticorpos acima de 0,5 UI/mL. As vacinas da nova geração são potentes e as pequenas diferenças nos títulos não são detectadas nos testes de triagem, que poderiam resultar da não combinação homóloga entre a vacina e o vírus de desafio.

A raiva em eqüinos mantém ainda muitos aspectos desconhecidos e, embora na prática exista uma metodologia de controle baseada na imunização com emprego de vacinas (BUNN, 1988), epidemiologicamente, as ocorrências da raiva nesta espécie animal na região próxima da capital do Estado de São Paulo, nos últimos anos, permanecem inexplicadas.

Pode ser que, nos últimos anos, houve um aumento no envio de materiais de eqüinos suspeitos aos laboratórios de diagnóstico; ou então, a maior ocorrência de casos de raiva pode estar associada à existência de uma variante de vírus com características diferentes em relação a estes hospedeiros, com proteção incompleta dos imunógenos utilizados para o seu controle, ou ainda, aumento na população de reservatórios, em decorrência da modificação do ambiente, entre outras causas.

Objetivos:

O presente trabalho tem como objetivos:

- estudar a característica biológica, genética e sorológica de uma amostra do vírus da raiva isolada de eqüino, de uma região próxima da cidade de São Paulo;
- avaliar a infectividade, patogenicidade, período de incubação e período clínico da amostra isolada eqüino, por meio de passagens sucessivas por inoculação intramuscular e intracerebral;
- avaliar o nível da resposta em anticorpos anti-rábicos de eqüinos de um haras próximo de São Paulo, vacinados com uma vacina anti-rábica comercial de vírus inativado, tendo como antígeno da prova de soroneutralização em camundongos, a amostra de vírus isolada de eqüino após sucessivas passagens em camundongos e a amostra CVS;
- avaliar a potência da vacina anti-rábica comercial utilizada para vacinar os eqüinos de um haras próximo de São Paulo, empregando o teste de potência do CDC de Atlanta, tendo como vírus de desafio, a amostra de eqüino e CVS.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os Materiais e Métodos utilizados no presente experimento estão relacionados em seguida.

2.1 MATERIAIS

Os Materiais empregados neste estudo foram:

2.1.1. Animais

Os animais utilizados no experimento foram:

2.1.1.1 Camundongos

Os camundongos utilizados no presente experimento foram os suíços albinos, adultos-jovens, com peso variando de 12 a 17 gramas, linhagem CH3 - Rockefeller, criados no Biotério da FMVZ-USP. Esta linhagem foi obtida do biotério de animais do Laboratório de Febre Aftosa-LAFAB, do Ministério da Agricultura, localizada em Barretos-SP, na década de 70 do século passado. Os animais foram empregados para o diagnóstico e isolamento do vírus da raiva, além da titulação do vírus, prova de soroneutralização e teste de potência da vacina. Todos os animais sobreviventes no final dessas provas foram submetidos à eutanásia com éter etílico e as carcaças foram autoclavadas e destinadas para a coleta do lixo hospitalar.

2.1.1.2. Eqüinos

Os eqüinos do presente estudo pertenciam a um haras situado no município de Salesópolis - SP, região próxima de São Paulo. Cinquenta e quatro animais, machos e fêmeas de diferentes faixas etárias, incluindo animais primo-vacinados e revacinados, foram vacinados contra a raiva, por via IM, com uma vacina anti-rábica comercial de vírus inativado, em outubro de 2002 e foram sangrados 58 dias após a vacinação.

2.1.2 Diluente

O diluente utilizado para diluir os vírus e os soros de eqüinos consistiu de água destilada esterilizada, contendo 2% (v/v) de soro de coelho, esterilizado por filtração (filtro clarificante Millipore®¹ tipo HA, com porosidade 0,45 µm, 142 mm), pH 7,2, contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (2g/mL), conforme descrito por Koprowski (1996).

2.1.3 Vacina anti-rábica

A vacina anti-rábica utilizada no presente experimento foi a vacina comercial®⁽²⁾, No. partida 009/02, contendo o vírus PV, inativado com beta propiolactona, contendo hidróxido de alumínio, na dose indicada de 2 mL por via IM, na tábua do pescoço.

⁽¹⁾Filtro Millipore, Millipore Corporation, Bedford, 01730 Massachussets.

⁽²⁾®Vacina anti-rábica comercial, RaivaCel, Vallée do Nordeste, Minas Gerais - MG.

2.1.4 Soros

2.1.4.1 Soros eqüinos.

A sangria dos 54 eqüinos vacinados com uma vacina anti-rábica comercial de vírus inativado foi realizada 58 dias após a última vacinação, por venopunção da veia jugular, na tábua do pescoço, com tubos Vacutainer. Após o dessoramento, os soros foram transportados ao laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da FMVZ-USP e foram armazenados a -20°C , até o momento do uso. Dez soros foram selecionados por conveniência, numa amostragem não probabilística, selecionando sem uma regra definida pegando um frasco por vez, de uma caixa de isopor onde os soros estavam armazenados, como num sorteio de "bingo", até completar 10 frascos. Os frascos foram numerados de 1 a 10 e após descongelamento, os soros foram submetidos à inativação do complemento, em banho-maria a 56°C , por 90 minutos, antes de serem submetidos à prova de soroneutralização.

2.1.4.2 Soro anti-rábico padrão

Na prova de soroneutralização em camundongos, utilizou-se o soro anti-rábico positivo padrão, contendo 300 UI/2mL de anticorpo anti-rábico, procedente do Instituto Pasteur de São Paulo (Secretaria do Estado da Saúde do Estado de São Paulo).

2.1.5 Conjugado anti-rábico imunofluorescente

Foi utilizado o conjugado anti-rábico policlonal, produzido no Laboratório de Raiva do Departamento VPS da FMVZ-USP, a partir de soro hiperimunizado de hamsters, conforme o protocolo descrito pelo Centro Panamericano de Zoonoses (1975), com ligeira modificação, isto

é, o antígeno foi substituído por uma vacina anti-rábica comercial^{®(3)}. A marcação do conjugado foi realizada com o isotiocianato de fluoresceína (SIGMA)^{®(4)} e o conjugado obtido foi comparado com o conjugado anti-rábico comercial^{®(5)}, antes da sua utilização, com a diluição de trabalho ajustada para 1:100.

2.1.6 Amostras do vírus da raiva

2.1.6.1 Amostra do vírus da raiva de equino M82-02

A amostra de cérebro de equino, procedente da região de Sorocaba, distante 90Km de São Paulo, registrada sob o número M82-02, foi diagnosticada como sendo positiva para raiva, pela técnica de IFD, no Laboratório de Diagnóstico da Raiva, do Departamento VPS, FMVZ-USP. O material original e os cérebros da primeira passagem em camundongos foram armazenados a -20°C e posteriormente, submetidos a passagens sucessivas em camundongos. As últimas passagens desta amostra em camundongos foram testadas como antígeno para a prova de soroneutralização em camundongos, para avaliar os soros obtidos de equinos vacinados. No teste de potência da vacina do CDC de Atlanta, esta amostra foi utilizada para o desafio dos camundongos vacinados com uma vacina anti-rábica comercial.

⁽³⁾Vacina anti-rábica comercial Defensor[®], Laboratórios Pfizer Ltda, Guarulhos, São Paulo.

⁽⁴⁾Isotiocianato de fluoresceína, isômero I[®] - Sigma Chemical Company.

⁽⁵⁾Conjugado comercial[®] Sanofi Diagnostic P92430, Marnes-la Coquette-França.

2.1.6.2 Amostra CVS (Challenge Virus Standard)

Foi utilizada a amostra CVS-31/2 do vírus fixo de raiva, procedente do Centro Panamericano de Zoonoses - CEPANZO, Argentina, na década de 80 do século passado, com duas passagens em camundongos por via IC, antes de ser armazenada em temperatura de Nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uma vez descongelado, o vírus foi mantido por quatro passagens sucessivas pela via IC em camundongos, quando então foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para sua utilização, a amostra foi submetida a duas passagens sucessivas em camundongos, via IC, e utilizada nas provas de soroneutralização, ou como antígeno, na prova de IFD para a absorção do conjugado anti-rábico imunofluorescente policlonal e como vírus de desafio, na prova do teste de potência da vacina do CDC de Atlanta.

2.2 MÉTODOS

O procedimento experimental utilizado foi o seguinte:

Procedimento Experimental

Um espécime clínico (registro M82-02) de equino, procedente da região de Sorocaba -SP, distante 90 Km da capital, foi diagnosticado positivo para a raiva com a técnica de IFD e com isolamento positivo em camundongos, por meio da inoculação intracerebral (IC), no Laboratório de Raiva, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP, em 2002. Os fragmentos originais do cérebro de equino e os cérebros correspondentes à primeira passagem em camundongos foram utilizados para a caracterização antigênica, com o uso de MABs e para a extração do RNA. A caracterização antigênica desta amostra foi realizada no laboratório do "Canadian Food and Inspection Agency", de Ottawa, Canadá. Os materiais submetidos à extração do ácido nucleico foram enviados ao "National

Institute of Infectious Diseases", de Tóquio, Japão, para a caracterização genética e estudo filogenético.

Do cérebro original do equino foi preparada uma suspensão a 20% (p/v) com diluente e em seguida foi inoculada em um grupo de 10 camundongos, por via intramuscular (IM) e IC. De cada passagem IM e IC, dos animais encontrados mortos foram colhidos os cérebros e preparadas as suspensões a 20% (p/v), repetindo-se a operação, até completar 10 passagens por via IM e IC. Em cada passagem, as suspensões do cérebro a 20% foram diluídas em série com razão de 10, para titulação do vírus, mantendo-se uma alíquota de reserva para cada passagem. Dos animais inoculados por via IM, no membro posterior direito, após a morte, foram colhidos os materiais do cérebro, rins e pulmão, para análise do viscerotropismo do vírus, submetendo-os à prova de IFD.

A suspensão viral obtida com o cérebro de camundongo na 10^a passagem do vírus pela via IC foi utilizada como antígeno para a prova de soroneutralização dos soros de equinos vacinados contra a raiva, com uma vacina comercial de vírus inativado. Os soros destes animais foram avaliados em paralelo, tendo como antígeno o vírus fixo CVS.

A potência da vacina anti-rábica comercial utilizada para imunizar os equinos foi avaliada pelo método do CDC de Atlanta, Georgia, EUA, utilizando as amostras CVS e de equino M82-02 como vírus de desafio.

Os métodos utilizados no presente estudo foram os seguintes:

2.2.1 Caracterização biológica da amostra isolada de equino M82-02

A suspensão cérebros de camundongos a 20% (p/v), infectados com a amostra M82-02, foi inoculada pela via intramuscular no músculo do membro posterior direito, na dose de 0,1mL, realizando sucessivas passagens. Os camundongos foram observados por um período de 30 dias,

à procura de sinais de raiva. Em cada passagem do vírus, foram colhidos o cérebro, pulmão e rins, de alguns camundongos encontrados mortos, para avaliar o viscerotropismo do vírus.

2.2.2 Teste de potência de vacina do CDC de Atlanta

A potência da vacina anti-rábica comercial de vírus inativado, utilizada para a vacinação de eqüinos, foi avaliada em camundongos, adotando-se o teste descrito pelo CDC de Atlanta, EUA (REPORT OF A WHO CONSULTATION ON POTENCY TESTS FOR RABIES VACCINES, 1988). A vacina anti-rábica foi diluída a 1:2, 1:10, 1:50, 1:250, 1:1.250, 1:6.250. Para cada diluição da vacina, grupos de 16 camundongos foram inoculados, por via intramuscular, no membro posterior direito, com 0,1mL. Decorridos 30 dias da vacinação, foi realizado o desafio no músculo masséter, com 0,1mL de suspensão de vírus de amostra de eqüino M82-02, contendo entre 100 – 1.000DLIC₅₀/0,03mL. Os animais inoculados foram observados durante 30 dias, à procura dos sinais de raiva. Alguns animais encontrados mortos, sem manifestação prévia dos sinais de raiva foram submetidos à prova de IFD, para comprovar a morte por raiva.

2.2.3 Prova de inoculação intracerebral em camundongos (ICC)

A prova de ICC foi realizada em camundongos adultos jovens, com inóculos variados, com um volume de 0,03mL. Os inóculos do experimento consistiram-se ora de uma suspensão a 1% ou 20% (p/v) de cérebro de camundongos, ora de diluições seriadas da mistura soro-vírus e os animais foram observados por 30 dias, à procura de sinais de raiva. As observações diárias dos camundongos foram realizadas sempre na parte da manhã, em apenas uma leitura a cada 24 horas. Mortes ocorridas antes do quinto dia pós-inoculação não foram consideradas como sendo de raiva, conforme a metodologia descrita por Koprowski (1996).

2.2.4 Prova de imunofluorescência direta (IFD)

Para a execução da prova, os fragmentos do cérebro, pulmão e rim de camundongos inoculados com o vírus da raiva foram utilizados para a obtenção da impressão por pressão em lâminas de microscopia e fixadas em acetona a -20°C , por duas horas. As lâminas, após secagem à temperatura ambiente, foram colocadas em caixas de madeira, próprias para acondicionamento de lâminas de microscopia, e mantidas a -20°C , para serem processadas em diferentes momentos. O conjugado anti-rábico policlonal foi mantido em contato com a impressão dos tecidos na superfície da lâmina por 30 minutos a 37°C , em seguida foram realizadas três lavagens com solução salina fosfatada (PBS, pH 7,4, 0,1mol/litro), secadas em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando como líquido de montagem, glicerina tamponada, pH = 8,0. Lâminas apresentando inclusões intracitoplasmáticas fluorescentes foram registradas como sendo positivas, de acordo com o método descrito por Goldwasser e Kissling (1958), com ligeira modificação, descrita por Dean; Abelseth e Atanasiu (1996). Para a leitura e interpretação dos resultados, o brilho e a intensidade da fluorescência, quantidade e tamanho dos corpúsculos de inclusão e a presença de poeira antigênica foram considerados, adotando-se uma gradação variando desde: - (ausência de fluorescência = negativo) a uma gradação de +, ++, +++ e ++++ (positivo), esta última gradação com intensidade máxima no brilho e fluorescência, com presença de corpúsculos de inclusão grandes e característicos.

2.2.5 Titulação do Vírus

As amostras do vírus da raiva empregadas neste experimento foram reativadas e tituladas, em diluições seriadas de razão 10, com o diluente, partindo-se de uma suspensão inicial de cérebro de camundongos a 20% (p/v) e cada diluição do vírus foi inoculada intracerebralmente em 10 camundongos, com um volume de 0,03mL, nas diluições que variavam de 10^{-2} a 10^{-7} . Os camundongos inoculados foram observados por 21 dias à procura de sinais de raiva. Todos os camundongos mortos a partir do quinto dia pós-inoculação e manifestando sinais nervosos característicos da raiva nesta espécie foram considerados positivos para raiva. Periodicamente,

impressões obtidas de cérebros de alguns desses animais foram submetidas à prova de IFD, para comprovação do diagnóstico. Informações sobre o número de mortos e sobreviventes foram registradas em fichas e os títulos de vírus foram calculados de acordo com o método descrito por Reed e Muench (1938) e expressos em $\log DLIC_{50}/0,03\text{mL}$ (dose letal 50% por 0,03mL, via IC em camundongos) e indicando o intervalo de confiança, empregando-se a fórmula:

$$SE (DLIC_{50}) = 1,96 \sqrt{0,79hR/n}, \text{ sendo:}$$

h = intervalo comum entre as doses,

R = variação interquartil, $DLIC_{75} - DLIC_{25}$,

n = número de indivíduos submetidos a cada diluição.

Com a adoção de $\alpha = 0,05$ e $Z = 1,96$, a fórmula para o cálculo do intervalo de confiança é: $DLIC_{50} = DLIC_{50} \pm SE (DLIC_{50})$, conforme Pizzi (1950).

2.2.6 Prova de soroneutralização

A prova de soroneutralização em camundongos foi realizada com método de “dose fixa do vírus-diluição variada do soro”, de acordo com Atanasiu (1967). As amostras de soros de eqüinos foram diluídas em série na razão 2 ou 5, com o diluente de vírus, com diferentes esquemas de diluição do soro. Cada diluição de soro foi adicionada a um igual volume de vírus CVS ou amostra de eqüino, previamente diluído e calculado para conter aproximadamente 200 $DLIC_{50}/0,03\text{mL}$ e a mistura soro-vírus foi incubada a 37°C por 90 minutos. Cada diluição da mistura foi inoculada em cinco camundongos com um volume de 0,03mL por via IC. Cada prova foi acompanhada da titulação paralela do vírus de desafio, incluindo o grupo de animais inoculados com o soro padrão positivo aferido em UI/mL. Os animais inoculados foram observados durante 21 dias em busca de sinais de raiva e as mortes ocorridas entre 5-21 dias foram registradas numa ficha para o cálculo dos títulos soroneutralizantes 50% (SN_{50}), conforme o método descrito por Reed e Muench (1938) e os títulos foram expressos em UI/mL, utilizando a fórmula descrita por Louie et al. (1975):

$$\text{UI/mL} \frac{a}{\text{padrão}} \times 150 \text{ UI/mL, sendo}$$

a = Título SN₅₀ do soro em teste;

padrão = Título SN₅₀ do soro positivo padrão aferido em UI/mL

2.2.7 Caracterização antigênica com MABs

Foi realizada no laboratório do Canadian Food and Inspection Service, de Ottawa, Canadá, com o uso de um conjunto de anticorpos monoclonais (MABs) direcionados contra o gene N do vírus da raiva, com base nas amostras brasileiras, desenvolvidas pela equipe da Dra. Susan Nadin-Davis e executada pela Dra. Fernanda Bernardi.

2.2.8 Caracterização genética

Extração de RNA: foi extraído diretamente de uma suspensão de cérebros de camundongos inoculados com o vírus isolado de eqüino na sua primeira passagem, utilizando um reagente comercial (QIAamp Viral RNA Mini Kit., QIA-GEN K.K. Japan), conforme descrito por Ito et al.(2001).

2.2.9 Reação em cadeia pela polimerase-trascriptase reversa - RT-PCR

Após extração do RNA, o material foi submetido à prova de RT-PCR, seguindo a metodologia descrita por ARAI et al.,(1997), com a utilização de um conjunto de primers RHN1/RHNS3.

- Primer RHN1, com seqüência do nucleotídeo 5' - 3': ACAGACAGCTCAATTGCAAAGC, posição 28-50, messenger RNA.

- Primer RHNS3, com seqüência do nucleotídeo 5' - 3': CTAGGATTGACAAGATTTTGCTC, posição 1516-1539, genomic RNA.

2.2.10 Seqüenciamento do vírus

Com o uso do seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, Japan) e com o emprego do "kit" comercial PRISMS Ready Reaction Dyedeoxy Terminator Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, Japan), o produto amplificado de RT-PCR foi seqüenciado pelos parceiros japoneses do National Institute of Infectious Disease, de Tóquio, Japão, através do convênio firmado entre a FMVZ-USP e o College of Bioresource Sciences - CBS da Nihon University, sob a coordenação do Prof. Takeo Sakai e Takuya Itou. Para o seqüenciamento direto, utilizou-se o mesmo conjunto de primers utilizado para a técnica de RT-PCR, descrito por Ito et al. (2001).

2.2.11 Análise filogenética

Com base nos 1.332 nucleotídeos do gene N, correspondendo aos nucleotídeos 89-1420 do vírus isolado de eqüino, o resultado do seqüenciamento foi comparado com os resultados de outras amostras isoladas do Brasil, ou com outras isoladas no continente americano, disponíveis no GenBank database (accession numbers) e o estudo do alinhamento de aminoácidos entre as amostras pertencentes a diferentes genótipos N, relacionado a uma parte do nucleotídeo codificador da proteína N foi realizado com o emprego do programa CLUSTAL X, com a construção da árvore filogenética, segundo THOMPSON et al., (1997). Os agrupamentos foram testados segundo o método de "Bootstrap" com 100 replicações e valor do "Bootstrap" > 70% foi interpretado como evidência de grupamento filogenético (HILLIS; BULL, 1993). Para a ilustração gráfica do dendrograma, foi utilizado o programa TREEVIEW, "free download", disponível na Internet.

2.2.12 Estatística descritiva e analítica

Os dados obtidos no experimento foram compilados e organizados numa planilha eletrônica, utilizando o programa GraphPad Instat.. As análises estatísticas foram realizadas estabelecendo-se um $\alpha = 0,05$.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente experimento estão apresentados em seguida:

A amostra M82-02 de equino, passada sucessivamente em camundongos, por via IC, em suspensão cerebral a 1:5 (p/v) apresentou pequena redução no período de incubação a partir da 5^a passagem, mantendo-se relativamente estável até a 10^a passagem. Os intervalos de confiança obtidos para as primeiras duas passagens foram, respectivamente em $\log DLIC_{50}/0,03mL$, de 2,9572 a 4,1184 $DLIC_{50}$ e 2,4565 a 3,5735 $DLIC_{50}$ que, na 4^a passagem o intervalo foi significativamente diferente, com 4,8095 a 5,5885 $DLIC_{50}$ não mais incluindo os valores compreendidos nos intervalos das passagens anteriores e na 7^a passagem atingiu o título mais elevado, de $10^{5,9403 \pm 0,5499} DLIC_{50}/0,03mL$, conforme a ilustração da Tabela 1. O período de incubação médio considerando todas as passagens foi de $6,09 \pm 1,14$ dias (Anexo 1). Quanto ao período clínico, o teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer indicou a existência de diferença significativa entre a 3^a passagem e as demais passagens ($P < 0,001$) e entre a 4^a passagem *versus* os valores da 8^a e 9^a passagem ($P < 0,05$), conforme Anexo 4.

Tabela1 - Resultados da inoculação intracerebral com suspensão a 1:5 (p/v) da amostra isolada de equino M82-02, até a 10^a passagem e média aritmética do período de incubação, período clínico e desvio padrão - São Paulo - 2003

Número passagem intracerebral em camundongos	$\bar{x}_{PI} \pm DP^{(1)}$ em dias, com suspensão viral a 1:5	$\bar{x}_{PC} \pm DP^{(2)}$ em dias, com suspensão viral a 1:5
1 ^a .	⁽³⁾ nr	⁽³⁾ nr
2 ^a .	7,71 ± 0,7559	3,0 ± 0,0
3 ^a .	7,70 ± 1,1600	5,0 ± 1,225
4 ^a .	6,70 ± 0,4830	3,3 ± 0,5
5 ^a .	5,30 ± 0,6749	2,33 ± 0,5
6 ^a .	5,40 ± 0,5164	2,55 ± 0,52
7 ^a .	5,20 ± 0,4216	3,0 ± 0,0
8 ^a .	6,60 ± 0,5164	2,33 ± 0,5
9 ^a .	5,40 ± 0,5164	2,33 ± 0,5
10 ^a .	5,30 ± 0,4830	2,55 ± 0,52

⁽¹⁾ $\bar{x}_{PI} \pm DP$ = média aritmética do período de incubação ± Desvio Padrão

⁽²⁾ $\bar{x}_{PC} \pm DP$ = média aritmética do período clínico ± Desvio Padrão

⁽³⁾nr = não realizado

Nas primeiras passagens da amostra M82-02, os títulos de vírus encontrados tanto na inoculação por via IC e IM, foram baixos, conforme a Tabela 2. O período de incubação da amostra M82-02, passadas sucessivamente por via IM, com suspensão viral a 1:5, apresentou diferença significativa ($P < 0,001$) nas comparações entre a 8^a passagem e as demais passagens, conforme os Anexos 16 e 19.

Tabela 2 - Resultados da titulação da amostra do vírus da raiva M82-02, isolada de equino, após passagens intracerebral e intramuscular sucessivas em camundongos, período de incubação, período clínico e desvio padrão - São Paulo – 2003

Número de passagem \via	Amostra M82-02, inoculação Intracerebral			Amostra M82-02, inoculação Intramuscular		
	Título vírus ⁽¹⁾ DLIC ₅₀ ± SE(DLIC ₅₀)/0,03 mL	$\bar{x}_{PI} \pm DP^{(2)}$ suspensão viral a 1:100	$\bar{x}_{PC} \pm DP^{(3)}$ suspensão viral a 1:100	Título vírus ⁽¹⁾ DLIC ₅₀ ± SE(DLIC ₅₀)/0,03 mL	$\bar{x}_{PI} \pm DP^{(2)}$ suspensão viral a 1:5	$\bar{x}_{PC} \pm DP^{(3)}$ suspensão viral a 1:5
	nr	nr	nr	nr	nr	nr
1						
2	3,5378 ± 0,5806	7,75 ± 0,9574	5,00 ± 1,1550	2,7893 ± 0,5434	11,10 ± 1,3700	1,80 ± 0,7888
3	3,0159 ± 0,5594	7,60 ± 1,6470	3,50 ± 0,7071	3,0485 ± 0,4980	11,20 ± 2,4860	2,30 ± 0,4830
4	5,1990 ± 0,3895	9,00 ± 2,1080	3,90 ± 1,197	3,4408 ± 0,5853	10,70 ± 0,8233	2,00 ± 0,4714
5	5,7823 ± 0,5939	6,00 ± 0,0000	2,20 ± 0,7888	3,3980 ± 0,6108	11,00 ± 1,1950	2,10 ± 0,5676
6	5,0561 ± 0,6159	6,40 ± 0,5164	2,40 ± 0,5164	3,3980 ± 0,8709	11,37 ± 3,1140	1,70 ± 0,4830
7	5,9403 ± 0,5499	6,70 ± 0,4830	2,90 ± 0,3162	3,6122 ± 0,6863	11,78 ± 2,1670	1,80 ± 0,4216
8	5,3865 ± 0,4805	6,60 ± 0,5164	4,10 ± 0,3162	2,8900 ± 0,5308	16,50 ± 3,6290	2,30 ± 0,4830
9	5,0693 ± 0,6724	6,30 ± 0,4830	2,90 ± 0,5676	3,8264 ± 0,5508	10,20 ± 0,4216	2,00 ± 0,0000
10	5,1365 ± 0,6285	6,20 ± 0,4216	2,60 ± 0,5164	3,5580 ± 0,6239	10,6 ± 1,0750	1,10 ± 0,3162

Nota:

⁽¹⁾Calculado de acordo com REED e MÜENCH (1938), SE(DLIC₅₀) = erro padrão DLIC₅₀

⁽²⁾Média aritmética do período de incubação em dias ± desvio padrão

⁽³⁾Média aritmética do período clínico em dias ± desvio padrão

nr = não realizado

A inoculação da amostra M82-02 por via IC, com suspensão a 1:100, apresentou um aumento no período de incubação na 3^a passagem, conforme a figura do Anexo 31, com diferenças significativas encontradas entre as comparações da 3^a vs 5^a passagem (P<0,05) e entre a 4^a vs 5^a passagem, 4^a vs 6^a passagem, 4^a. vs 7^a passagem, 4^a. vs 8^a passagem, 4^a vs 9^a passagem e 4^a versus 10^a passagem, com P<0,001 (Anexo28).

Quanto ao período clínico, os valores encontrados na 2^a, 4^a e 8^a passagens foram os mais prolongados (Anexo 37), com várias comparações entre as passagens indicando existência de diferenças significativas entre as passagens com P<0,001 (Anexo 34).

Os resultados da avaliação da capacidade invasiva da amostra M82-02 para outros órgãos não nervosos, nos materiais obtidos de animais inoculados por via IM até a 10ª passagem estão sumarizados no quadro 2.

Número de passagem IM em camundongos	Imunofluorescência direta		
	cérebro	pulmão	Rim
⁽¹⁾ 1	⁽³⁾ +	⁽⁷⁾ nr	nr
2	++	⁽²⁾ -	-
3	++	+	-
4	⁽⁴⁾ ++	+	-
5	++	-	+
6	⁽⁵⁾ +++	+	-
7	⁽⁶⁾ ++++	++	++
8	+++	+	+
9	++++	++	++
10	+++	+	+

Quadro 2 - Resultados da análise do viscerotropismo da amostra M82-02 do vírus da raiva isolada de eqüino, após inoculação por via intramuscular no membro posterior dos camundongos - São Paulo – 2003

Nota:

⁽¹⁾Conforme registro do diagnóstico efetuado em 2002

⁽²⁾- = ausência da fluorescência

⁽³⁾+ = poucos corpúsculos pequenos no campo microscópico

⁽⁴⁾++ = muitos corpúsculos pequenos e alguns grandes, com brilho e intensidade característica.

⁽⁵⁾+++ = muitos corpúsculos pequenos, médios e grandes, com fluorescência típica.

⁽⁶⁾++++ = numerosos corpúsculos pequenos, médios e grandes, com aumento a poeira antigênica, fluorescência característica.

⁽⁷⁾nr = não realizado

Os corpúsculos de inclusão foram observados com fluorescência característica no material original de equino, assim como nos materiais do cérebro, de baixa passagem em camundongos. Com o aumento no número de passagens por via IC, observou-se um aumento no número de corpúsculos de inclusão, aumento no seu tamanho e presença de numerosas partículas pequenas, alguns sugerindo aspecto de poeira antigênica, ocupando todo o tecido cerebral. Nos fragmentos do cérebro, no entanto, observou-se uma diminuição na intensidade de fluorescência dos corpúsculos, apresentando-se com menos brilho, especialmente nas últimas passagens.

O título da amostra do vírus da raiva M82-02, após dez passagens sucessivas em camundongos, pela via intracerebral, alcançou $10^{5,1365 \pm 0,6285}$ DLIC₅₀/0,03mL. O resultado da soroneutralização em camundongos, com a utilização desta amostra viral como antígeno, para avaliar os soros de equinos vacinados, realizada em paralelo com o vírus fixo CVS, com título viral de $10^{6,4133 \pm 1,3909}$ DLIC₅₀/0,03mL, com uso de soro padrão positivo contendo 150UI/mL de anticorpo anti-rábico estão sumarizados na Tabela 3. Diferentes esquemas de diluição dos soros foram tentados, uma vez que na avaliação preliminar dos 10 soros selecionados não foram encontrados animais sobreviventes na diluição final da mistura soro-vírus a 1:5 ou $10^{-0,699}$, após os 21 dias de observação. Os resultados da soroneutralização dos soros de equinos ilustrados na Tabela 3 foram obtidos com as diluições das misturas soro-vírus correspondendo a $10^{-3,3010}$, $10^{-4,3010}$, $10^{-5,3010}$ e $10^{-6,3010}$.

Tabela 3 - Resultados da prova de soroneutralização de soros de equinos vacinados com vacina anti-rábica comercial de vírus inativado, tendo como antígeno a amostra M82-02 e o vírus fixo CVS - São Paulo - 2003

Número Soro equino	Título logSN ₅₀ ⁽¹⁾ com antígeno CVS ⁽³⁾	Título SN ₅₀ /UI/mL ⁽²⁾ com antígeno CVS	Título logSN ₅₀ ⁽¹⁾ com antígeno M82-02 ⁽⁴⁾	Título logSN ₅₀ /UI/mL ⁽²⁾ com antígeno M82-02
1	3,8010	1,9732	<3,3010	<4,4034
2	<3,3010	<0,6240	<3,3010	<4,4034
3	<3,3010	<0,6240	<3,3010	<4,4034
4	<3,3010	<0,6240	<3,3010	<4,4034
5	<3,3010	<0,6240	<3,3010	<4,4034
6	<3,3010	<0,6240	<3,3010	<4,4034
7	4,1405	4,3121	<3,3010	<4,4034
8	3,4677	0,9159	<3,3010	<4,4034
9	4,0510	3,5090	<3,3010	<4,4034
10	<3,3010	<0,6240	<3,3010	<4,4034
Soro padrão positivo	5,6819	150	4,8333	150

Nota:

⁽¹⁾Calculado conforme Reed e Muench (1938), expresso em logSN₅₀

⁽²⁾SN₅₀ expresso em UI/mL, cálculo de acordo com Louie et al.(1975)

⁽³⁾Dose de vírus CVS acrescentado no sistema soro-vírus: 1.295DLIC₅₀/0,03ml

⁽⁴⁾Dose de vírus M82-02 acrescentado no sistema soro-vírus:6.845DLIC₅₀/0,03mL

Os resultados do teste de potência do CDC de Atlanta, utilizando a amostra M82-02 como vírus de desafio, em comparação com a amostra CVS, estão ilustrados no quadro 4.

Vacina\Amostra	Vírus de desafio CVS		Vírus de desafio M82-02	
	logDP ₅₀	Dose de vírus DLIC ₅₀ /0,1mL	LogDP ₅₀	Dose de vírus DLIC ₅₀ /0,1mL
Vacina anti-rábica comercial de vírus inativado	3,0294	1.291	2,1799	4.107

Quadro 3 - Resultados do teste de potência do CDC de Atlanta, expressos em logaritmo de dose protetora (logDP50), desafio com vírus da raiva amostra CVS e amostra de equino M082-02 e doses utilizadas no desafio por via intramuscular - São Paulo – 2003

Na Tabela 4 estão condensados os resultados da caracterização biológica, sorológica, genética e da prova de potência da vacina do CDC de Atlanta realizado com a amostra de vírus da raiva, o isolado equino M82-02.

Tabela 4 - Resumo dos resultados do comportamento biológico, sorológico e teste de potência de vacina do CDC de Atlanta realizada com a amostra do vírus da raiva CVS e M82-02, isolada de equino São Paulo – 2003

Amostra	Teste de potência do CDC logDP ₅₀	Dose desafio DLIC ₅₀ /0,1mL	Potência Relativa	Viscerotropismo (¹)	Período médio incubação via IC suspensão a 1:100	Caracterização genética
M82-02	2,1799	4.107	(²)0,1414	(⁴)+	(⁵)6,09±1,15	Lyssavirus genotipo I VRRV
CVS	3,0294	1.291	(³)1,0000	+	(⁶)5,4	(⁷)Lyssavírus genotipo I DRRV

(¹)Viscerotropismo detectado em todos os órgãos examinados, de 7^a a 10^a passagem IM

(²)DP₅₀ amostra M82-02 ÷ DP₅₀ amostra CVS

(³)DP₅₀ amostra CVS ÷ DP₅₀ amostra CVS

(⁴) = IFD positivo, presença de corpúsculos de inclusão fluorescentes

(⁵)Média aritmética considerando todas as passagens ± Desvio Padrão

(⁶)Avaliado durante a titulação do vírus CVS

(⁷)Informação obtida do GenBank

VRRV = "Vampire bat-related rabies virus"

DRRV = "Dog-related rabies virus"

O resultado da análise do antígeno viral com o uso de MABs, obtido no Canadian Food and Inspection Service de Ottawa, Canadá, indicou que a amostra de equino M82-02 é compatível com o perfil correspondente ao de morcego hematófago *D. rotundus*. Por sua vez, a análise da seqüência de nucleotídeos revelou ser mais próxima das amostras brasileiras isoladas de morcegos hematófagos e de outros herbívoros do Brasil, ou seja, uma variante VRRV, relacionada ao vírus de morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Anexos 38 e 39).

4 DISCUSSÃO

O título de um vírus da raiva obtido do material cerebral, no seu primo isolamento, usualmente é baixo, independentemente da espécie animal, porém, na glândula salivar, o vírus pode ser encontrado numa concentração mais elevada que no SNC (DIERKS, 1975). As amostras de vírus dos genótipos V e VI são descritos na literatura como sendo pouco patogênico para os camundongos inoculados pela via IM (CHARLTON, 1994). As passagens sucessivas da amostra M82-02 em camundongos, por via IM, não causaram aumento substancial no título de vírus. Por outro lado, as passagens sucessivas do vírus por via intracerebral possibilitaram uma ligeira elevação quando o vírus foi titulado pela via intracerebral, conforme ilustrado na tabela 2.

O uso da amostra M82-02, como antígeno da prova de soroneutralização para avaliar os níveis de anticorpos anti-rábicos nos eqüinos mantidos num haras, próximo de São Paulo, acusou diferenças numéricas nos valores encontrados, quando comparado com o antígeno CVS. Foram constatados títulos neutralizantes de até 4,1405 SN₅₀ tendo como antígeno a amostra CVS, e o mesmo soro apresentou título <3,3010 SN₅₀, com o antígeno M82-02. Porém, como as diluições do soro utilizadas neste experimento foram limitadas, não foi possível avaliar em quantas vezes a capacidade neutralizante foi reduzida com a substituição do antígeno fixo por um outro de eqüino procedente do campo. O soro anti-rábico padrão positivo aferido em UI/mL, com o antígeno CVS acusou logSN₅₀ de 5,6819 e, 4,833 com a amostra M82-02, um valor 15% inferior que a avaliação com o vírus fixo CVS.

Em termos de dose de vírus efetivamente acrescentado no sistema, a dose da amostra CVS correspondeu a 1.295DLIC₅₀/0,03mL (em log correspondendo a 10^{3,1122}DLIC₅₀) e da amostra 82-02, 6.845DLIC₅₀/0,03mL (10^{3,8353}DLIC₅₀), isto é, 5,2 vezes menos que a amostra de eqüino (ou uma diferença de apenas 0,7231 em log), conseguindo revelar quatro soros (40%) com diferentes níveis de anticorpos (Tabela 2). A dose de vírus recomendada para ser acrescentada no sistema varia de 50 a 500DLIC₅₀/0,03mL ou, expresso em logaritmo, de 10^{1,6989} a 10^{2,6989}DLIC₅₀, uma variação de 1 log (FITZGERALD, 1996). No entanto, a não inclusão de diluições mais baixas na prova de soroneutralização não permitiu a avaliação adequada do título SN₅₀, porém, mesmo nesta condição do teste, alguns soros de eqüinos apresentavam-se com

títulos de anticorpos anti-rábicos em níveis detectáveis, tendo como antígeno a amostra CVS, com títulos em UI/mL próximos de 0,5UI/mL, embora a interpretação deste limiar como indicativo de uma resposta favorável à vacinação, conforme a recomendação dos especialistas da OMS seja indicada apenas para os seres humanos. Não existe, até o presente, um semelhante ponto de corte em UI/mL para indicar a presença da imunidade, em equinos vacinados. Smith et al. (2000) afirmaram que o uso de um sistema homólogo de vacina-vírus de desafio para a avaliação de rotina dos soros de indivíduos vacinados é desnecessário. Num sistema de dose-resposta, o excesso de vírus de desafio acrescentado na mistura soro-vírus interfere no resultado final do cálculo do título soroneutralizante, subestimando o seu valor. Adotando uma postura mais conservadora, poderia admitir esta interpretação para explicar os resultados obtidos com a amostra M82-02, no presente experimento. Como a diferença na dose de vírus empregada foi de apenas 0,7231DLIC₅₀, poderia admitir, por outro lado, que a discrepância nos resultados foi de fato decorrente ao uso de uma amostra de campo como antígeno da reação. No entanto, para Smith et al.(2000), a discrepância é pequena e não é necessário utilizar amostras homólogas de vírus nas provas de soroneutralização.

O vírus Mokola é citado na literatura pela sua elevada capacidade em invadir tecidos de órgãos não nervosos (BLANCOU, 1988), esta característica é também verificada com as amostras de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies de animais domésticos e silvestres do país. Neste aspecto, Silva e Souza (1968) relataram a presença do vírus da raiva nas amostras do coração, rim testículo e Nilsson e Nagata (1975), em glandula salivar e gordura marrom e outros tecidos de morcegos hematófagos, assim como no coração, rins e testículos de bovinos (SILVA; SOUZA; LIMA, 1967). Nos animais de laboratório, o vírus da raiva infecta os roedores de laboratório, como os hamsters, camundongos e outros roedores (BOTVINKIN; NIKIFOROVA; SIDOROV, 1985) e a presença do antígeno viral é facilmente evidenciada com a prova de IFD, ou do vírus, por meio de ICC em camundongos. Neste experimento, os antígenos da raiva, na forma de corpúsculos de inclusão, foram prontamente detectados pela prova de IFD, nos fragmentos do cérebro, pulmão e rins, com diferentes intensidades da fluorescência, embora o critério utilizado neste experimento fosse inteiramente subjetivo. Em morcegos experimentalmente inoculados com o vírus da raiva, por via oral, os materiais do pulmão e dos rins foram encontrados com maior positividade na prova de IFD e pela RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase - transcriptase reversa), provavelmente estes resultados estão relacionados

com o "clearance" ou eliminação do vírus (SOUZA, 2003). Neste experimento, os resultados positivos na prova de IFD passaram a ser mais consistentes, a partir da 8ª passagem, provavelmente em função da maior adaptação do vírus ao sistema camundongo e também pelo aumento na carga viral.

O uso de uma amostra de campo como vírus de desafio, no teste de potência da vacina do CDC de Atlanta, foi indicado por Baer (1997) e Blancou (1985) como ponto favorável, uma vez que nos métodos existentes como os de Habel, NIH e de Koprowski, o desafio é realizado com a amostra fixa CVS. Neste experimento, porém, foram notados alguns inconvenientes a serem superados, para melhor desempenho deste teste.

O vírus recém-isolado de campo apresenta título viral comparativamente muito mais baixo que o vírus fixo CVS, mesmo após sucessivas passagens por via intracerebral em camundongos. Após dez passagens, a amostra M82-02 apresentou um título de $10^{3,5580 \pm 0,6239}$ DLIC₅₀/0,03mL ou em intervalo, um título mínimo de $10^{2,9341}$ e máximo de $10^{4,1819}$ DLIC₅₀ que, inoculada por via intramuscular, apresentou baixa infectividade em camundongos. Esta baixa infectividade por via intramuscular pode ser em consequência de poucas partículas virais no inóculo (variação no título de 859 a 15.201 DLIC₅₀/0,03mL) ou partículas virais defectivas ou não infecciosas presentes numa amostra de isolamento recente e de baixa passagem no sistema biológico. Em cultivos celulares, além do vírus infectante, são produzidos materiais não infecciosos, conhecidos por "virion-free" ou antígeno solúvel denominado de "VFRA" (Virion-free rabies antigen) e estes são capazes de reagir imunologicamente com soro imune vírion-específico (WIKTOR; CLARK, 1975).

Por outro lado, o uso do vírus fixo CVS, inoculado por via intramuscular, também é um fator crítico, em consequência da baixa infectividade, além dos camundongos estarem muito crescidos e mais resistentes ao desenvolvimento da infecção, no momento do desafio, 30 dias após a vacinação. Para Lodmell, Wiedbrauck e Ewalt (1990), a maior resistência dos camundongos está relacionada com a produção de interferon, após inoculação do vírus da raiva.

Bordignon et al. (2003) analisaram as seqüências da região não codificadora G-L de 12 amostras de vírus da raiva, sendo três amostras de laboratório: CVS-31/2; PV e SAD. Em seu

estudo, exceto para as amostras PV e SAD, que apresentam o sinal de PolyA após o gene N, em outras amostras faltavam este sinal, sugerindo possuir uma longa região não codificadora 3' e, em outras amostras, foi encontrado um possível novo sinal no terminal 3' do gene L. A ausência deste sinal sugere uma transcrição bicistrônica entre os genes G e L, ou mesmo a presença de um novo sinal entre os genes G e L, ainda não descrito, poderia modificar as alterações fenotípicas destas amostras, embora as propriedades biológicas decorrentes destas alterações ainda sejam desconhecidas.

Os resultados obtidos neste experimento não foram conclusivos em relação à existência de variantes com distinta capacidade imunogênica, conforme a suposição apresentada por Wiktor e Koprowski (1982) e questionada pelos veterinários de campo que atuam nas regiões de maior ocorrência da raiva em herbívoros, a ponto de provocar uma resposta imune inadequada, quando da utilização de uma vacina anti-rábica comercial para a prevenção da raiva.

A amostra M82-02 apresentou perfil antigênico compatível com a de morcego hematófago, o que vem a corroborar os relatos de Favoreto et al. (2002), que encontraram amostras do vírus da raiva isoladas de herbívoros, com o perfil correspondendo ao de morcego hematófago *D. rotundus*.

A caracterização genética da amostra M82-02 revelou tratar-se de uma amostra de vírus da raiva pertencente ao genótipo 1, do grupo relacionado à variante VRRV. Os resultados da análise filogenética, ilustrado no dendrograma (Anexo 38 e 39), apresenta a amostra M82-02 localizada entre a amostra BRbv30, uma amostra isolada de um bovino e a amostra BRhr31, outra amostra de equino, ambas localizadas dentro das ramificações que incluem as amostras de vírus isoladas de morcegos hematófagos *D. rotundus* (BRvmbt). Este resultado indica que a amostra M82-02 foi obtida de um equino que tinha sido, muito provavelmente, vítima do ataque de morcegos hematófagos *D. rotundus*. No mesmo dendrograma está incluída a localização da amostra PV-VPS (amostra PV mantida no laboratório do Departamento VPS, FMVZ-USP), junto a uma outra amostra PV (M13215), disponível no GenBank, com 100% de homologia e que estas amostras fixas pertencem de fato ao genótipo 1, grupo da variante de quiróptero (VRRV).

Por outro lado, a vacina comercial utilizada neste experimento foi fabricada com o vírus PV, inativado. Os resultados do teste de potência da vacina obtidos neste experimento foram, até certo ponto, semelhantes aos obtidos por Bernardi (2002), quando uma vacina comercial de vírus PV inativado por beta propiolactona apresentou desempenho inferior no teste de potência do CDC de Atlanta, com vírus de desafio de morcego hematófago *D. rotundus* e, de equino, no teste de NIH. O desempenho inferior da vacina comercial, observado na prova de potência do CDC de Atlanta, quando o desafio foi realizado com a amostra M82-02, poderia estar indicando que a suspeita dos veterinários de campo teria um fundo de verdade em relação à raiva dos equinos na região próxima de São Paulo. Novos estudos, no entanto, serão necessários, pois, o teste de potência do CDC de Atlanta ainda apresenta uma elevada variabilidade nos resultados e precisa de novas modificações, antes de ser utilizado na rotina (MESLIN; KAPLAN, 1996).

As alterações ecológicas do meio ambiente têm sido citadas frequentemente para explicar os problemas relacionados com o aumento dos casos de raiva em morcegos hematófagos (BÜRER, 2000) ou não hematófagos (KOTAIT et al., 2000), no entanto, estes fatos também devem ainda ser comprovados cientificamente, por meio de estudos ambientais bem controlados.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que:

A amostra M82-02, isolada de equino, revelou ser patogênica e fatal para os camundongos por meio da inoculação intracerebral e intramuscular, provocando a morte após um certo período de incubação e período clínico, com sinais característicos da raiva e com comportamento biológico semelhante ao de outras amostras do vírus da raiva;

Antigenicamente, a amostra M82-02, apresentou o perfil de MABs compatível com o de morcego hematófago *Desmodus rotundus*;

A amostra M82-02 foi caracterizada geneticamente, com base nos 203bp de nucleotídeos do gene N, revelando uma filogenia muito próxima com a dos morcegos hematófagos *D. rotundus* e de outros herbívoros, isolados no Brasil. O uso da bioinformática permitiu a comparação dos dados desta amostra M82-02 com os do PV, comprovando que os mesmos pertencem, respectivamente, aos grupos VRRV e DRRV.

As passagens sucessivas da amostra M82-02 do vírus da raiva em camundongos por via intracerebral apresentou um ligeiro aumento no título viral, tornando-se mais estável por volta da 10^a passagem. A inoculação por via intramuscular provocou a morte dos camundongos, comprovando que a amostra pertence ao genótipo I do vírus da raiva.

As passagens sucessivas da amostra M82-02, em camundongos, por via intramuscular, aumentaram o número de indivíduos mortos por total de animais inoculados, com os corpúsculos de inclusão distribuídos nos tecidos do cérebro, pulmão e rins, comprovando o seu viscerotropismo.

O uso da amostra M82-02, recém-isolada de campo, como antígeno da prova de soroneutralização apresentou problemas em decorrência do baixo título viral, e os resultados podem ser subestimados, quando comparados com os resultados da amostra CVS.

No teste de avaliação de potência da vacina do CDC de Atlanta, os camundongos inoculados com a vacina de vírus PV inativado apresentou menor desempenho frente ao desafio com a amostra isolada de equino M82-02, em comparação ao desafio com a amostra CVS. No entanto, a interpretação deste resultado deve ser criteriosa.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- ACHA, P. N. Epidemiology of paralytic bovine rabies and bat rabies. **Boletín de la Oficina Internacional de Epizootias**, v. 67, n. 3-4, p. 343-382, 1967.
- ARAI, Y. T.; KAMEOKA, Y.; HORIMOTO, T.; YAMAMOTO, K.; YABE, S.; NAKAYAMA, M.; TASHIRO, M. Nucleo protein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. **Archives of Virology**, v.142, p.1787-1796, 1997.
- ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A. D. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 333-337, 2003.
- ATANASIU, P. Animal inoculation and the Negri body. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 374-396.
- ATANASIU, P. Titragem dos anticorpos rabícos praticada sobre os sêrums humanos. **Boletín de la Oficina Internacional de Epizootias**, v. 67, p. 383-387, 1967.
- BAER, G. M. Evaluation of an animal rabies vaccine by use of two types of potency tests. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 8, p. 837-840, 1997.
- BERNARDI, F. **Estudos biológicos e imunológicos de cinco amostras de vírus rábico brasileiras**. 2002. 64 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- BINGHAM, J.; VAN DER MERVE, M. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. **Journal of Virological Methods**, v. 101, n. 1-2, p.85-94, 2002.
- BLANCOU, L. Las vacunas y la vacunación antirrábica de los animales domésticos y selvajes em Europa. * **Ver. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 4, n. 2, p. 261-272, 1985.
- BOTVINKIN, A. D.; NIKIFOROVA, T. A.; SIDOROV, G. N. Experimental rabies in hibernator rodents. **Acta Virol.**, v. 29, p.44-50, 1985.
- BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Taxonomy and evolutionary studies on Lyssavirus with special reference to Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 277-282, 1993.
- BUNN, T. O. Vaccines and vaccination of domestic animals. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. Ed. **Rabies**. Boston: Kluwer Academic, 1988. p. 323-333.

¹Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4 ed. revista, atualizada e ampliada. Disponível em <http://www.fmvz.usp.br> acesso em: set. 2003

BÜRER, S. P. Controle de morcegos hematófagos. In: Seminário Internacional da Raiva, v. 1, 2000, São Paulo. **Programas e Resumos**. São Paulo, De Paula Print Artes Gráficas Ltda., 2000. p. 47.

CARINI, A. Sur une grande épizootie de rage. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v. 25, p. 843-846, 1911.

CARNEIRO, V. As epizootias de raiva na América e o papel dos morcegos hematófagos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 7, p. 273-321, 1936.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Buenos Aires. **Nota técnica**, n. 8, ver.2, 1975.

CHARLTON, K. M. The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. In: RUPPRECHT, C. E.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Lyssaviruses. **Current Topical Microbiology and Immunology**, v. 187, p. 95-119, 1994.

COSTY, F. La vaccination antirabique de l'homme. **Annales de Médecine Veterinaire**, v. 129, p. 353-359, 1985.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-95.

DIERKS, R. E. Electron microscopy of extraneural rabies infection. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 307.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; CUNHA, E. M.; AGUIAR, E. A.; SILVA, L. H.; SODRE, M. M.; SOUZA, M. C.; KOTAIT, I. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91-95, 2002.

FITZGERALD, E. A. Potency test for antirabies serum and immunoglobulin. In: World Health Organization. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneve, 1996. p. 417-422.

FLAMAND A.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. II. The nucleocapsid protein. **Journal of General Virology**, v. 48, n. 1, p. 105-109, 1980.

FRANCO NETTO, G.; CARNEIRO, F.F. Vigilância ambiental em saúde no Brasil. In: **Ciência & Ambiente**, 25^a. ed., Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Editora Pallotti, 2002, volume 1, p. 47-58.

GALAGHER, K. **Up date - rabies in horses**. Michigan State University College of Veterinary Medicine Extension. Disponível em <<http://cvm.msu.edu/news/press/030698.htm>> Acesso em: 10 set. 2003.

GOLDWASSER, R. A.; KISSLING, R. E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. **Proceedings of the Society Experimental Biology Medicine**, v. 98, p. 219-223, 1958.

GRAPHAPAD INSTAT, GraphPad Software, **Instat guide to choosing and interpreting statistical tests**, 1998, GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, www.graphpad.com

HILLIS, D. M.; BULL, J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, v. 42, p. 182-192, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. População animal brasileira. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatística/economia/ppm/tabela1ppm_2001.shtm Acesso em: 12 set. 2003.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; ARAI, Y. T.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, p. 317-330, 2003.

ITO, M., ITOU, T.; SAKAI, T.; SANTOS, M. F. C.; ARAI, Y. T.; TAKASAKI, T.; KURANE, I.; ITO, F. H. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 63, n. 12, p. 1309-1313, 2001.

KENTUCKY COOPERATIVE EXTENSION SERVICE. **University of Kentucky, College of Agriculture**. Disponível em <http://www.uky.edu/Agriculture/AnimalSciences/extension/pubpdfs/asc125.pdf> Acesso em: 15 set. 2003.

KING, A. A.; CRICK, J. Rabies related viruses. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. ED. **Rabies**. Boston: Kluwer Academic, 1988, p. 163-176.

KISSI, B.; TORDO, N.; BOURHY, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. **Virology**, v. 209, n. 2, p. 526-527, 1995.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 80-87.

KOTAIT, I. Controle da raiva dos herbívoros- vacinação. **Past In Pasteur Informa**, n. 6, p. 3, 2001.

KOTAIT, I.; HARMANI, N. M. S.; FAVORETTO, S. L.; CARRIERI, M. L. SODRÉ, M. M.; PANACHÃO, M. R. I.; TAKAOKA, N. Y. Manejo de quirópteros em focos de raiva em áreas urbanas. In: Seminário Internacional da Raiva, v. 1, 2000, São Paulo. **Programas e Resumos**. São Paulo, De Paula Print Artes Gráficas Ltda., 2000. p. 63.

LODMELL, D. L.; WIEDBRAUCK, D. L.; EWALT, L. C. Interferon induced within the central nervous system during infection is in consequential as a mechanism responsible for murine resistance to street rabies virus. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 473-478, 1990.

LOUIE, R. E.; DOBKIN, M. B.; MEYER, P.; CHIN, B.; ROBY, R. E.; HAMMAR, A. H.; CABASSO, V. F. Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test (MNT) with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). **Journal of Biological Standardization**, v. 3, n. 4, p. 365-373, 1975.

MATSUMOTO, S. Electron microscopy of central nervous system infection. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**, v.1, 1975, Academic Press, New York, p.384.

MESLIN, F.X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN, F.X, KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 9-27.

NILSSON, M. R.; NAGATA, C. A. Isolamento do vírus rábico do cérebro, glândulas salivares e interescapular, coração, pulmões e testículas de morcego *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1910), no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 42, n. 23, p. 183-188, 1975.

OFFICE INTERNATIONAL DE EPIZZOTIES - OIE. **Disease information**, v.16, n.25, 2003. Disponível em <http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_14HTM#SecD!> Acesso em: 10 set. 2003.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, **Comité de Expertos de la OMS sobre rabia: Octavo informe**, Ginebra, (Serie de Informes Técnicos; 824), OMS, 1992. 88p.

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Los anticuerpos monoclonales em la caracterización y vigilância de la rabia em América Latina y el Caribe. **Pan American Journal of Public Health**, v. 8, n. 3, 2000.

PAWAN, J. L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 30, p. 101-130, 1936.

PIZZI, M. Sampling variation of the fifty per cent end-points, determined by the Reed-Müench (Behrens) method. **Human Biology**, v. 22, n. 3, p. 151-190, 1950.

QUEIROZ LIMA, E. A transmissão da raiva bovina pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*. **Brasil Medicina**, v 48, p. 38-40, 1934.

REED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints **American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

Report of a WHO consultation on potency tests for rabies vaccines, Geneva, 7-8 December 1987, **World Health Organization**, 1988 (unpublished document VPH/86.63; available on request

from the Division of Communicable Diseases, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).

SILVA, R. A.; SILVA, N. M.; MENEZES, P. R. V. Ocorrência do vírus da raiva na medula e no bulbo de eqüinos na doença natural e sua ausência nas diferentes regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Série Veterinária, v. 8, p. 89-90, 1974.

SILVA, R. A.; SOUZA, A. M. Isolamento do vírus rábico de pulmão, coração, rins, Bexiga e outros diferentes tecidos de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 291-301, 1968.

SILVA, R. A.; SOUZA; A. M.; LIMA, A. C. Isolamento de vírus rábico do rim, coração e cérebro de bovino na doença natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 359-366, 1967.

SIZARET, P. General consideration in testing the safety and potency of rabies vaccines. In: World Health Organization. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneve, 1996. p.355-359.

SMITH, J.; ORCIARI, L.; YAGER, P.; BRIGGS, D.; MESSENGER, S. **Amino acid differences between vaccine and challenge virus as a cause of discrepant results in rabies virus neutralization tests**. Seminário Internacional da Raiva, 2000. Disponível em http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/anais/seminario_internacional/resumo_6_5.htm > Acesso em: 10 set. 2003.

SMITH, J. S.; REID-SANDEN, F. L.; TRIMARCHI, C.; CLARK, K.; BAER, G. M.; WINKLER, W. G. Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 573-580, 1986.

SOUZA, M. C. A. M. **Infecção experimental de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy) mantidos em cativeiro pela ingestão de sangue defibrinado acrescentado de amostras de vírus da raiva**. 2003. 90 f. Tese (Doutorado Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

STEELE, J. H. History of rabies. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. p. 1-28.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, K. J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. Clustal X widows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acid Research**, v. 2, p. 4876-4882, 1997.

TORDO, N; SACRAMENTO, D.; BADRANE, H.; BAHLOU, C.; AGUILAR-SETIEN, A.; LOZA-RUBIO, E.; GAVILAN-SALINAS, A.; BROCHIER, B.; PASTORET, P. P.; DESMEZIERES, E.; JACOB, Y.; PERRIN, P. Genetic diversity of lyssaviruses: implications in vaccinology. In: Seminário Internacional da Raiva, v. 1, 2000, São Paulo. **Programas e Resumos**. São Paulo, De Paula Print Artes Gráficas Ltda., 2000. p. 26-27.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: World Health Organization. **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneve, 1996. p. 28-51.

TORRES, S.; QUEIROZ LIMA, E. A raiva nos morcegos hematofagos (*Desmodus rotundus murinus*). **Revista do Departamento Nacional de Produção Animal**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4-5-6, p. 385-406, 1935.

OMS.OPS. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Vigilancia epidemiológica de la rabia em las Americas 2001. **Boletín de vigilancia epidemiológica de la rabia em las Américas**, v. 33, n. 1, p. 38, 2001.

VURAL, S. A. ALCIGIR, G.; BERKIN, S. Immunohistochemical and histopathological studies of fixed rabies virus in goats. **Onderspoort Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 83-89, 2001.

WIKTOR, T. J.; CLARK, H. F. Growth of rabies virus in cell culture. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 167.

WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Does the existence of rabies antigenis variants warrant re-evaluation of rabies vaccines? In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE O IMPACTOS DAS DOENÇAS VIRAIS NO DESENVOLVIMENTO DOS PAÍSES LATINO-AMERICANOS E DA REGIÃO DO CARIBE, 1, 1982, Rio de Janeiro, **Anais**, Rio de Janeiro, 1982, p. 94-112

WILBUR, L. A.; AUBERT, M. F. A. The NIH test for potency. In: World Health Organization. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneve, 1996. p. 360-368.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO workshop on genetic and antigenic molecular epidemiology of Lyssaviruses**. Geneva World Health Organization Veterinary Public Health Unit,. 1994. p.7.

Amostra M82-02, Período de incubação médio, todas as passagens

Col. title

Mean 6.091954023
Standard deviation (SD) 1.148
Sample size (N) 87

Std. error of mean (SEM) 0.1230
Lower 95% conf. limit 5.847
Upper 95% conf. limit 6.337

Minimum 5.000
Median (50th percentile) 6.000
Maximum 9.000

Normality test KS 0.2316
Normality test P value 0,0002
Passed normality test? No

Amostra M82-02, suspensão a 1:5, IC, PC em dias.

#	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
1	3	4	3	3
2	3	4	3	3
3	3	4	3	3
4	3	4	3	2
5	3	4	3	2
6	3	6	3	2
7	3	6	4	2
8	3	6	4	2
9	3	7	4	2

#	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
1	2	3	2	2
2	2	3	3	2
3	2	3	3	2
4	2	3	3	2
5	3	3	2	2
6	3	3	2	2
7	3	3	2	3
8	3	3	2	3
9	3	3	2	3

#	10a. passagem
1	3
2	3
3	3
4	3
5	3
6	2
7	2
8	2
9	2

Amostra M82-02, suspensão a 1:5, IC, PC em dias.

Col. title	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
Mean	3	5	3.3333333333	2.3333333333
Standard deviation (SD)	0.000	1.225	0.5000	0.5000
Sample size (N)	9	9	9	9
Std. error of mean(SEM)	0.000	0.4082	0.1667	0.1667
Lower 95% conf. limit	3.000	4.059	2.949	1.949
Upper 95% conf. limit	3.000	5.941	3.718	2.718
Minimum	3.000	4.000	3.000	2.000
Median (50th percentile)	3.000	4.000	3.000	2.000
Maximum	3.000	7.000	4.000	3.000
Normality test KS		0.3484	0.4142	0.4142
Normality test P value		>0.10	0,0912	0,0912
Passed normality test?		Yes	Yes	Yes

Col. title	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
Mean	2.5555555556	3	2.3333333333	2.3333333333
Standard deviation (SD)	0.5270	0.000	0.5000	0.5000
Sample size (N)	9	9	9	9
Std. error of mean(SEM)	0.1757	0.000	0.1667	0.1667
Lower 95% conf. limit	2.150	3.000	1.949	1.949
Upper 95% conf. limit	2.961	3.000	2.718	2.718
Minimum	2.000	3.000	2.000	2.000
Median (50th percentile)	3.000	3.000	2.000	2.000
Maximum	3.000	3.000	3.000	3.000
Normality test KS	0.3560		0.4142	0.4142
Normality test P value	>0.10		0,0912	0,0912
Passed normality test?	Yes		Yes	Yes

Col. title	10a. passagem
Mean	2.5555555556
Standard deviation (SD)	0.5270
Sample size (N)	9
Std. error of mean(SEM)	0.1757
Lower 95% conf. limit	2.150
Upper 95% conf. limit	2.961
Minimum	2.000
Median (50th percentile)	3.000
Maximum	3.000
Normality test KS	0.3560
Normality test P value	>0.10
Passed normality test?	Yes

23/09/03 12:40

Amostra M82-02, suspensão a 1:5, IC, PC em dias.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.534 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
2a. passagem vs 3a. passagem	-2.000	10.297	*** P<0.001
2a. passagem vs 4a. passagem	-0.3333	1.716	ns P>0.05
2a. passagem vs 5a. passagem	0.6667	3.432	ns P>0.05
2a. passagem vs 6a. passagem	0.4444	2.288	ns P>0.05
2a. passagem vs 7a. passagem	0.000	0.000	ns P>0.05
2a. passagem vs 8a. passagem	0.6667	3.432	ns P>0.05
2a. passagem vs 9a. passagem	0.6667	3.432	ns P>0.05
2a. passagem vs 10a. passagem	0.4444	2.288	ns P>0.05
3a. passagem vs 4a. passagem	1.667	8.581	*** P<0.001
3a. passagem vs 5a. passagem	2.667	13.730	*** P<0.001
3a. passagem vs 6a. passagem	2.444	12.586	*** P<0.001
3a. passagem vs 7a. passagem	2.000	10.297	*** P<0.001
3a. passagem vs 8a. passagem	2.667	13.730	*** P<0.001
3a. passagem vs 9a. passagem	2.667	13.730	*** P<0.001
3a. passagem vs 10a. passagem	2.444	12.586	*** P<0.001
4a. passagem vs 5a. passagem	1.000	5.149	* P<0.05
4a. passagem vs 6a. passagem	0.7778	4.005	ns P>0.05
4a. passagem vs 7a. passagem	0.3333	1.716	ns P>0.05
4a. passagem vs 8a. passagem	1.000	5.149	* P<0.05
4a. passagem vs 9a. passagem	1.000	5.149	* P<0.05
4a. passagem vs 10a. passagem	0.7778	4.005	ns P>0.05
5a. passagem vs 6a. passagem	-0.2222	1.144	ns P>0.05
5a. passagem vs 7a. passagem	-0.6667	3.432	ns P>0.05
5a. passagem vs 8a. passagem	0.000	0.000	ns P>0.05
5a. passagem vs 9a. passagem	0.000	0.000	ns P>0.05
5a. passagem vs 10a. passagem	-0.2222	1.144	ns P>0.05
6a. passagem vs 7a. passagem	-0.4444	2.288	ns P>0.05
6a. passagem vs 8a. passagem	0.2222	1.144	ns P>0.05
6a. passagem vs 9a. passagem	0.2222	1.144	ns P>0.05
6a. passagem vs 10a. passagem	0.000	0.000	ns P>0.05
7a. passagem vs 8a. passagem	0.6667	3.432	ns P>0.05
7a. passagem vs 9a. passagem	0.6667	3.432	ns P>0.05
7a. passagem vs 10a. passagem	0.4444	2.288	ns P>0.05
8a. passagem vs 9a. passagem	0.000	0.000	ns P>0.05
8a. passagem vs 10a. passagem	-0.2222	1.144	ns P>0.05
9a. passagem vs 10a. passagem	-0.2222	1.144	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
2a. passagem - 3a. passagem	-2.000	-2.881	-1.119
2a. passagem - 4a. passagem	-0.3333	-1.214	0.5472

2a. passagem - 5a. passagem	0.6667	-0.2139	1.547
2a. passagem - 6a. passagem	0.4444	-0.4361	1.325
2a. passagem - 7a. passagem	0.000	-0.8805	0.8805
2a. passagem - 8a. passagem	0.6667	-0.2139	1.547
2a. passagem - 9a. passagem	0.6667	-0.2139	1.547
2a. passagem - 10a. passagem	0.4444	-0.4361	1.325
3a. passagem - 4a. passagem	1.667	0.7861	2.547
3a. passagem - 5a. passagem	2.667	1.786	3.547
3a. passagem - 6a. passagem	2.444	1.564	3.325
3a. passagem - 7a. passagem	2.000	1.119	2.881
3a. passagem - 8a. passagem	2.667	1.786	3.547
3a. passagem - 9a. passagem	2.667	1.786	3.547
3a. passagem - 10a. passagem	2.444	1.564	3.325
4a. passagem - 5a. passagem	1.000	0.1195	1.881
4a. passagem - 6a. passagem	0.7778	-0.1028	1.658
4a. passagem - 7a. passagem	0.3333	-0.5472	1.214
4a. passagem - 8a. passagem	1.000	0.1195	1.881
4a. passagem - 9a. passagem	1.000	0.1195	1.881
4a. passagem - 10a. passagem	0.7778	-0.1028	1.658
5a. passagem - 6a. passagem	-0.2222	-1.103	0.6583
5a. passagem - 7a. passagem	-0.6667	-1.547	0.2139
5a. passagem - 8a. passagem	0.000	-0.8805	0.8805
5a. passagem - 9a. passagem	0.000	-0.8805	0.8805
5a. passagem - 10a. passagem	-0.2222	-1.103	0.6583
6a. passagem - 7a. passagem	-0.4444	-1.325	0.4361
6a. passagem - 8a. passagem	0.2222	-0.6583	1.103
6a. passagem - 9a. passagem	0.2222	-0.6583	1.103
6a. passagem - 10a. passagem	0.000	-0.8805	0.8805
7a. passagem - 8a. passagem	0.6667	-0.2139	1.547
7a. passagem - 9a. passagem	0.6667	-0.2139	1.547
7a. passagem - 10a. passagem	0.4444	-0.4361	1.325
8a. passagem - 9a. passagem	0.000	-0.8805	0.8805
8a. passagem - 10a. passagem	-0.2222	-1.103	0.6583
9a. passagem - 10a. passagem	-0.2222	-1.103	0.6583

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test cannot be performed because at least one column's standard deviation is zero.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
2a. passagem		>0.10	No
3a. passagem	0.3484	>0.10	Yes
4a. passagem	0.4142	0.0912	Yes
5a. passagem	0.4142	0.0912	Yes
6a. passagem	0.3560	>0.10	Yes

7a. passagem		>0.10	No
8a. passagem	0.4142	0.0912	Yes
9a. passagem	0.4142	0.0912	Yes
10a. passagem	0.3560	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	52.247	6.531
Residuals (within columns)	72	24.444	0.3395
Total	80	76.691	

$F = 19.236 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

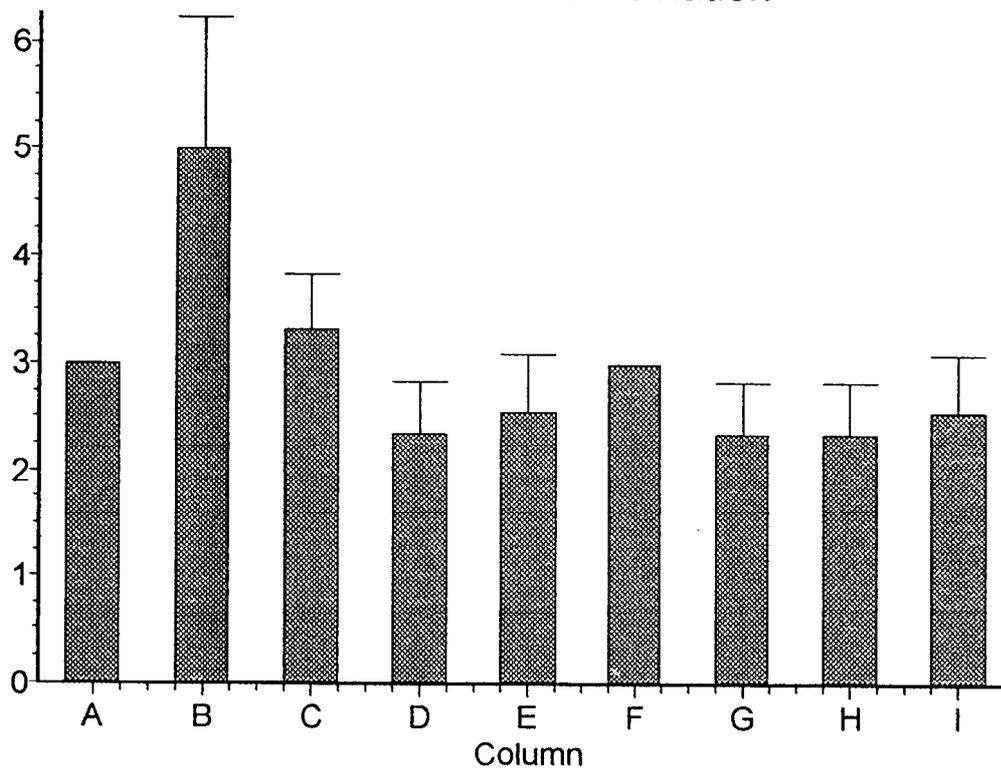
Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
2a. passagem	9	3.000	0.000	0.000	3.000
3a. passagem	9	5.000	1.225	0.4082	4.000
4a. passagem	9	3.333	0.5000	0.1667	3.000
5a. passagem	9	2.333	0.5000	0.1667	2.000
6a. passagem	9	2.556	0.5270	0.1757	3.000
7a. passagem	9	3.000	0.000	0.000	3.000
8a. passagem	9	2.333	0.5000	0.1667	2.000
9a. passagem	9	2.333	0.5000	0.1667	2.000
10a. passagem	9	2.556	0.5270	0.1757	3.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
2a. passagem	3.000	3.000	3.000	3.000
3a. passagem	4.000	7.000	4.059	5.941
4a. passagem	3.000	4.000	2.949	3.718
5a. passagem	2.000	3.000	1.949	2.718
6a. passagem	2.000	3.000	2.150	2.961
7a. passagem	3.000	3.000	3.000	3.000
8a. passagem	2.000	3.000	1.949	2.718
9a. passagem	2.000	3.000	1.949	2.718
10a. passagem	2.000	3.000	2.150	2.961

* * *

Amostra M82-02, suspensão a 1:5, IC, PC em dias.
Mean and Standard Deviation



Amostra M82-02, suspensão a 1:5, IC, PI em dias

#	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
1	7	6	6	5
2	7	7	6	5
3	7	7	6	5
4	8	7	7	5
5	8	7	7	5
6	8	7	7	5
7	9	9	7	5
8		9	7	5
9		9	7	6
10		9	7	7

#	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
1	5	5	6	5
2	5	5	6	5
3	5	5	6	5
4	5	5	6	5
5	5	5	7	5
6	5	5	7	5
7	6	5	7	6
8	6	5	7	6
9	6	6	7	6
10	6	6	7	6

#	10. passagem
1	5
2	5
3	5
4	5
5	5
6	5
7	6
8	6
9	6
10	5

Amostra M82-02, suspensão a 1:5, IC, PI em dias

Col. title	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
Mean	7.7142857143	7.7	6.7	5.3
Standard deviation (SD)	0.7559	1.160	0.4830	0.6749
Sample size (N)	7	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	0.2857	0.3667	0.1528	0.2134
Lower 95% conf. limit	7.015	6.871	6.354	4.817
Upper 95% conf. limit	8.413	8.529	7.046	5.783
Minimum	7.000	6.000	6.000	5.000
Median (50th percentile)	8.000	7.000	7.000	5.000
Maximum	9.000	9.000	7.000	7.000
Normality test KS	0.2562	0.3270	0.4327	0.4716
Normality test P value	>0.10	>0.10	0,0473	0,0234
Passed normality test? Yes		Yes	No	No

Col. title	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
Mean	5.4	5.2	6.6	5.4
Standard deviation (SD)	0.5164	0.4216	0.5164	0.5164
Sample size (N)	10	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	0.1633	0.1333	0.1633	0.1633
Lower 95% conf. limit	5.031	4.898	6.231	5.031
Upper 95% conf. limit	5.769	5.502	6.969	5.769
Minimum	5.000	5.000	6.000	5.000
Median (50th percentile)	5.000	5.000	7.000	5.000
Maximum	6.000	6.000	7.000	6.000
Normality test KS	0.3807	0.4824	0.3807	0.3807
Normality test P value	>0.10	0,0191	>0.10	>0.10
Passed normality test? Yes		No	Yes	Yes

Col. title	10. passagem
Mean	5.3
Standard deviation (SD)	0.4830
Sample size (N)	10

Std. error of mean(SEM)	0.1528
Lower 95% conf. limit	4.954
Upper 95% conf. limit	5.646

Minimum	5.000
Median (50th percentile)	5.000
Maximum	6.000

Normality test KS	0.4327
Normality test P value	0,0473
Passed normality test? No	

Amostra M82-02, suspensão a 1:5, IC, PI em dias

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.525 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
2a. passagem vs 3a. passagem	0.01429	0.06339	ns P>0.05
2a. passagem vs 4a. passagem	1.014	4.500	ns P>0.05
2a. passagem vs 5a. passagem	2.414	10.712	*** P<0.001
2a. passagem vs 6a. passagem	2.314	10.268	*** P<0.001
2a. passagem vs 7a. passagem	2.514	11.156	*** P<0.001
2a. passagem vs 8a. passagem	1.114	4.944	* P<0.05
2a. passagem vs 9a. passagem	2.314	10.268	*** P<0.001
2a. passagem vs 10. passagem	2.414	10.712	*** P<0.001
3a. passagem vs 4a. passagem	1.000	4.889	* P<0.05
3a. passagem vs 5a. passagem	2.400	11.734	*** P<0.001
3a. passagem vs 6a. passagem	2.300	11.245	*** P<0.001
3a. passagem vs 7a. passagem	2.500	12.223	*** P<0.001
3a. passagem vs 8a. passagem	1.100	5.378	** P<0.01
3a. passagem vs 9a. passagem	2.300	11.245	*** P<0.001
3a. passagem vs 10. passagem	2.400	11.734	*** P<0.001
4a. passagem vs 5a. passagem	1.400	6.845	*** P<0.001
4a. passagem vs 6a. passagem	1.300	6.356	*** P<0.001
4a. passagem vs 7a. passagem	1.500	7.334	*** P<0.001
4a. passagem vs 8a. passagem	0.1000	0.4889	ns P>0.05
4a. passagem vs 9a. passagem	1.300	6.356	*** P<0.001
4a. passagem vs 10. passagem	1.400	6.845	*** P<0.001
5a. passagem vs 6a. passagem	-0.1000	0.4889	ns P>0.05
5a. passagem vs 7a. passagem	0.1000	0.4889	ns P>0.05
5a. passagem vs 8a. passagem	-1.300	6.356	*** P<0.001
5a. passagem vs 9a. passagem	-0.1000	0.4889	ns P>0.05
5a. passagem vs 10. passagem	0.000	0.000	ns P>0.05
6a. passagem vs 7a. passagem	0.2000	0.9779	ns P>0.05
6a. passagem vs 8a. passagem	-1.200	5.867	** P<0.01
6a. passagem vs 9a. passagem	0.000	0.000	ns P>0.05
6a. passagem vs 10. passagem	0.1000	0.4889	ns P>0.05
7a. passagem vs 8a. passagem	-1.400	6.845	*** P<0.001
7a. passagem vs 9a. passagem	-0.2000	0.9779	ns P>0.05
7a. passagem vs 10. passagem	-0.1000	0.4889	ns P>0.05
8a. passagem vs 9a. passagem	1.200	5.867	** P<0.01
8a. passagem vs 10. passagem	1.300	6.356	*** P<0.001
9a. passagem vs 10. passagem	0.1000	0.4889	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
2a. passagem - 3a. passagem	0.01429	-1.006	1.034
2a. passagem - 4a. passagem	1.014	-0.005641	2.034

2a. passagem - 5a. passagem	2.414	1.394	3.434
2a. passagem - 6a. passagem	2.314	1.294	3.334
2a. passagem - 7a. passagem	2.514	1.494	3.534
2a. passagem - 8a. passagem	1.114	0.09436	2.134
2a. passagem - 9a. passagem	2.314	1.294	3.334
2a. passagem - 10. passagem	2.414	1.394	3.434
3a. passagem - 4a. passagem	1.000	0.07443	1.926
3a. passagem - 5a. passagem	2.400	1.474	3.326
3a. passagem - 6a. passagem	2.300	1.374	3.226
3a. passagem - 7a. passagem	2.500	1.574	3.426
3a. passagem - 8a. passagem	1.100	0.1744	2.026
3a. passagem - 9a. passagem	2.300	1.374	3.226
3a. passagem - 10. passagem	2.400	1.474	3.326
4a. passagem - 5a. passagem	1.400	0.4744	2.326
4a. passagem - 6a. passagem	1.300	0.3744	2.226
4a. passagem - 7a. passagem	1.500	0.5744	2.426
4a. passagem - 8a. passagem	0.1000	-0.8256	1.026
4a. passagem - 9a. passagem	1.300	0.3744	2.226
4a. passagem - 10. passagem	1.400	0.4744	2.326
5a. passagem - 6a. passagem	-0.1000	-1.026	0.8256
5a. passagem - 7a. passagem	0.1000	-0.8256	1.026
5a. passagem - 8a. passagem	-1.300	-2.226	-0.3744
5a. passagem - 9a. passagem	-0.1000	-1.026	0.8256
5a. passagem - 10. passagem	0.000	-0.9256	0.9256
6a. passagem - 7a. passagem	0.2000	-0.7256	1.126
6a. passagem - 8a. passagem	-1.200	-2.126	-0.2744
6a. passagem - 9a. passagem	0.000	-0.9256	0.9256
6a. passagem - 10. passagem	0.1000	-0.8256	1.026
7a. passagem - 8a. passagem	-1.400	-2.326	-0.4744
7a. passagem - 9a. passagem	-0.2000	-1.126	0.7256
7a. passagem - 10. passagem	-0.1000	-1.026	0.8256
8a. passagem - 9a. passagem	1.200	0.2744	2.126
8a. passagem - 10. passagem	1.300	0.3744	2.226
9a. passagem - 10. passagem	0.1000	-0.8256	1.026

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 16.502

The P value is 0.0357.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
=====	=====	=====	=====

2a. passagem	0.2562	>0.10	Yes
3a. passagem	0.3270	>0.10	Yes
4a. passagem	0.4327	0.0473	No
5a. passagem	0.4716	0.0234	No
6a. passagem	0.3807	>0.10	Yes
7a. passagem	0.4824	0.0191	No
8a. passagem	0.3807	>0.10	Yes
9a. passagem	0.3807	>0.10	Yes
10. passagem	0.4327	0.0473	No

At least one column failed the normality test with $P < 0.05$. Consider using a nonparametric test or transforming the data (i.e. converting to logarithms or reciprocals).

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	80.636	10.079
Residuals (within columns)	78	32.629	0.4183
Total	86	113.26	

$F = 24.095 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

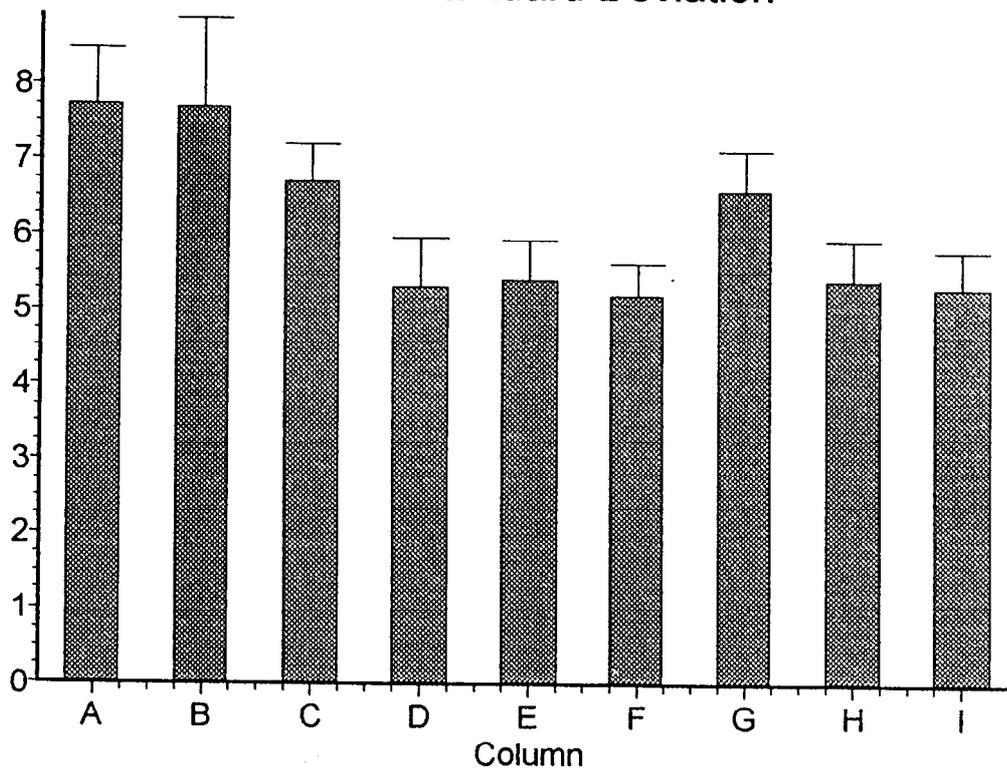
Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
2a. passagem	7	7.714	0.7559	0.2857	8.000
3a. passagem	10	7.700	1.160	0.3667	7.000
4a. passagem	10	6.700	0.4830	0.1528	7.000
5a. passagem	10	5.300	0.6749	0.2134	5.000
6a. passagem	10	5.400	0.5164	0.1633	5.000
7a. passagem	10	5.200	0.4216	0.1333	5.000
8a. passagem	10	6.600	0.5164	0.1633	7.000
9a. passagem	10	5.400	0.5164	0.1633	5.000
10. passagem	10	5.300	0.4830	0.1528	5.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
2a. passagem	7.000	9.000	7.015	8.413
3a. passagem	6.000	9.000	6.871	8.529
4a. passagem	6.000	7.000	6.354	7.046
5a. passagem	5.000	7.000	4.817	5.783
6a. passagem	5.000	6.000	5.031	5.769
7a. passagem	5.000	6.000	4.898	5.502
8a. passagem	6.000	7.000	6.231	6.969
9a. passagem	5.000	6.000	5.031	5.769
10. passagem	5.000	6.000	4.954	5.646

* * *

Amostra M82-02, suspensão a 1:5, IC, PI em dias
Mean and Standard Deviation



Amostra M82-02, inoculação IM, suspensão a 1:5, período de incubação

#	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
1	10	10	10	10
2	10	10	10	10
3	10	10	10	10
4	10	10	10	10
5	10	10	10	11
6	11	11	11	12
7	11	11	11	12
8	13	12	11	13
9	13	10	12	
10	13	18	12	

#	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
1	10	10	11	10
2	10	10	11	10
3	10	11	12	10
4	10	11	17	10
5	10	11	19	10
6	11	11	19	10
7	11	11	19	10
8	19	16	19	10
9		15	19	11
10			19	11

#	10a. passagem
1	10
2	10
3	10
4	10
5	10
6	10
7	10
8	11
9	12
10	13

Amostra M82-02, inoculação IM, suspensão a 1:5, período de incubação

Col. title	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
Mean	11.1	11.2	10.7	11
Standard deviation (SD)	1.370	2.486	0.8233	1.195
Sample size (N)	10	10	10	8
Std. error of mean(SEM)	0.4333	0.7860	0.2603	0.4226
Lower 95% conf. limit	10.120	9.422	10.111	10.001
Upper 95% conf. limit	12.080	12.978	11.289	11.999
Minimum	10.000	10.000	10.000	10.000
Median (50th percentile)	10.500	10.000	10.500	10.500
Maximum	13.000	18.000	12.000	13.000
Normality test KS	0.2889	0.3321	0.3024	0.2986
Normality test P value	>0.10	>0.10	>0.10	>0.10
Passed normality test? Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Col. title	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
Mean	11.375	11.7777777778	16.5	10.2
Standard deviation (SD)	3.114	2.167	3.629	0.4216
Sample size (N)	8	9	10	10
Std. error of mean(SEM)	1.101	0.7222	1.147	0.1333
Lower 95% conf. limit	8.771	10.112	13.904	9.898
Upper 95% conf. limit	13.979	13.443	19.096	10.502
Minimum	10.000	10.000	11.000	10.000
Median (50th percentile)	10.000	11.000	19.000	10.000
Maximum	19.000	16.000	19.000	11.000
Normality test KS	0.4229	0.4180	0.3546	0.4824
Normality test P value	>0.10	0,0862	>0.10	0,0191
Passed normality test? Yes	Yes	Yes	Yes	No

Col. title	10a. passagem
Mean	10.6
Standard deviation (SD)	1.075
Sample size (N)	10

Std. error of mean(SEM)	0.3399
Lower 95% conf. limit	9.831
Upper 95% conf. limit	11.369

Minimum	10.000
Median (50th percentile)	10.000
Maximum	13.000

Normality test KS	0.4116
Normality test P value	0,0675
Passed normality test? Yes	Yes

Amostra M82-02, inoculação IM, suspensão a 1:5, período de incubação

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.528 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
2a. passagem vs 3a. passagem	-0.1000	0.1530	ns P>0.05
2a. passagem vs 4a. passagem	0.4000	0.6121	ns P>0.05
2a. passagem vs 5a. passagem	0.1000	0.1443	ns P>0.05
2a. passagem vs 6a. passagem	-0.2750	0.3968	ns P>0.05
2a. passagem vs 7a. passagem	-0.6778	1.010	ns P>0.05
2a. passagem vs 8a. passagem	-5.400	8.264	*** P<0.001
2a. passagem vs 9a. passagem	0.9000	1.377	ns P>0.05
2a. passagem vs 10a. passagem	0.5000	0.7652	ns P>0.05
3a. passagem vs 4a. passagem	0.5000	0.7652	ns P>0.05
3a. passagem vs 5a. passagem	0.2000	0.2886	ns P>0.05
3a. passagem vs 6a. passagem	-0.1750	0.2525	ns P>0.05
3a. passagem vs 7a. passagem	-0.5778	0.8606	ns P>0.05
3a. passagem vs 8a. passagem	-5.300	8.111	*** P<0.001
3a. passagem vs 9a. passagem	1.000	1.530	ns P>0.05
3a. passagem vs 10a. passagem	0.6000	0.9182	ns P>0.05
4a. passagem vs 5a. passagem	-0.3000	0.4328	ns P>0.05
4a. passagem vs 6a. passagem	-0.6750	0.9739	ns P>0.05
4a. passagem vs 7a. passagem	-1.078	1.605	ns P>0.05
4a. passagem vs 8a. passagem	-5.800	8.876	*** P<0.001
4a. passagem vs 9a. passagem	0.5000	0.7652	ns P>0.05
4a. passagem vs 10a. passagem	0.1000	0.1530	ns P>0.05
5a. passagem vs 6a. passagem	-0.3750	0.5133	ns P>0.05
5a. passagem vs 7a. passagem	-0.7778	1.095	ns P>0.05
5a. passagem vs 8a. passagem	-5.500	7.935	*** P<0.001
5a. passagem vs 9a. passagem	0.8000	1.154	ns P>0.05
5a. passagem vs 10a. passagem	0.4000	0.5771	ns P>0.05
6a. passagem vs 7a. passagem	-0.4028	0.5673	ns P>0.05
6a. passagem vs 8a. passagem	-5.125	7.394	*** P<0.001
6a. passagem vs 9a. passagem	1.175	1.695	ns P>0.05
6a. passagem vs 10a. passagem	0.7750	1.118	ns P>0.05
7a. passagem vs 8a. passagem	-4.722	7.034	*** P<0.001
7a. passagem vs 9a. passagem	1.578	2.350	ns P>0.05
7a. passagem vs 10a. passagem	1.178	1.754	ns P>0.05
8a. passagem vs 9a. passagem	6.300	9.641	*** P<0.001
8a. passagem vs 10a. passagem	5.900	9.029	*** P<0.001
9a. passagem vs 10a. passagem	-0.4000	0.6121	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
2a. passagem - 3a. passagem	-0.1000	-3.059	2.859
2a. passagem - 4a. passagem	0.4000	-2.559	3.359

2a. passagem - 5a. passagem	0.1000	-3.038	3.238
2a. passagem - 6a. passagem	-0.2750	-3.413	2.863
2a. passagem - 7a. passagem	-0.6778	-3.718	2.362
2a. passagem - 8a. passagem	-5.400	-8.359	-2.441
2a. passagem - 9a. passagem	0.9000	-2.059	3.859
2a. passagem - 10a. passagem	0.5000	-2.459	3.459
3a. passagem - 4a. passagem	0.5000	-2.459	3.459
3a. passagem - 5a. passagem	0.2000	-2.938	3.338
3a. passagem - 6a. passagem	-0.1750	-3.313	2.963
3a. passagem - 7a. passagem	-0.5778	-3.618	2.462
3a. passagem - 8a. passagem	-5.300	-8.259	-2.341
3a. passagem - 9a. passagem	1.000	-1.959	3.959
3a. passagem - 10a. passagem	0.6000	-2.359	3.559
4a. passagem - 5a. passagem	-0.3000	-3.438	2.838
4a. passagem - 6a. passagem	-0.6750	-3.813	2.463
4a. passagem - 7a. passagem	-1.078	-4.118	1.962
4a. passagem - 8a. passagem	-5.800	-8.759	-2.841
4a. passagem - 9a. passagem	0.5000	-2.459	3.459
4a. passagem - 10a. passagem	0.1000	-2.859	3.059
5a. passagem - 6a. passagem	-0.3750	-3.683	2.933
5a. passagem - 7a. passagem	-0.7778	-3.993	2.437
5a. passagem - 8a. passagem	-5.500	-8.638	-2.362
5a. passagem - 9a. passagem	0.8000	-2.338	3.938
5a. passagem - 10a. passagem	0.4000	-2.738	3.538
6a. passagem - 7a. passagem	-0.4028	-3.618	2.812
6a. passagem - 8a. passagem	-5.125	-8.263	-1.987
6a. passagem - 9a. passagem	1.175	-1.963	4.313
6a. passagem - 10a. passagem	0.7750	-2.363	3.913
7a. passagem - 8a. passagem	-4.722	-7.762	-1.682
7a. passagem - 9a. passagem	1.578	-1.462	4.618
7a. passagem - 10a. passagem	1.178	-1.862	4.218
8a. passagem - 9a. passagem	6.300	3.341	9.259
8a. passagem - 10a. passagem	5.900	2.941	8.859
9a. passagem - 10a. passagem	-0.4000	-3.359	2.559

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 49.831

The P value is < 0.0001.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	K \hat{S}	P Value	Passed normality test?
=====	=====	=====	=====

2a. passagem	0.2889	>0.10	Yes
3a. passagem	0.3321	>0.10	Yes
4a. passagem	0.3024	>0.10	Yes
5a. passagem	0.2986	>0.10	Yes
6a. passagem	0.4229	>0.10	Yes
7a. passagem	0.4180	0.0862	Yes
8a. passagem	0.3546	>0.10	Yes
9a. passagem	0.4824	0.0191	No
10a. passagem	0.4116	0.0675	Yes

At least one column failed the normality test with $P < 0.05$. Consider using a nonparametric test or transforming the data (i.e. converting to logarithms or reciprocals).

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	285.42	35.678
Residuals (within columns)	76	324.53	4.270
Total	84	609.95	

$F = 8.355 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

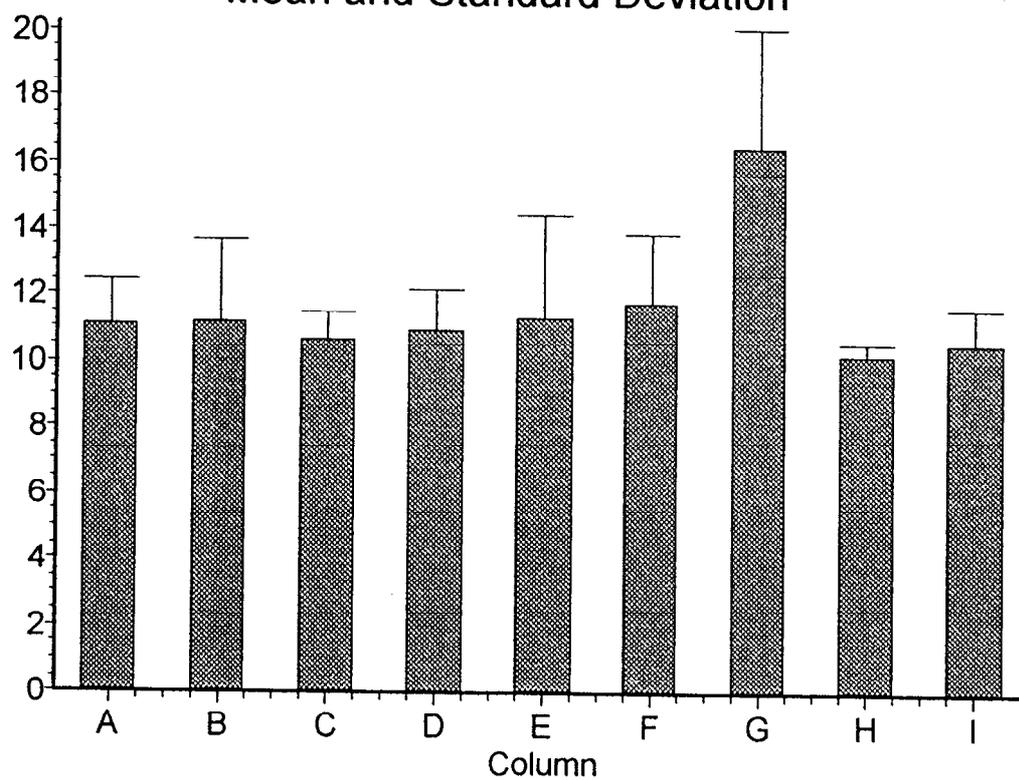
Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
2a. passagem	10	11.100	1.370	0.4333	10.500
3a. passagem	10	11.200	2.486	0.7860	10.000
4a. passagem	10	10.700	0.8233	0.2603	10.500
5a. passagem	8	11.000	1.195	0.4226	10.500
6a. passagem	8	11.375	3.114	1.101	10.000
7a. passagem	9	11.778	2.167	0.7222	11.000
8a. passagem	10	16.500	3.629	1.147	19.000
9a. passagem	10	10.200	0.4216	0.1333	10.000
10a. passagem	10	10.600	1.075	0.3399	10.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
2a. passagem	10.000	13.000	10.120	12.080
3a. passagem	10.000	18.000	9.422	12.978
4a. passagem	10.000	12.000	10.111	11.289
5a. passagem	10.000	13.000	10.001	11.999
6a. passagem	10.000	19.000	8.771	13.979
7a. passagem	10.000	16.000	10.112	13.443
8a. passagem	11.000	19.000	13.904	19.096
9a. passagem	10.000	11.000	9.898	10.502
10a. passagem	10.000	13.000	9.831	11.369

* * *

Amostra M82-02, inoculação IM, suspensão a 1:5, período de incubação
Mean and Standard Deviation



Amostra M82-02, inoculação IM, suspensão a 1:5, Período clínico

#	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
1	1	2	1	1
2	1	2	2	2
3	2	2	2	3
4	3	2	2	3
5	3	3	3	2
6	2	3	2	2
7	2	2	2	2
8	2	2	2	2
9	1	2	2	2
10	1	3	2	2

#	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
1	1	1	2	2
2	1	2	2	2
3	1	1	2	2
4	2	2	2	2
5	2	2	2	2
6	2	2	2	2
7	2	2	2	2
8	2	2	3	2
9	2	2	3	2
10	2	2	3	2

#	10a. passagem
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1
6	1
7	1
8	1
9	1
10	2

Amostra M82-02, inoculação IM, suspensão a 1:5, Período clínico

Col. title	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
Mean	1.8	2.3	2	2.1
Standard deviation (SD)	0.7888	0.4830	0.4714	0.5676
Sample size (N)	10	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	0.2494	0.1528	0.1491	0.1795
Lower 95% conf. limit	1.236	1.954	1.663	1.694
Upper 95% conf. limit	2.364	2.646	2.337	2.506
Minimum	1.000	2.000	1.000	1.000
Median (50th percentile)	2.000	2.000	2.000	2.000
Maximum	3.000	3.000	3.000	3.000
Normality test KS	0.2447	0.4327	0.4000	0.3699
Normality test P value	>0.10	0,0473	0,0815	>0.10
Passed normality test?	Yes	No	Yes	Yes

Col. title	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
Mean	1.7	1.8	2.3	2
Standard deviation (SD)	0.4830	0.4216	0.4830	0.000
Sample size (N)	10	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	0.1528	0.1333	0.1528	0.000
Lower 95% conf. limit	1.354	1.498	1.954	2.000
Upper 95% conf. limit	2.046	2.102	2.646	2.000
Minimum	1.000	1.000	2.000	2.000
Median (50th percentile)	2.000	2.000	2.000	2.000
Maximum	2.000	2.000	3.000	2.000
Normality test KS	0.4327	0.4824	0.4327	
Normality test P value	0,0473	0,0191	0,0473	
Passed normality test?	No	No	No	

Col. title	10a. passagem
Mean	1.1
Standard deviation (SD)	0.3162
Sample size (N)	10
Std. error of mean(SEM)	0.1000
Lower 95% conf. limit	0.8738
Upper 95% conf. limit	1.326
Minimum	1.000
Median (50th percentile)	1.000
Maximum	2.000
Normality test KS	0.5241
Normality test P value	0,0082
Passed normality test?	No

Amostra M82-02, inoculação IM, suspensão a 1:5, Período clínico

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001 , considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.521 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value	
2a. passagem vs 3a. passagem	-0.5000	3.239	ns	P>0.05
2a. passagem vs 4a. passagem	-0.2000	1.296	ns	P>0.05
2a. passagem vs 5a. passagem	-0.3000	1.944	ns	P>0.05
2a. passagem vs 6a. passagem	0.1000	0.6478	ns	P>0.05
2a. passagem vs 7a. passagem	0.000	0.000	ns	P>0.05
2a. passagem vs 8a. passagem	-0.5000	3.239	ns	P>0.05
2a. passagem vs 9a. passagem	-0.2000	1.296	ns	P>0.05
2a. passagem vs 10a. passagem	0.7000	4.535	*	P<0.05
3a. passagem vs 4a. passagem	0.3000	1.944	ns	P>0.05
3a. passagem vs 5a. passagem	0.2000	1.296	ns	P>0.05
3a. passagem vs 6a. passagem	0.6000	3.887	ns	P>0.05
3a. passagem vs 7a. passagem	0.5000	3.239	ns	P>0.05
3a. passagem vs 8a. passagem	0.000	0.000	ns	P>0.05
3a. passagem vs 9a. passagem	0.3000	1.944	ns	P>0.05
3a. passagem vs 10a. passagem	1.200	7.774	***	P<0.001
4a. passagem vs 5a. passagem	-0.1000	0.6478	ns	P>0.05
4a. passagem vs 6a. passagem	0.3000	1.944	ns	P>0.05
4a. passagem vs 7a. passagem	0.2000	1.296	ns	P>0.05
4a. passagem vs 8a. passagem	-0.3000	1.944	ns	P>0.05
4a. passagem vs 9a. passagem	0.000	0.000	ns	P>0.05
4a. passagem vs 10a. passagem	0.9000	5.831	**	P<0.01
5a. passagem vs 6a. passagem	0.4000	2.591	ns	P>0.05
5a. passagem vs 7a. passagem	0.3000	1.944	ns	P>0.05
5a. passagem vs 8a. passagem	-0.2000	1.296	ns	P>0.05
5a. passagem vs 9a. passagem	0.1000	0.6478	ns	P>0.05
5a. passagem vs 10a. passagem	1.000	6.478	***	P<0.001
6a. passagem vs 7a. passagem	-0.1000	0.6478	ns	P>0.05
6a. passagem vs 8a. passagem	-0.6000	3.887	ns	P>0.05
6a. passagem vs 9a. passagem	-0.3000	1.944	ns	P>0.05
6a. passagem vs 10a. passagem	0.6000	3.887	ns	P>0.05
7a. passagem vs 8a. passagem	-0.5000	3.239	ns	P>0.05
7a. passagem vs 9a. passagem	-0.2000	1.296	ns	P>0.05
7a. passagem vs 10a. passagem	0.7000	4.535	*	P<0.05
8a. passagem vs 9a. passagem	0.3000	1.944	ns	P>0.05
8a. passagem vs 10a. passagem	1.200	7.774	***	P<0.001
9a. passagem vs 10a. passagem	0.9000	5.831	**	P<0.01

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
2a. passagem - 3a. passagem	-0.5000	-1.198	0.1979
2a. passagem - 4a. passagem	-0.2000	-0.8979	0.4979

2a. passagem - 5a. passagem	-0.3000	-0.9979	0.3979
2a. passagem - 6a. passagem	0.1000	-0.5979	0.7979
2a. passagem - 7a. passagem	0.000	-0.6979	0.6979
2a. passagem - 8a. passagem	-0.5000	-1.198	0.1979
2a. passagem - 9a. passagem	-0.2000	-0.8979	0.4979
2a. passagem - 10a. passagem	0.7000	0.002090	1.398
3a. passagem - 4a. passagem	0.3000	-0.3979	0.9979
3a. passagem - 5a. passagem	0.2000	-0.4979	0.8979
3a. passagem - 6a. passagem	0.6000	-0.09791	1.298
3a. passagem - 7a. passagem	0.5000	-0.1979	1.198
3a. passagem - 8a. passagem	0.000	-0.6979	0.6979
3a. passagem - 9a. passagem	0.3000	-0.3979	0.9979
3a. passagem - 10a. passagem	1.200	0.5021	1.898
4a. passagem - 5a. passagem	-0.1000	-0.7979	0.5979
4a. passagem - 6a. passagem	0.3000	-0.3979	0.9979
4a. passagem - 7a. passagem	0.2000	-0.4979	0.8979
4a. passagem - 8a. passagem	-0.3000	-0.9979	0.3979
4a. passagem - 9a. passagem	0.000	-0.6979	0.6979
4a. passagem - 10a. passagem	0.9000	0.2021	1.598
5a. passagem - 6a. passagem	0.4000	-0.2979	1.098
5a. passagem - 7a. passagem	0.3000	-0.3979	0.9979
5a. passagem - 8a. passagem	-0.2000	-0.8979	0.4979
5a. passagem - 9a. passagem	0.1000	-0.5979	0.7979
5a. passagem - 10a. passagem	1.000	0.3021	1.698
6a. passagem - 7a. passagem	-0.1000	-0.7979	0.5979
6a. passagem - 8a. passagem	-0.6000	-1.298	0.09791
6a. passagem - 9a. passagem	-0.3000	-0.9979	0.3979
6a. passagem - 10a. passagem	0.6000	-0.09791	1.298
7a. passagem - 8a. passagem	-0.5000	-1.198	0.1979
7a. passagem - 9a. passagem	-0.2000	-0.8979	0.4979
7a. passagem - 10a. passagem	0.7000	0.002090	1.398
8a. passagem - 9a. passagem	0.3000	-0.3979	0.9979
8a. passagem - 10a. passagem	1.200	0.5021	1.898
9a. passagem - 10a. passagem	0.9000	0.2021	1.598

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test cannot be performed because at least one column's standard deviation is zero.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
2a. passagem	0.2447	>0.10	Yes
3a. passagem	0.4327	0.0473	No
4a. passagem	0.4000	0.0815	Yes
5a. passagem	0.3699	>0.10	Yes
6a. passagem	0.4327	0.0473	No

7a. passagem	0.4824	0.0191	No
8a. passagem	0.4327	0.0473	No
9a. passagem		>0.10	No
10a. passagem	0.5241	0.0082	No

At least one column failed the normality test with $P < 0.05$. Consider using a nonparametric test or transforming the data (i.e. converting to logarithms or reciprocals).

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	10.800	1.350
Residuals (within columns)	81	19.300	0.2383
Total	89	30.100	

$F = 5.666 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

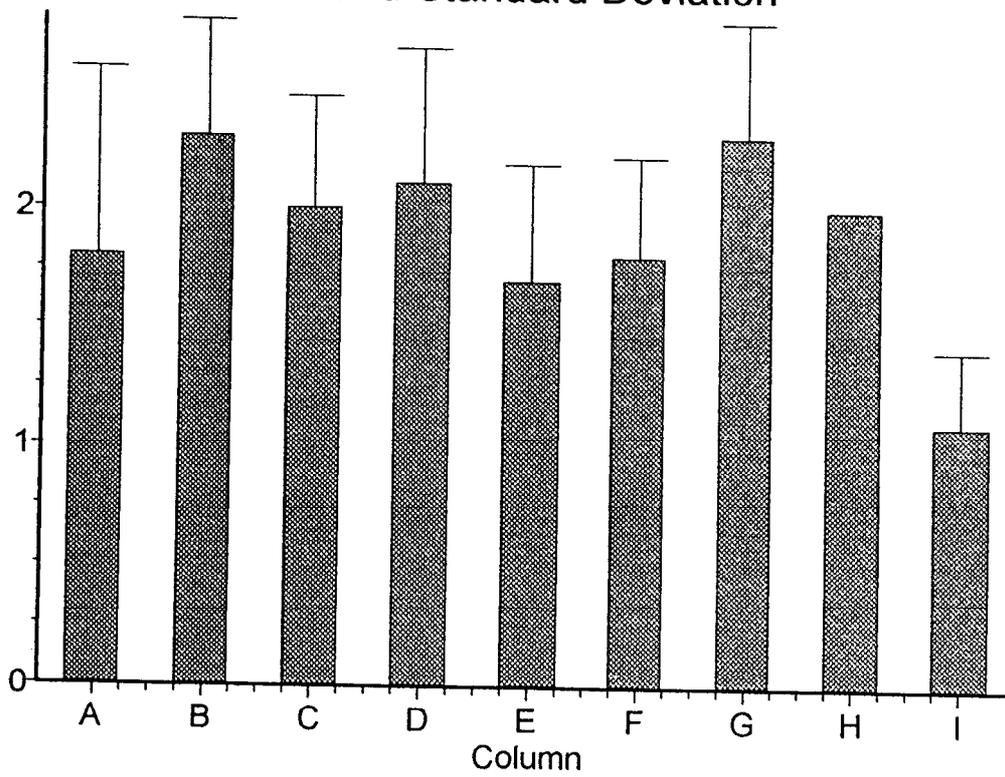
Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
2a. passagem	10	1.800	0.7888	0.2494	2.000
3a. passagem	10	2.300	0.4830	0.1528	2.000
4a. passagem	10	2.000	0.4714	0.1491	2.000
5a. passagem	10	2.100	0.5676	0.1795	2.000
6a. passagem	10	1.700	0.4830	0.1528	2.000
7a. passagem	10	1.800	0.4216	0.1333	2.000
8a. passagem	10	2.300	0.4830	0.1528	2.000
9a. passagem	10	2.000	0.000	0.000	2.000
10a. passagem	10	1.100	0.3162	0.1000	1.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
2a. passagem	1.000	3.000	1.236	2.364
3a. passagem	2.000	3.000	1.954	2.646
4a. passagem	1.000	3.000	1.663	2.337
5a. passagem	1.000	3.000	1.694	2.506
6a. passagem	1.000	2.000	1.354	2.046
7a. passagem	1.000	2.000	1.498	2.102
8a. passagem	2.000	3.000	1.954	2.646
9a. passagem	2.000	2.000	2.000	2.000
10a. passagem	1.000	2.000	0.8738	1.326

* * *

Amostra M82-02, inoculação IM, suspensão a 1:5, Período clínico
Mean and Standard Deviation



Amostra M82-02, inoculação IC, suspensão a 1:100, Período de incubação

#	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
1	7	6	7	6
2	7	7	7	6
3	8	7	7	6
4	9	7	7	6
5		7	7	6
6		7	11	6
7		8	11	6
8		7	11	6
9		8	11	6
10		12	11	6

#	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
1	6	6	6	6
2	6	6	6	6
3	6	6	6	6
4	6	7	6	6
5	6	7	7	6
6	6	7	7	6
7	7	7	7	6
8	7	7	7	7
9	7	7	7	7
10	7	7	7	7

#	10. passagem
1	6
2	6
3	6
4	6
5	6
6	6
7	6
8	6
9	7
10	7

Amostra M82-02, inoculação IC, suspensão a 1:100

Col. title	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passage
Mean	7.75	7.6	9	6
Standard deviation (SD)	0.9574	1.647	2.108	0.000
Sample size (N)	4	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	0.4787	0.5207	0.6667	0.000
Lower 95% conf. limit	6.227	6.422	7.492	6.000
Upper 95% conf. limit	9.273	8.778	10.508	6.000
Minimum	7.000	6.000	7.000	6.000
Median (50th percentile)	7.500	7.000	9.000	6.000
Maximum	9.000	12.000	11.000	6.000
Normality test KS		0.3422	0.3286	
Normality test P value	Too few values	>0.10	>0.10	
Passed normality test?		Yes	Yes	

Col. title	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
Mean	6.4	6.7	6.6	6.3
Standard deviation (SD)	0.5164	0.4830	0.5164	0.4830
Sample size (N)	10	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	0.1633	0.1528	0.1633	0.1528
Lower 95% conf. limit	6.031	6.354	6.231	5.954
Upper 95% conf. limit	6.769	7.046	6.969	6.646
Minimum	6.000	6.000	6.000	6.000
Median (50th percentile)	6.000	7.000	7.000	6.000
Maximum	7.000	7.000	7.000	7.000
Normality test KS	0.3807	0.4327	0.3807	0.4327
Normality test P value	>0.10	0,0473	>0.10	0,0473
Passed normality test?	Yes	No	Yes	No

Col. title	10. passagem
Mean	6.2
Standard deviation (SD)	0.4216
Sample size (N)	10
Std. error of mean(SEM)	0.1333
Lower 95% conf. limit	5.898
Upper 95% conf. limit	6.502
Minimum	6.000
Median (50th percentile)	6.000
Maximum	7.000
Normality test KS	0.4824
Normality test P value	0,0191
Passed normality test?	No

Amostra M82-02, inoculação IC, suspensão a 1:100

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.530 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value	
2a. passagem vs 3a. passagem	0.1500	0.3522	ns	P>0.05
2a. passagem vs 4a. passagem	-1.250	2.935	ns	P>0.05
2a. passagem vs 5a. passagem	1.750	4.109	ns	P>0.05
2a. passagem vs 6a. passagem	1.350	3.170	ns	P>0.05
2a. passagem vs 7a. passagem	1.050	2.465	ns	P>0.05
2a. passagem vs 8a. passagem	1.150	2.700	ns	P>0.05
2a. passagem vs 9a. passagem	1.450	3.404	ns	P>0.05
2a. passagem vs 10. passagem	1.550	3.639	ns	P>0.05
3a. passagem vs 4a. passagem	-1.400	4.348	ns	P>0.05
3a. passagem vs 5a. passagem	1.600	4.969	*	P<0.05
3a. passagem vs 6a. passagem	1.200	3.727	ns	P>0.05
3a. passagem vs 7a. passagem	0.9000	2.795	ns	P>0.05
3a. passagem vs 8a. passagem	1.000	3.106	ns	P>0.05
3a. passagem vs 9a. passagem	1.300	4.038	ns	P>0.05
3a. passagem vs 10. passagem	1.400	4.348	ns	P>0.05
4a. passagem vs 5a. passagem	3.000	9.318	***	P<0.001
4a. passagem vs 6a. passagem	2.600	8.075	***	P<0.001
4a. passagem vs 7a. passagem	2.300	7.143	***	P<0.001
4a. passagem vs 8a. passagem	2.400	7.454	***	P<0.001
4a. passagem vs 9a. passagem	2.700	8.386	***	P<0.001
4a. passagem vs 10. passagem	2.800	8.696	***	P<0.001
5a. passagem vs 6a. passagem	-0.4000	1.242	ns	P>0.05
5a. passagem vs 7a. passagem	-0.7000	2.174	ns	P>0.05
5a. passagem vs 8a. passagem	-0.6000	1.864	ns	P>0.05
5a. passagem vs 9a. passagem	-0.3000	0.9318	ns	P>0.05
5a. passagem vs 10. passagem	-0.2000	0.6212	ns	P>0.05
6a. passagem vs 7a. passagem	-0.3000	0.9318	ns	P>0.05
6a. passagem vs 8a. passagem	-0.2000	0.6212	ns	P>0.05
6a. passagem vs 9a. passagem	0.1000	0.3106	ns	P>0.05
6a. passagem vs 10. passagem	0.2000	0.6212	ns	P>0.05
7a. passagem vs 8a. passagem	0.1000	0.3106	ns	P>0.05
7a. passagem vs 9a. passagem	0.4000	1.242	ns	P>0.05
7a. passagem vs 10. passagem	0.5000	1.553	ns	P>0.05
8a. passagem vs 9a. passagem	0.3000	0.9318	ns	P>0.05
8a. passagem vs 10. passagem	0.4000	1.242	ns	P>0.05
9a. passagem vs 10. passagem	0.1000	0.3106	ns	P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
2a. passagem - 3a. passagem	0.1500	-1.779	2.079
2a. passagem - 4a. passagem	-1.250	-3.179	0.6792

2a. passagem - 5a. passagem	1.750	-0.1793	3.679
2a. passagem - 6a. passagem	1.350	-0.5793	3.279
2a. passagem - 7a. passagem	1.050	-0.8793	2.979
2a. passagem - 8a. passagem	1.150	-0.7793	3.079
2a. passagem - 9a. passagem	1.450	-0.4793	3.379
2a. passagem - 10. passagem	1.550	-0.3793	3.479
3a. passagem - 4a. passagem	-1.400	-2.858	0.05838
3a. passagem - 5a. passagem	1.600	0.1416	3.058
3a. passagem - 6a. passagem	1.200	-0.2584	2.658
3a. passagem - 7a. passagem	0.9000	-0.5584	2.358
3a. passagem - 8a. passagem	1.000	-0.4584	2.458
3a. passagem - 9a. passagem	1.300	-0.1584	2.758
3a. passagem - 10. passagem	1.400	-0.05838	2.858
4a. passagem - 5a. passagem	3.000	1.542	4.458
4a. passagem - 6a. passagem	2.600	1.142	4.058
4a. passagem - 7a. passagem	2.300	0.8416	3.758
4a. passagem - 8a. passagem	2.400	0.9416	3.858
4a. passagem - 9a. passagem	2.700	1.242	4.158
4a. passagem - 10. passagem	2.800	1.342	4.258
5a. passagem - 6a. passagem	-0.4000	-1.858	1.058
5a. passagem - 7a. passagem	-0.7000	-2.158	0.7584
5a. passagem - 8a. passagem	-0.6000	-2.058	0.8584
5a. passagem - 9a. passagem	-0.3000	-1.758	1.158
5a. passagem - 10. passagem	-0.2000	-1.658	1.258
6a. passagem - 7a. passagem	-0.3000	-1.758	1.158
6a. passagem - 8a. passagem	-0.2000	-1.658	1.258
6a. passagem - 9a. passagem	0.1000	-1.358	1.558
6a. passagem - 10. passagem	0.2000	-1.258	1.658
7a. passagem - 8a. passagem	0.1000	-1.358	1.558
7a. passagem - 9a. passagem	0.4000	-1.058	1.858
7a. passagem - 10. passagem	0.5000	-0.9584	1.958
8a. passagem - 9a. passagem	0.3000	-1.158	1.758
8a. passagem - 10. passagem	0.4000	-1.058	1.858
9a. passagem - 10. passagem	0.1000	-1.358	1.558

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test cannot be performed because at least one column's standard deviation is zero.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
=====	=====	=====	=====
2a. passagem	Too few values to test.		
3a. passagem	0.3422	>0.10	Yes
4a. passagem	0.3286	>0.10	Yes
5a. passagem		>0.10	No
6a. passagem	0.3807	>0.10	Yes

7a. passagem	0.4327	0.0473	No
8a. passagem	0.3807	>0.10	Yes
9a. passagem	0.4327	0.0473	No
10. passagem	0.4824	0.0191	No

At least one column failed the normality test with $P < 0.05$. Consider using a nonparametric test or transforming the data (i.e. converting to logarithms or reciprocals).

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	72.286	9.036
Residuals (within columns)	75	77.750	1.037
Total	83	150.04	

$$F = 8.716 = (MStreatment/MSresidual)$$

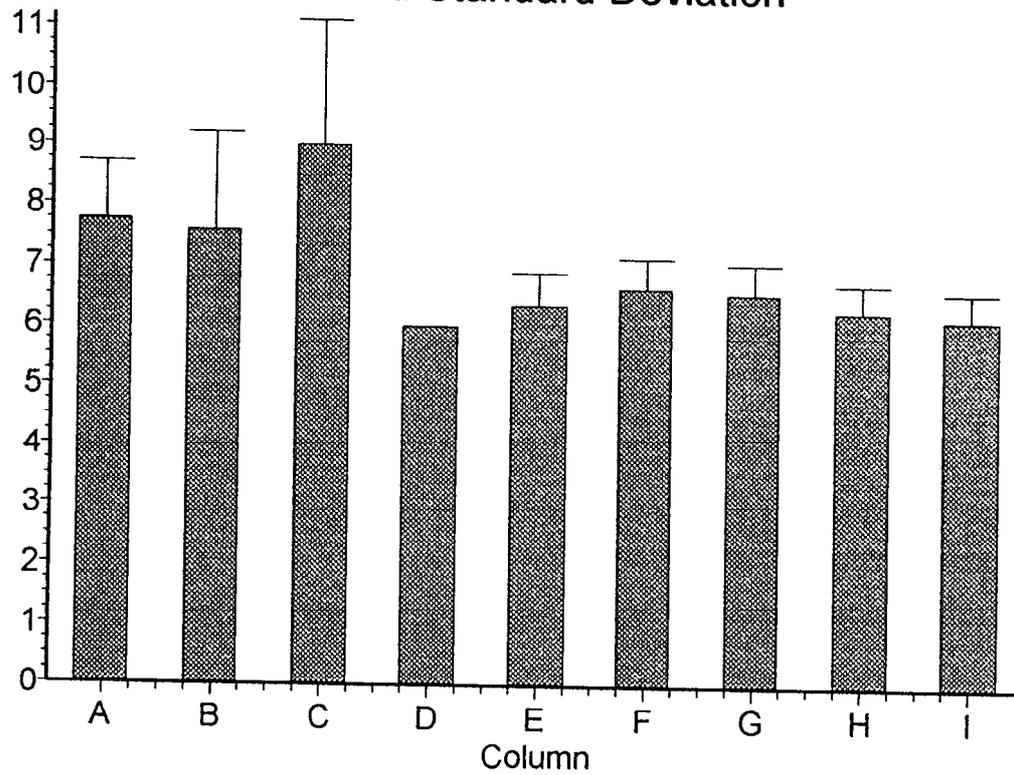
Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
2a. passagem	4	7.750	0.9574	0.4787	7.500
3a. passagem	10	7.600	1.647	0.5207	7.000
4a. passagem	10	9.000	2.108	0.6667	9.000
5a. passagem	10	6.000	0.000	0.000	6.000
6a. passagem	10	6.400	0.5164	0.1633	6.000
7a. passagem	10	6.700	0.4830	0.1528	7.000
8a. passagem	10	6.600	0.5164	0.1633	7.000
9a. passagem	10	6.300	0.4830	0.1528	6.000
10. passagem	10	6.200	0.4216	0.1333	6.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
2a. passagem	7.000	9.000	6.227	9.273
3a. passagem	6.000	12.000	6.422	8.778
4a. passagem	7.000	11.000	7.492	10.508
5a. passagem	6.000	6.000	6.000	6.000
6a. passagem	6.000	7.000	6.031	6.769
7a. passagem	6.000	7.000	6.354	7.046
8a. passagem	6.000	7.000	6.231	6.969
9a. passagem	6.000	7.000	5.954	6.646
10. passagem	6.000	7.000	5.898	6.502

* * *

mostra M82-02, inoculação IC, suspensão a 1:100, Período de incubação
Mean and Standard Deviation



Amostra M82-02, inoculação IC, suspensão a 1:100, período clínico

#	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
1	4	2	3	1
2	4	3	3	1
3	6	3	4	2
4	6	3	4	2
5		4	4	2
6		4	6	2
7		4	6	3
8		4	3	3
9		4	3	3
10		4	3	3

#	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passagem
1	2	2	4	2
2	2	3	4	2
3	2	3	4	3
4	2	3	4	3
5	2	3	4	3
6	2	3	4	3
7	3	3	4	3
8	3	3	4	3
9	3	3	4	3
10	3	3	5	4

#	10. passagem
1	2
2	2
3	2
4	2
5	3
6	3
7	3
8	3
9	3
10	3

Amostra M82-02, inoculação IC, suspensão a 1:100, período clínico

Col. title	2a. passagem	3a. passagem	4a. passagem	5a. passagem
Mean	5	3.5	3.9	2.2
Standard deviation (SD)	1.155	0.7071	1.197	0.7888
Sample size (N)	4	10	10	10

Std. error of mean(SEM)	0.5774	0.2236	0.3786	0.2494
Lower 95% conf. limit	3.163	2.994	3.044	1.636
Upper 95% conf. limit	6.837	4.006	4.756	2.764

Minimum	4.000	2.000	3.000	1.000
Median (50th percentile)	5.000	4.000	3.500	2.000
Maximum	6.000	4.000	6.000	3.000

Normality test KS		0.3602	0.2739	0.2447
Normality test P value	Too few values	>0.10	>0.10	>0.10
Passed normality test?		Yes	Yes	Yes

Col. title	6a. passagem	7a. passagem	8a. passagem	9a. passage
Mean	2.4	2.9	4.1	2.9
Standard deviation (SD)	0.5164	0.3162	0.3162	0.5676
Sample size (N)	10	10	10	10

Std. error of mean(SEM)	0.1633	0.1000	0.1000	0.1795
Lower 95% conf. limit	2.031	2.674	3.874	2.494
Upper 95% conf. limit	2.769	3.126	4.326	3.306

Minimum	2.000	2.000	4.000	2.000
Median (50th percentile)	2.000	3.000	4.000	3.000
Maximum	3.000	3.000	5.000	4.000

Normality test KS	0.3807	0.5241	0.5241	0.3699
Normality test P value	>0.10	0,0082	0,0082	>0.10
Passed normality test?	Yes	No	No	Yes

Col. title	10. passagem
Mean	2.6
Standard deviation (SD)	0.5164
Sample size (N)	10

Std. error of mean(SEM)	0.1633
Lower 95% conf. limit	2.231
Upper 95% conf. limit	2.969

Minimum	2.000
Median (50th percentile)	3.000
Maximum	3.000

Normality test KS	0.3807
Normality test P value	>0.10
Passed normality test?	Yes

Amostra M82-02, inoculação IC, suspensão a 1:100, período clínico

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001 , considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.530 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
2a. passagem vs 3a. passagem	1.500	5.140	* P<0.05
2a. passagem vs 4a. passagem	1.100	3.769	ns P>0.05
2a. passagem vs 5a. passagem	2.800	9.595	*** P<0.001
2a. passagem vs 6a. passagem	2.600	8.909	*** P<0.001
2a. passagem vs 7a. passagem	2.100	7.196	*** P<0.001
2a. passagem vs 8a. passagem	0.9000	3.084	ns P>0.05
2a. passagem vs 9a. passagem	2.100	7.196	*** P<0.001
2a. passagem vs 10. passagem	2.400	8.224	*** P<0.001
3a. passagem vs 4a. passagem	-0.4000	1.813	ns P>0.05
3a. passagem vs 5a. passagem	1.300	5.893	** P<0.01
3a. passagem vs 6a. passagem	1.100	4.986	* P<0.05
3a. passagem vs 7a. passagem	0.6000	2.720	ns P>0.05
3a. passagem vs 8a. passagem	-0.6000	2.720	ns P>0.05
3a. passagem vs 9a. passagem	0.6000	2.720	ns P>0.05
3a. passagem vs 10. passagem	0.9000	4.080	ns P>0.05
4a. passagem vs 5a. passagem	1.700	7.706	*** P<0.001
4a. passagem vs 6a. passagem	1.500	6.799	*** P<0.001
4a. passagem vs 7a. passagem	1.000	4.533	* P<0.05
4a. passagem vs 8a. passagem	-0.2000	0.9066	ns P>0.05
4a. passagem vs 9a. passagem	1.000	4.533	* P<0.05
4a. passagem vs 10. passagem	1.300	5.893	** P<0.01
5a. passagem vs 6a. passagem	-0.2000	0.9066	ns P>0.05
5a. passagem vs 7a. passagem	-0.7000	3.173	ns P>0.05
5a. passagem vs 8a. passagem	-1.900	8.613	*** P<0.001
5a. passagem vs 9a. passagem	-0.7000	3.173	ns P>0.05
5a. passagem vs 10. passagem	-0.4000	1.813	ns P>0.05
6a. passagem vs 7a. passagem	-0.5000	2.266	ns P>0.05
6a. passagem vs 8a. passagem	-1.700	7.706	*** P<0.001
6a. passagem vs 9a. passagem	-0.5000	2.266	ns P>0.05
6a. passagem vs 10. passagem	-0.2000	0.9066	ns P>0.05
7a. passagem vs 8a. passagem	-1.200	5.440	** P<0.01
7a. passagem vs 9a. passagem	0.000	0.000	ns P>0.05
7a. passagem vs 10. passagem	0.3000	1.360	ns P>0.05
8a. passagem vs 9a. passagem	1.200	5.440	** P<0.01
8a. passagem vs 10. passagem	1.500	6.799	*** P<0.001
9a. passagem vs 10. passagem	0.3000	1.360	ns P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
2a. passagem - 3a. passagem	1.500	0.1781	2.822
2a. passagem - 4a. passagem	1.100	-0.2219	2.422

2a. passagem - 5a. passagem	2.800	1.478	4.122
2a. passagem - 6a. passagem	2.600	1.278	3.922
2a. passagem - 7a. passagem	2.100	0.7781	3.422
2a. passagem - 8a. passagem	0.9000	-0.4219	2.222
2a. passagem - 9a. passagem	2.100	0.7781	3.422
2a. passagem - 10. passagem	2.400	1.078	3.722
3a. passagem - 4a. passagem	-0.4000	-1.399	0.5992
3a. passagem - 5a. passagem	1.300	0.3008	2.299
3a. passagem - 6a. passagem	1.100	0.1008	2.099
3a. passagem - 7a. passagem	0.6000	-0.3992	1.599
3a. passagem - 8a. passagem	-0.6000	-1.599	0.3992
3a. passagem - 9a. passagem	0.6000	-0.3992	1.599
3a. passagem - 10. passagem	0.9000	-0.09923	1.899
4a. passagem - 5a. passagem	1.700	0.7008	2.699
4a. passagem - 6a. passagem	1.500	0.5008	2.499
4a. passagem - 7a. passagem	1.000	0.0007686	1.999
4a. passagem - 8a. passagem	-0.2000	-1.199	0.7992
4a. passagem - 9a. passagem	1.000	0.0007686	1.999
4a. passagem - 10. passagem	1.300	0.3008	2.299
5a. passagem - 6a. passagem	-0.2000	-1.199	0.7992
5a. passagem - 7a. passagem	-0.7000	-1.699	0.2992
5a. passagem - 8a. passagem	-1.900	-2.899	-0.9008
5a. passagem - 9a. passagem	-0.7000	-1.699	0.2992
5a. passagem - 10. passagem	-0.4000	-1.399	0.5992
6a. passagem - 7a. passagem	-0.5000	-1.499	0.4992
6a. passagem - 8a. passagem	-1.700	-2.699	-0.7008
6a. passagem - 9a. passagem	-0.5000	-1.499	0.4992
6a. passagem - 10. passagem	-0.2000	-1.199	0.7992
7a. passagem - 8a. passagem	-1.200	-2.199	-0.2008
7a. passagem - 9a. passagem	0.000	-0.9992	0.9992
7a. passagem - 10. passagem	0.3000	-0.6992	1.299
8a. passagem - 9a. passagem	1.200	0.2008	2.199
8a. passagem - 10. passagem	1.500	0.5008	2.499
9a. passagem - 10. passagem	0.3000	-0.6992	1.299

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 26.489

The P value is 0.0009.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
=====	=====	=====	=====

2a. passagem	Too few values to test.		
3a. passagem	0.3602	>0.10	Yes
4a. passagem	0.2739	>0.10	Yes
5a. passagem	0.2447	>0.10	Yes
6a. passagem	0.3807	>0.10	Yes
7a. passagem	0.5241	0.0082	No
8a. passagem	0.5241	0.0082	No
9a. passagem	0.3699	>0.10	Yes
10. passagem	0.3807	>0.10	Yes

At least one column failed the normality test with $P < 0.05$. Consider using a nonparametric test or transforming the data (i.e. converting to logarithms or reciprocals).

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	48.488	6.061
Residuals (within columns)	75	36.500	0.4867
Total	83	84.988	

$F = 12.454 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

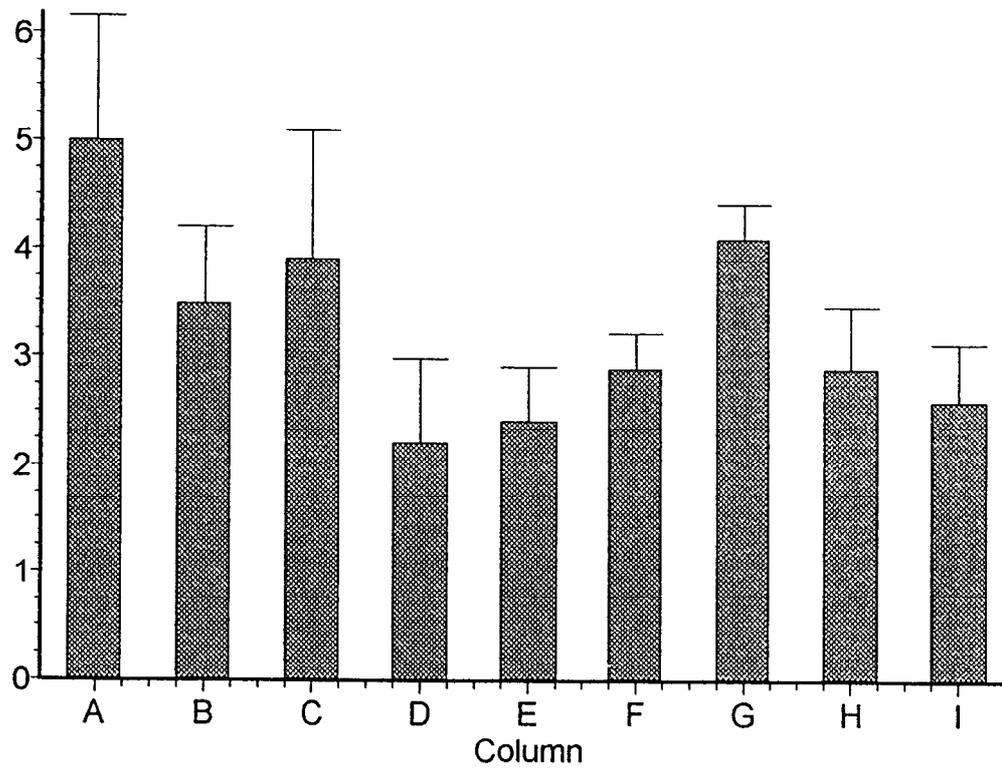
Summary of Data

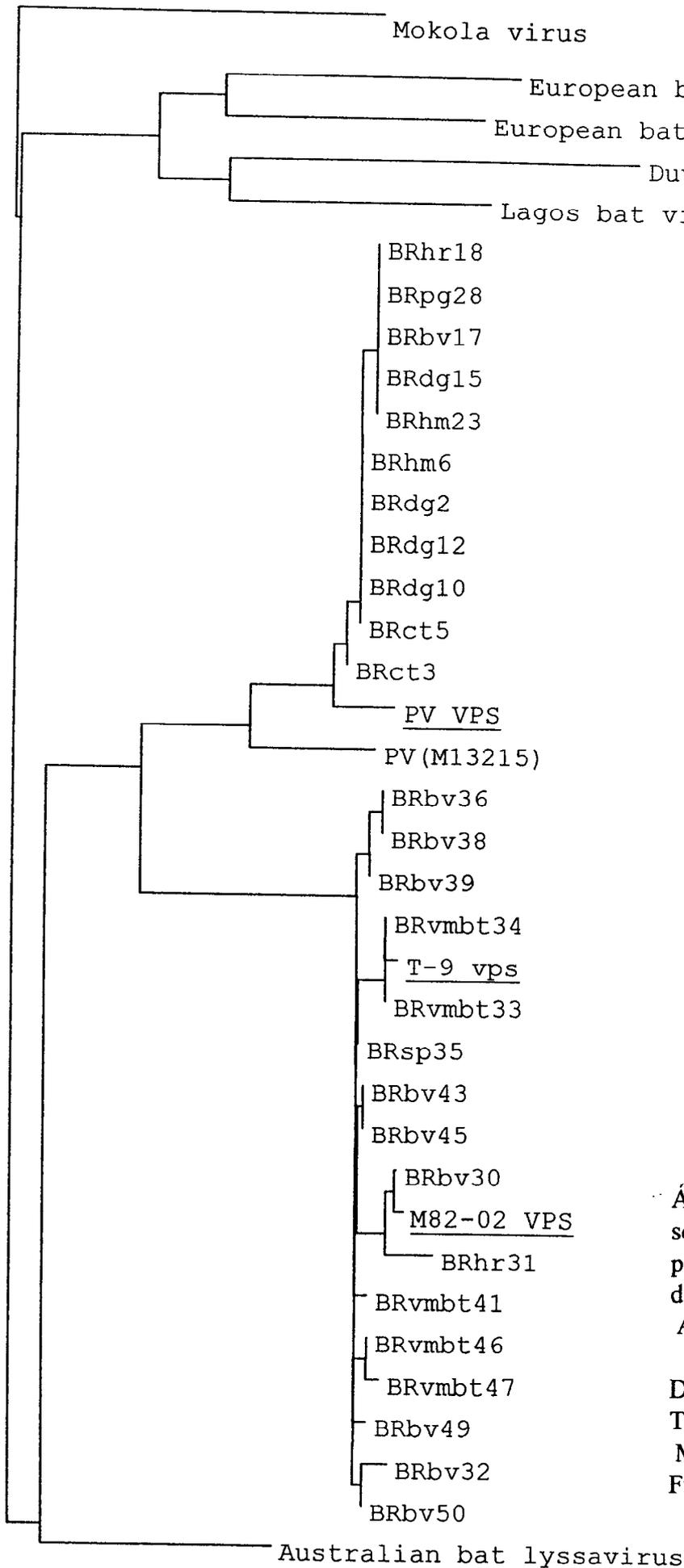
Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
2a. passagem	4	5.000	1.155	0.5774	5.000
3a. passagem	10	3.500	0.7071	0.2236	4.000
4a. passagem	10	3.900	1.197	0.3786	3.500
5a. passagem	10	2.200	0.7888	0.2494	2.000
6a. passagem	10	2.400	0.5164	0.1633	2.000
7a. passagem	10	2.900	0.3162	0.1000	3.000
8a. passagem	10	4.100	0.3162	0.1000	4.000
9a. passagem	10	2.900	0.5676	0.1795	3.000
10. passagem	10	2.600	0.5164	0.1633	3.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
2a. passagem	4.000	6.000	3.163	6.837
3a. passagem	2.000	4.000	2.994	4.006
4a. passagem	3.000	6.000	3.044	4.756
5a. passagem	1.000	3.000	1.636	2.764
6a. passagem	2.000	3.000	2.031	2.769
7a. passagem	2.000	3.000	2.674	3.126
8a. passagem	4.000	5.000	3.874	4.326
9a. passagem	2.000	4.000	2.494	3.306
10. passagem	2.000	3.000	2.231	2.969

* * *

Amostra M82-02, inoculação IC, suspensão a 1:100, período clínico
Mean and Standard Deviation





Árvore filogenética baseada na seqüência de 203 nucleotídeos na posição 108-311., divididos em diferentes grupos: África, Europa, Austrália e Brasil.

Dendrograma enviado pelo Prof. Dr. Takuya Itou, Faculty of Veterinary Medicine - Nihon University, Fujisawa, Kanagawa, Japão. 2003.

Anexo 39

Dendrogram - Continued

- BRhr = Brazilian horse rabies virus isolate
- BRpg = Brazilian pig rabies virus isolate
- BRbv = Brazilian bovine rabies virus isolate
- BRdg = Brazilian dog rabies virus isolate
- BRhm = Brazilian human rabies virus isolate
- BRct = Brazilian cat rabies virus isolate
- BRvmbt = Brazilian vampire bat rabies virus isolate
- BRsp = Brazilian sheep rabies virus isolate
- T-9 VPS = *D. rotundus* virus isolate from Taubaté-SP
- PV-VPS = PV virus maintained at the VPS Department, FMVZ-USP
- M82-02 VPS = a horse rabies virus isolate, from VPS Department, FMVZ-USP
- PV (M13215) = PV virus (GenBank)

Raiva em eqüino

Sinal de
mordedura:
inspeção
à
distância



Raiiva: morcegos vampiros



D. rotundus

D. ecclesiastus