

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**CARLA NASCIMENTO CHICARINO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE ISOLADOS  
DO VÍRUS RÁBICO (*Lyssavirus – Rhabdoviridae*) EM ESPÉCIMES  
CLÍNICOS DE HERBÍVOROS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ  
2009**

**CARLA NASCIMENTO CHICARINO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE ISOLADOS  
DO VÍRUS RÁBICO (*Lyssavirus – Rhabdoviridae*) EM ESPÉCIMES  
CLÍNICOS DE HERBÍVOROS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal, na Área de  
Concentração de Sanidade Animal.

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira**

**COORIENTADORES: Prof. Fernando Portela Câmara  
Prof. Victor Martin Quintana Flores**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES  
2009**

**CARLA NASCIMENTO CHICARINO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO VÍRUS RÁBICO (*Lyssavirus – Rhabdoviridae*) EM ESPÉCIMES CLÍNICOS DE HERBÍVOROS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 28 de agosto de 2009.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr<sup>a</sup>. Juliana Galera Castilho (Doutora, Microbiologia) – USP/IP-SP

---

Prof. Eulogio Carlos Queiróz de Carvalho (Doutor, Anatomia Patológica) – UENF

---

Prof. Victor Martin Quintana Flores (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira (Doutora, Microbiologia) – UENF  
(Orientadora)

**Ao meu filho, Breno, que sempre me incentivou e me deu dicas imprescindíveis para a realização deste trabalho.**

**À minha orientadora, Sílvia Regina, por não me deixar desacreditar da minha capacidade.**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela presença, em todos os momentos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), por disponibilizar o curso de Pós-Graduação, no qual pude concluir o meu trabalho de Doutorado, e pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro aos Projetos na Linha de Pesquisa.

À minha orientadora, Professora Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira, sempre perseverante e compromissada com o estudo da raiva em Campos dos Goytacazes/RJ, facilitando muito a realização deste trabalho. Pelo incentivo, essencial para a nossa conquista, e pelas oportunidades acadêmico-científicas oferecidas durante os anos em que estive sob a sua orientação: muito obrigada!

Ao Instituto Pasteur de São Paulo, onde realizei as técnicas moleculares para o estudo do vírus da raiva. Agradeço à Dr<sup>a</sup>. Ivanete Kotait, Dr<sup>a</sup>. Neide Yumie Takaoka, Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Carrieri, Dr<sup>a</sup>. Juliana Galera Castilho, Dr. Pedro Carnieli Junior, Rafael de Novaes Oliveira, Samira Maria Achkar, Ekaterina Durymanova e Willian de Oliveira Fahl.

À Doutora Juliana Galera Castilho, especialmente agradeço, pelo acompanhamento do meu trabalho de tese, ajuda incondicional, dedicação e grandes ensinamentos transmitidos.

Aos Professores Fernando Portela Câmara e Victor Martin Quintana Flores, pela gentileza e prestimosidade dispensadas na coorientação desta tese.

Ao Centro de Controle de Zoonoses e Vigilância Ambiental “Dr. Arnaldo Rosa Vianna” (CCZ-Campos), nas figuras de seus Diretores, sempre cordiais comigo, pela grande contribuição na colheita de amostras clínicas, empréstimo de equipamentos e utilização de meios de transporte.

Ao Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” (IJV-RJ), nas figuras de sua Diretora, Tatiana Rezende Vieira Pessoa, do então Chefe da Seção de Diagnóstico da Raiva (atual Seção de Virologia), Marlon Vicente da Silva, dos Médicos Veterinários e Técnicos, Beatriz Cristina Pereira dos Santos e Wildeberg Cal Moreira, pela convivência amigável, ensinamentos e permissão para o uso de materiais para o diagnóstico.

À Fundação Norte Fluminense de Desenvolvimento Regional (FUNDENOR), na pessoa do Médico Veterinário Responsável pelo Diagnóstico da Raiva, Eduardo Gonçalves Batista, pela amizade e contribuição no diagnóstico.

Aos amigos e colegas, Luiz Fernando Pereira Vireira, Aline Carvalho Galante e Marcelle Skel Caldeira, pelo trabalho realizado sempre em equipe, no Setor de Virologia e Vírus (SVV), contribuindo enormemente nesta minha jornada.

Aos Médicos Veterinários e Técnicos do Laboratório de Sanidade Animal (LSA), Gina Nunes Teixeira, Lério Gama Sales e Luciana da Silva Lemos, pelo apoio e amizade durante toda a minha pesquisa.

Aos produtores rurais que permitiram as colheitas de amostras para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu filho, Breno, pelo fato de ser o principal motivo pelo qual eu não desanimei, e todo fruto que eu colher pertencerá a ele - um presente dado por Deus.

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

**“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais, para temer menos.”**

**Marie Skłodowska Curie**  
**(7 November 1867 – 4 July 1934)**

## RESUMO

A raiva dos herbívoros é virose enzoótica no Brasil e muitos casos ocorrem no Estado do Rio de Janeiro (RJ). O presente trabalho objetivou estudar a diversidade molecular de isolados do vírus da raiva dos herbívoros do RJ, com base no sequenciamento do gene da nucleoproteína (N). Os isolados do vírus geneticamente analisados foram oriundos de herbívoros domésticos (bovinos, equinos, ovinos) de várias regiões do RJ, entre 2001 e 2006. Foram utilizadas 81 amostras colhidas do SNC de herbívoros, diagnosticadas como positivas para a raiva, por imunofluorescência direta e isolamento viral em camundongo. Todas as amostras foram submetidas à RT-PCR, utilizando-se o par de *primers* 21G/304 para o gene N e produziu um fragmento de 1.478-bp. A partir das 81 amostras, 65 isolados foram positivos na amplificação. Desses, 49 isolados viáveis foram selecionados para o sequenciamento e resultaram em 32 sequências com tamanho de 1.301 nucleotídeos (nt) para a análise filogenética. As 32 sequências isoladas foram alinhadas com sequências homólogas disponíveis no *GenBank*, utilizando-se o método *ClustalW* e software *BioEdit*. O alinhamento foi utilizado para construir uma árvore filogenética baseada na distância *Neighbor-Joining* (NJ) com o modelo evolutivo *kimura-2-parameters*, utilizando-se o software *Mega* 2.1. A confiabilidade da árvore NJ foi avaliada com 1.000 repetições de *bootstrap*. Após edição, utilizando-se o software *Chromas* v.2.24 obteve-se a sequência final de 1.301 nt, localizada entre 110-1.410 nt e correspondente ao gene N do vírus fixo PV (número de acesso no *GenBank* M132151). A topologia da árvore filogenética, construída com amostras do *GenBank*, e os isolados do presente estudo mostraram oito *clusters* distintos: 1 – isolados de herbívoros da região Serrana do RJ; 2 – isolados de herbívoros da região Sul do RJ; 3 – um isolado de equino da região metropolitana do RJ com amostras do *GenBank* de morcegos *Artibeus spp.* do Estado de São Paulo (SP) e de um bovino de Goiás (GO); 4 – exclusivamente amostras do *GenBank* de bovinos do Mato Grosso; 5 – amostras do *GenBank* de *Desmodus rotundus* de SP com isolados de bovinos da região Sul do RJ; 6 – exclusivamente amostras do *GenBank* de bovinos do Tocantins; 7 – amostras do *GenBank* de *D.rotundus* dos Estados de SP e RJ com isolados de equinos da região Serrana, e

de bovinos e um equino da região Norte do RJ; 8 – amostras do *GenBank* de humano e cão de GO, relacionadas com a raiva humana brasileira. Os isolados de bovinos e *D. rotundus* do Norte do RJ mostraram sequências com 100% de identidade de nt *intracluster*. A análise filogenética revelou que há diferentes variantes do vírus da raiva dos herbívoros circulando no RJ. Em algumas regiões, podem circular mais de uma variante viral ao mesmo tempo, mas observou-se que os isolados agregados no mesmo *cluster* estão relacionados com a mesma região geográfica ou adjacente. Observou-se que a distribuição das diversas variantes é delimitada por montanhas. Duas variantes foram isoladas na região Serrana, três variantes foram isoladas na região Sul e na região Norte do Estado do Rio de Janeiro foi isolada uma variante.

Palavras-chave: raiva dos herbívoros, epidemiologia molecular, filogenética de *Lyssavirus*, Estado do Rio de Janeiro.

## ABSTRACT

The herbivore rabies is enzootic virosis in Brazil and many cases occur in Rio de Janeiro State (RJ). The present work aimed to study the molecular diversity of rabies virus isolates from herbivores of RJ, based on sequencing of the nucleoprotein (N) gene. The rabies virus isolates genetically analyzed were original from domestic herbivores (bovines, equines, ovines) from several regions of RJ between years 2001 and 2006. We used 81 harvested samples of the CNS from herbivores diagnosed as rabies positives by direct immunofluorescence and mouse inoculation test. All the samples were submitted to RT-PCR using the 21G/304 pair of primers for the N gene and yielded a 1,478-bp fragment. From 81 samples, 65 isolates were positive by amplification. Of these, 49 isolates viable ones were selected for the sequencing and resulted in 32 sequences with size of 1,301 nucleotides (nt) for the phylogenetic analysis. The 32 isolated sequences were aligned with homologous sequences from GenBank using the ClustalW method and BioEdit software. The alignment was used to build a Neighbor-Joining (NJ) distance-based phylogenetic tree with the kimura-2-parameters model using the Mega 2.1 software. The reliability of the NJ tree was evaluated by analyzing 1,000 bootstrap replicates. After editing, using the Chromas version 2.24 software, the final 1,301 nt sequence located between nt 110-1,410 and corresponding to the N gene of the PV strain (GenBank accession number M132151) was obtained. The topology of the phylogenetic tree built with GenBank samples and the isolates of the present study it showed eight distinct clusters: 1 – isolates of herbivores from Mountainous region of RJ; 2 – isolates of herbivores from Southern region of RJ; 3 – one isolate of equine from Metropolitan region of RJ with GenBank samples of bats *Artibeus spp.* of the São Paulo State (SP) and of one bovine of the Goiás State (GO); 4 – exclusively GenBank samples of bovines coming of the Mato Grosso State. 5 – GenBank samples of *Desmodus rotundus* of SP with studied isolates of bovines from Southern region of RJ; 6 – exclusively GenBank samples of bovines coming of the Tocantins State; 7 – GenBank samples of *D. rotundus* of SP and RJ with studied isolates of equines from Mountainous region and, of bovines and of one equine from Northern region of RJ; 8 – GenBank samples of human and of dog coming of the GO, related with the Brazilian human rabies. The isolates of

bovines and *D. rotundus* in Northern of RJ they showed intracluster nt sequences identity of 100%. Phylogenetic analysis showed that there are several rabies virus variants circulating in herbivores of RJ. In some regions might circulating more than one variant in the same time, but it was observed that the clustered isolates were relationship with the same geographic or adjacent region. It was showed that the distribution of the several viral variants is delimited by mountains. Two variants were isolated in the Mountainous region, three variants were isolated in the Southern region and one variant was isolated in the Northern region of the Rio de Janeiro State.

Key words: herbivore rabies, *Lyssavirus* phylogenetic, molecular epidemiology, Rio de Janeiro State.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama esquemático mostrando a estrutura e a composição do vírus rábico .....33
- Figura 2.** Partículas do vírus rábico, negativamente coradas, vistas pelo microscópio eletrônico de transmissão.....34
- Figura 3.** Diagrama esquemático mostrando a sequência de nucleotídeos do genoma do vírus rábico .....35
- Figura 4.** Diagrama esquemático mostrando o ciclo de replicação e a biossíntese de macromoléculas do vírus rábico .....41
- Figura 5.** Aspectos clínicos da raiva paralítica.bovina .....53
- Figura 6.** Morcego infectado pelo vírus rábico mostrando mudança de hábitos.....56
- Figura 7.** Vítima da raiva humana hospitalizada em contenção .....58
- Figura 8.** Árvore filogenética, para uma região de 1.301 nucleotídeos na posição 110-1.410 do gene N do vírus rábico, mostra 32 sequências isoladas ..... 154
- Figura 9.** Georreferenciamento dos casos de raiva dos herbívoros que ocorreram em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2001 e 2006 ..... 156
- Figura 10.** Árvore filogenética para uma região de 1.301 nucleotídeos na posição 110-1.410 do gene N do vírus rábico, mostra 32 sequências isoladas e alinhadas com sequências homólogas disponíveis no *GenBank* ..... 160
- Figura 1A.** Ficha de Remessa de Material para Diagnóstico de Raiva (Modelo) ...218

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT). .....	130
<b>Quadro 2.</b> Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	131
<b>Quadro 3.</b> Ciclos de temperatura para a reação em cadeia da polimerase (PCR).	132
<b>Quadro 4.</b> Reagentes utilizados na reação de sequenciamento. ....	137
<b>Quadro 5.</b> Reagentes utilizados na reação-controle do sequenciamento. ....	138

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Amostras do sistema nervoso central (SNC) positivas para raiva, pelas técnicas diagnósticas tradicionais, obtidas de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro entre 2001 e 2006 ..... 119
- Tabela 2.** Amostras de vírus rábico disponíveis no *GenBank* para a análise filogenética com número de acesso, localização, espécie e ano do isolamento..... 141
- Tabela 3.** Número de amostras positivas, por ano, para o vírus rábico, pelas técnicas de imunofluorescência direta (DIF) e isolamento viral em camundongo (MIT) ..... 142
- Tabela 4.** Amostras obtidas de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro entre 2001 e 2006 positivas para raiva pelas técnicas de DIF e MIT, e submetidas à técnica de RT-PCR com os *primers* 21G e 304 ..... 144
- Tabela 5.** Número de isolados positivos, por ano, e negativos para o vírus rábico, pela técnica de RT-PCR com os *primers* 21G e 304..... 148
- Tabela 6.** Número de isolados negativos, por ano, e positivos para o vírus rábico pela técnica de RT-PCR, respectivamente, com os *primers* 21G e 304, e com os *primers* 504 e 304 ..... 149
- Tabela 7.** Isolados do vírus rábico de herbívoros do Estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2001 e 2006, sequenciados e analisados filogeneticamente ..... 150
- Tabela 8.** Matriz de identidade dos isolados dos *clusters* 1, 2, 3, 4, o isolado 0963-02 (de equino do município do Rio de Janeiro), e o *Pasteur virus – PV* (M13215), presentes na primeira árvore filogenética ..... 155
- Tabela 9.** Matriz de identidade dos isolados e amostras do *GenBank* dos *clusters* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, presentes na segunda árvore filogenética..... 160
- Tabela 10.** Números de acesso do *GenBank* para os isolados do vírus rábico de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro, entre 2002 e 2006 (*GenBank accession* HM585149-HM585180) ..... 161

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
4.1. Histórico.....	23
4.2. Taxonomia viral.....	27
4.3. Estrutura e composição viral.....	29
4.4. Replicação viral e biossíntese de macromoléculas.....	35
4.5. Instabilidade genômica .....	42
4.6. Propriedades físicas e químicas do vírus .....	43
4.7. Patogenia.....	44
4.8. Patologia.....	49
4.9. Características clínicas .....	51
4.9.1. Em herbívoros .....	51
4.9.2. Em quirópteros .....	54
4.9.3. Em humanos .....	57
4.10. Resposta imune do hospedeiro à infecção viral .....	59
4.11. Diagnóstico .....	61
4.11.1. Diagnóstico clínico.....	61
4.11.2. Diagnóstico laboratorial .....	61
4.11.2.1. Colheita e envio de amostras ao laboratório .....	62
4.11.2.2. Detecção de antígenos virais .....	63
4.11.2.3. Inoculação em camundongo (prova biológica) .....	68
4.11.2.4. Inoculação em culturas de células.....	69
4.11.2.5. Demonstração do corpúsculo de Negri .....	72
4.11.2.6. Técnicas moleculares.....	73
4.11.2.7. Sorologia .....	88
4.12. Epidemiologia .....	89
4.13. Profilaxia e controle .....	99
4.14. Importância para Pecuária e para Saúde Pública.....	105
4.15. Protocolo para tratamento da raiva humana no Brasil .....	109

<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>118</b>
5.1. Amostras obtidas .....	118
5.2. Colheita, acondicionamento e envio das amostras ao laboratório .....	122
5.3. Local e processamento das amostras .....	124
5.4. Imunofluorescência direta .....	125
5.5. Isolamento viral em camundongo .....	126
5.6. Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase .....	127
5.6.1. Extração de RNA total .....	128
5.6.2. Transcrição reversa .....	129
5.6.3. Reação em cadeia da polimerase .....	131
5.6.4. Eletroforese em gel de agarose.....	133
5.6.5. Purificação direta do produto da PCR .....	133
5.6.6. Purificação do produto da PCR a partir do gel .....	134
5.6.7. Quantificação de DNA .....	135
5.7. Sequenciamento de DNA .....	136
5.7.1. Reação de sequenciamento .....	136
5.7.2. Purificação da reação de sequenciamento por <i>Sephadex</i> .....	138
5.8. Análise filogenética .....	139
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>142</b>
6.1. Imunofluorescência direta e Isolamento viral .....	142
6.2. Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase .....	143
6.2.1. <i>Primers</i> 21G e 304 .....	143
6.2.2. <i>Primers</i> 504 e 304 .....	148
6.3. Quantificação do DNA .....	149
6.4. Sequenciamento e análise filogenética.....	150
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>163</b>
7.1. Imunofluorescência direta e isolamento viral .....	163
7.2. Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase .....	167
7.3. Sequenciamento e análise filogenética.....	172
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>187</b>
<b>9. RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>188</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>189</b>
<b>11. APÊNDICE .....</b>	<b>217</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma antropozoonose viral de caráter agudo e fatal que pode afetar todos os “animais de sangue quente”, preferencialmente os mamíferos. Provavelmente, a raiva é a mais antiga das doenças, pois há relatos de doença com mesma sintomatologia desde 2.300 a.C. no Egito e, na Antiga Grécia, por Aristóteles. Acredita-se que Democritus, na Mesopotâmia, foi o primeiro a fazer uma descrição registrada de raiva, em cães, há aproximadamente 500 anos a.C. Ainda hoje, a raiva é uma doença que mata milhões de animais e milhares de humanos, anualmente, em todo o mundo.

No estudo da transmissão do vírus rábico, dois ciclos epidemiológicos podem ser diferenciados e estão inter-relacionados. O primeiro ciclo compreende a raiva silvestre, que mantém-se em carnívoros e morcegos, principalmente na América do Norte, Europa e África. O segundo compreende a raiva urbana, que mantém-se na população canina e felina, ocorrendo na América Latina, África e Ásia. Em toda a América Latina, prevalece ainda um ciclo silvestre envolvendo morcegos e herbívoros domésticos, o ciclo da raiva rural. No Brasil, país onde a raiva é enzoótica, ocorrem todos os ciclos epidemiológicos, prevalecendo o ciclo da raiva rural.

O morcego hematófago da espécie *Desmodus rotundus*, vulgarmente conhecido como “morcego-vampiro-comum”, é o principal reservatório da raiva rural, por isso também chamada “raiva desmodina”, na América Latina. A raiva rural ou desmodina ocasiona grandes perdas à Economia Pecuária e emergente problema para a Saúde Pública em face dos seres humanos vitimados. Segundo Málaga Alba (1954), do México à Argentina, os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* são os reservatórios mais importantes do vírus rábico. Contudo, sabe-se, desde a década de 60, que morcegos não-hematófagos, (insetívoros, frugívoros, ictiófagos e outros) são também importantes reservatórios naturais do vírus. O vírus rábico também pode ser transmitido ao homem e a outros animais por meio de secreções de morcegos não-hematófagos, sem uma mordida direta, presumivelmente, pela inalação de aerossóis contaminados.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente são notificados óbitos por raiva em milhares de seres humanos e em milhões de animais, confirmados laboratorialmente. Todavia, o total mundial de mortes deve ser várias vezes maior, pois sabe-se que a raiva é ainda subnotificada. No Brasil, estima-se que para cada caso de raiva notificado, dez outros não o são. Na América Latina, os prejuízos causados pela raiva são estimados na ordem de 30 milhões de dólares por ano. No Brasil, os prejuízos diretos causados pela raiva dos herbívoros estão na ordem de 15 milhões de dólares por ano, com a morte de cerca de 40 mil cabeças de gado, e os prejuízos indiretos estão na ordem de 22,5 milhões de dólares por ano.

No Estado do Rio de Janeiro, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) relatou no quinquênio 1990 a 1994, o diagnóstico positivo (clínico e laboratorial) de 648 herbívoros, a grande maioria constituída por bovinos. Especificamente no Norte e Noroeste Fluminense, Sales (1997), nos anos de 1995 e 1996, realizou um estudo sobre a epidemiologia e o diagnóstico diferencial da raiva em bovinos, no qual 57 casos de doença com sintomatologia neuromuscular foram verificados e, dos quais, 46 (80,7%) foram laboratorialmente diagnosticados como positivos para a raiva. Outrossim, deve-se considerar a subnotificação de casos que amplia a preocupação com esta antropozoonose viral, tanto para a Saúde Pública quanto para a Economia Pecuária. Tal preocupação agrava-se pelo fato de muitos tratadores de herbívoros domésticos manipularem os mesmos sem proteção pessoal, sem conhecimento da possibilidade de contaminação e ainda sem acreditar que a raiva possa matá-los em face do contato direto com um animal potencialmente infectado pelo vírus.

No que concerne à Saúde Pública, o Ministério da Saúde (MS) contabilizou, entre os anos de 1994 e 1995, um total de 51 óbitos humanos causados pela raiva, transmitida por diferentes vetores e nas diversas regiões do país. A região Nordeste apresentou maior número de casos, seguida pela Sudeste, Norte e Centro-Oeste. No ano de 1996, 1.058 casos de raiva canina e 25 casos de raiva humana foram registrados no Brasil. Entre os anos de 1997 e 2006, houve marcada redução no número de casos de raiva urbana em cães e em humanos, estes últimos infelizmente compensados por um aumento no número de casos humanos,

associados a contatos com morcegos hematófagos no triênio 2004-2006. No ano de 2006, o Brasil teve um Médico Veterinário, do Estado de Minas Gerais, incluído na estatística de óbitos humanos pela raiva. Neste último caso, o profissional manipulou um herbívoro infectado pelo vírus rábico, sem ter feito o tratamento profilático pré-exposição, que é realizado com a vacinação antirrábica e justamente indicado para pessoas que sofrem alto risco de exposição ao vírus.

A melhor forma de prevenção da raiva é a vacinação, pré-exposição dos animais e pós-exposição dos humanos, exceto para as pessoas que trabalham com risco de infecção constante, as quais devem receber vacinação pré-exposição. Apesar de haver vacinas antirrábicas seguras para animais e humanos, muitas pessoas ainda morrem de raiva no mundo, cerca de 55 mil pessoas por ano, principalmente nos países asiáticos e africanos. Estima-se que 500 mil pessoas recebem tratamento profilático pós-exposição, o qual inclui a vacina e o soro antirrábico. Além do uso de vacina e/ou soro antirrábico, para o controle da raiva humana, deve-se realizar o controle populacional de cães e gatos “errantes”, bem como manter campanhas de vacinação eficientes para estes animais. Animais silvestres, como morcegos, quando infectados pelo vírus rábico consistem em grande e incontrolável problema para a Saúde Pública e para a Pecuária, pois até o momento, em países como o Brasil, somente é possível realizar um controle efetivo da raiva por meio da vacinação, nos animais domésticos.

Atualmente, o diagnóstico virológico da raiva é oficialmente realizado por meio das técnicas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos (prova biológica), sendo empregadas com relativo sucesso. Entretanto, estes métodos também apresentam limitações, por exemplo, podem ocorrer falhas no diagnóstico, com resultados falso-negativos, quando as amostras encontram-se parcialmente deterioradas. Além disso, mediante tais métodos diagnósticos, não se pode diferenciar as variantes do vírus rábico. Portanto, a utilização das técnicas de diagnóstico molecular torna-se necessária e crescente, especialmente em nível de Pesquisa Científica para o estudo aprofundado do vírus rábico. A complementação da rotina de diagnóstico da raiva, de forma que permita a detecção viral mesmo em amostras mal conservadas e a diferenciação entre as

variantes virais, além de constituir um avanço para o estudo do vírus, tem sido incentivada e cada vez mais praticada.

As técnicas de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e sequenciamento do material genético permitem o diagnóstico da raiva pela amplificação de parte do genoma viral e informação de sua sequência de bases nitrogenadas. Sabe-se que os estudos de caracterização molecular de isolados do vírus rábico são fundamentais para se conhecer as variantes virais que circulam nas diferentes regiões geopolíticas e entre as diferentes espécies hospedeiras. Conhecimento que cresce em importância diante dos emergentes problemas como, por exemplo, as falhas vacinais frente às amostras virais “de campo” que já foram demonstradas em pesquisas realizadas no país.

Portanto, pode-se comprovar a necessidade dos estudos moleculares de isolados do vírus rábico de diferentes hospedeiros em regiões distintas, a fim de classificá-los filogeneticamente, de acordo com as espécies hospedeiras e permitir correlações com as regiões de origem. O fato de a raiva no Brasil ser bastante complexa e apresentar sobreposições dos ciclos urbano e silvestre, em muitas regiões geopolíticas, corrobora a necessidade de estudos moleculares, filogenéticos e geoepidemiológicos.

## **2. OBJETIVOS**

**2.1.** Estudar a diversidade molecular de isolados do vírus rábico provenientes de herbívoros e que atualmente circulam no Estado do Rio de Janeiro, com base no sequenciamento do gene codificador da nucleoproteína N;

**2.2.** Comparar os resultados do estudo filogenético dos isolados do vírus rábico obtidos, com os resultados de pesquisas anteriores, semelhantes e realizadas em outras regiões do país;

**2.3.** Prestar serviço e oferecer suporte técnico, respectivamente, às comunidades rurais afetadas e aos profissionais atuantes na Defesa Sanitária Animal, para prevenção e controle da raiva dos herbívoros no Estado do Rio de Janeiro.

### 3. JUSTIFICATIVA

No Estado do Rio de Janeiro, a raiva dos herbívoros, principalmente a raiva bovina, é motivo de grandes prejuízos econômicos e riscos à Saúde Pública. Na Pecuária bovina, estima-se que as perdas diretas ocasionadas pelo óbito de milhares de cabeças ao ano, quando somadas às perdas indiretas pela queda na produção da carne e do leite, e pela desvalorização da pele (couro) por mordeduras de morcegos, consistem em prejuízo significativo que merece ser reparado (BRASIL, 2005; KOTAIT et al., 1998; ACHA e SZYFRES, 1986).

A raiva dos herbívoros é enzoótica e conhecida em todo território nacional e, no Estado do Rio de Janeiro, nas últimas décadas, tem ocorrido sob a forma de surtos. O subenvio de amostras clínicas, obtidas de herbívoros suspeitos de raiva, ou o envio das amostras já em estado de decomposição ao laboratório de referência para o diagnóstico, constituem verdadeiros complicadores para a notificação real dos casos de raiva. O subenvio de amostras leva à subnotificação da virose, e o envio de amostras mal conservadas leva ao diagnóstico falso-negativo para a presença do vírus. Fatos que tornam os dados insuficientes e duvidosos para levantamentos epidemiológicos da raiva dos herbívoros em nosso Estado, assim como em todo o país (BRASIL, 2005; KOTAIT et al., 1998).

Quando o espécime a ser examinado apresenta-se mal conservado e, em muitos casos, já deteriorado, para caracterizar molecularmente os isolados virais de casos positivos ou para confirmar resultados negativos pela imunofluorescência direta (método padrão e oficialmente usado), a reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* - PCR) precedida pela transcrição reversa (*reverse transcription* – RT) pode ser utilizada com sucesso (SIEGEL, 2007).

No Estado Rio de Janeiro, ainda não há suficiente conscientização dos produtores e trabalhadores rurais sobre a importância do envio de material suspeito para o diagnóstico laboratorial, tampouco sobre a vacinação como a melhor forma de prevenção e controle da raiva. Fato que se deve à falta de informação e ao pequeno número de casos adequadamente diagnosticados. Em face desta situação, há contínua circulação de vírus rábico, pela atuação do seu principal transmissor, o

morcego hematófago *Desmodus rotundus*, junto aos indivíduos susceptíveis sem vacinação, notadamente os herbívoros domésticos e, ocasionalmente, os seres humanos.

São raros os estudos sobre as características genéticas dos isolados de vírus rábico presentes no ciclo da raiva rural, estabelecido em nosso Estado, entre os morcegos *D. rotundus* e os herbívoros domésticos. No presente trabalho, a obtenção de dados derivados de sequenciamento genômico permitirá um melhor entendimento da diversidade molecular dos isolados de vírus rábico circulantes nas regiões estudadas. Este representará um passo fundamental para a geração de informações em nível molecular e filogenético do vírus na raiva rural, principalmente, determinando relações geográfico-filogenéticas entre o vírus e os herbívoros no Estado do Rio de Janeiro.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Histórico

A palavra raiva vem de “*rabbans*” do sânscrito que significa “agir com violência”, remontando ao século 30 a.C., enquanto os gregos a chamavam de *Lisa* ou *Lita* que significa loucura (STEELE e FERNANDEZ, 1991).

Provavelmente, a raiva é a mais antiga das doenças, sendo conhecida desde os primórdios da civilização. Acredita-se ter sido Democritus na Mesopotâmia o primeiro a fazer uma descrição registrada de raiva, em cães, há aproximadamente 500 anos a.C. Além disso, na mesma época, a doença era atribuída inicialmente aos deuses, sendo reconhecida como uma influência maligna (STEELE e FERNANDEZ, 1991).

A raiva era considerada por povos Assírios, Egípcios e Caldeus como uma doença de origem religiosa, enquanto os Chineses e Hindus acreditavam que o desequilíbrio entre os quatro elementos que constituíam o corpo humano favorecia o aparecimento da doença (BARATA, 1985).

Na Mesopotâmia, há cerca de 2300 a.C, determinava-se o seguinte: “Se um cão é louco e as autoridades tomam conhecimento do fato e de seu dono; se ele não o prende e o cão morde um homem e causa a sua morte, seu dono deve pagar 2/3 de uma mina (40 shekels) de prata. Se o cão morde um escravo e causa a sua morte, o dono do cão deve pagar 15 shekels de prata” (DE MATTOS et al., 2001).

A primeira descrição da raiva canina foi feita por Democritus nos anos 500 a.C. Aristóteles, no século IV a.C., descreveu no livro História Natural dos Animais que “cães que sofrem de loucura tornam-se muito irritáveis, e todos os animais mordidos por eles adquirem a enfermidade” (STEELE e FERNANDEZ, 1991).

Muitas civilizações antigas foram bastante familiares da raiva, e a associação entre a doença e o cão já era conhecida no antigo Egito, onde o deus *Sirius* era imaginado na forma de um cão furioso. Na Ilíada (700 a.C.), Hector foi comparado a um cão raivoso, chamado de “cão mau”. Escolas chinesas advertiam

sobre o perigo de cães raivosos em 500 a.C. Aristóteles (400 a.C.) associou a doença aos animais, mas erroneamente excluiu os humanos de contraírem a raiva de cães. Em Roma, Cordamus supôs que o veneno (i.e. o vírus) estava presente na saliva, e Celsus descreveu os aspectos clínicos da doença. Durante anos, acreditou-se que a ingestão de uma variedade de substâncias e o uso de talismãs sagrados poderiam curar um doente de raiva (DE MATTOS et al., 2001).

Ao final da Idade Média e início da Renascença, as crenças e superstições sobre a raiva deram espaço aos estudos e experimentações. Em 1546, Fracastoro, um médico italiano, escreveu um tratado “A Ferida Incurável”, detalhando a clínica da doença, inclusive com relato de caso clínico humano (DE MATTOS et al., 2001).

O primeiro grande surto de raiva se deu por volta do século XI na Francônia, atual Baviera, região sul da Alemanha, quando 30 pessoas morreram após serem mordidas por lobos raivosos. No ano de 1500, um novo surto acometeu a Espanha e, a partir de 1700, a raiva já estava disseminada por toda a Europa (STEELE e FERNANDEZ, 1991).

A primeira citação de raiva nas Américas, datada de 1709, no México, foi feita pelo Frei José Ramirez, e sugeria que a doença fora introduzida no continente pelos colonizadores, por meio de seus cães de caça infectados. No entanto, há relatos de que, quando os primeiros colonizadores chegaram, muitos soldados morreram vítimas de mordeduras de morcegos hematófagos presentes em grandes colônias no continente americano (SCHLÖGEL, 1985).

No Velho Mundo, a raiva é conhecida há milhares de anos, mas, nas Américas, é difícil precisar se já havia o vírus antes da chegada dos europeus. É possível que já ocorresse a enfermidade antes da chegada de Colombo, pois, logo após a colonização, o Bispo Petrus Martyr-Anglerius escreveu sobre morcegos que, com suas mordidas venenosas, levavam à morte os homens atacados por estes. Contudo, somente 200 anos após a invasão espanhola, casos de raiva foram relatados nas Américas. No México, em 1709, houve relatos de casos; e, na América do Norte, em 1753, a raiva foi descrita em cães e mais tarde em raposas (DE MATTOS et al., 2001).

George Zinke (1804) demonstrou a infecciosidade da saliva de cães raivosos ao pincelar a saliva infectada em incisões feitas no cão hígido e, assim, comprovou a

transmissão da doença. No oitavo dia após a inoculação, surgiram os primeiros sinais clínicos. Gruner e Salm (1913) demonstraram a infecciosidade da saliva dos herbívoros. Em 1879, a transmissão da raiva de cães para coelhos e entre coelhos foi demonstrada por Victor Galtier (PEARCE, 2002).

Em 1881, o Químico francês Louis Pasteur (1822-1895) iniciou seus trabalhos com a raiva e determinou que a inoculação de tecido nervoso de animais raivosos, diretamente no cérebro de animais experimentais, reduzia o período de incubação para uma ou duas semanas. Entre 1882 e 1888, Pasteur caracterizou definitivamente vários aspectos da doença. Em 1884, com a colaboração de Chamberland e Roux, indicou a presença do vírus no sangue (PEARCE, 2002). No mesmo ano, adaptou um "vírus de rua" (cepa de vírus selvagem, agente causal de infecção natural) e presumiu que o vírus atenuado ou inativado poderia ser usado para imunização sem causar a doença (KOPROWSKI, 1996). Em 1885, após imunizações bem sucedidas em cães, ocorreu a obtenção do vírus "fixo" e a primeira vacina humana. No mesmo ano, Pasteur preparou e utilizou a primeira vacina contra a raiva em uma criança, Joseph Meister de Alsace, na França. O paciente fora mordido por um cão raivoso e, após dois dias, recebeu doses compostas de fragmentos de medula de coelho, durante dez dias, e sobreviveu sem apresentar a doença (PEARCE, 2002).

Apesar de todo o avanço no estudo da doença, a única forma de diagnóstico era a inoculação do material suspeito em animais de experimentação, até que, em 1903, a natureza ultrafiltrável do agente foi demonstrada por Remlinger e Riffat-Bay (MURPHY, 1999). No mesmo ano, Negri descreveu os corpúsculos de inclusão presentes no citoplasma das células nervosas e demonstrou o neurotropismo do vírus. A partir daí, a técnica para a sua detecção foi introduzida e aprimorada na rotina de diagnóstico laboratorial da raiva e, por mais de 50 anos, tal técnica permaneceu como a única forma efetiva de diagnóstico laboratorial. A detecção do corpúsculo de Negri confirmou um caso de raiva e este corpúsculo apresentou-se como uma inclusão citoplasmática patognomônica, porém, sua ausência não exclui totalmente a possibilidade do vírus estar presente (KING e TURNER, 1993; ATANASIU, 1975).

Antonio Carini, Médico italiano que dirigiu o Instituto Pasteur de São Paulo, de 1906 a 1914, desempenhou papel fundamental no conhecimento sobre a doença, ao demonstrar que esta podia ser transmitida pelo morcego hematófago para animais herbívoros domésticos. A hipótese da transmissão do vírus rábico pelo morcego foi levantada pela primeira vez por Carini (1911), ao estudar uma epizootia em Santa Catarina, e foi confirmada por Haupt e Rehaag, em 1916. Durante o surto ocorrido na Ilha de Santa Catarina (1911), Carini observou corpúsculos de inclusão de Negri em neurônios de bovinos mordidos por morcegos hematófagos, quando se estabeleceu a definitiva relação entre a mordedura do morcego hematófago e a ocorrência da raiva bovina e equina. No período de 1914 a 1916, ocorreu, em Blumenau (Santa Catarina), uma epizootia aguda da doença que foi estudada por Haupt e Rehaag, quando confirmaram a hipótese de Carini, por meio do isolamento do vírus rábico de material nervoso do morcego *Phyllostoma superciliatum* (atualmente classificado como *Artibeus lituratus*) que estava mordendo uma novilha em um estábulo. Sylvio Torres e Queiroz Lima (1934) estudaram a transmissibilidade da raiva aos herbívoros pelos morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudatta*), que foi confirmada por Pawan, com a relevância de também ser transmitida aos humanos. Em 1930, Hurst e Pawan, na Ilha de Trinidad, estudaram casos de raiva humana transmitidos por morcegos. O vírus rábico foi isolado pela primeira vez em morcegos insetívoros por Pawan (1936), em Trinidad, onde, no período de 1925 a 1936, foram registrados 89 óbitos humanos pela doença. (ACHA, 1967; PAWAN, 1936; HAUPT e REHAAG, 1925; CARINI, 1911).

O diagnóstico laboratorial da raiva avançou, quando Webster e Dawson, em 1935, introduziram a inoculação intracerebral, a prova biológica, em camundongos adultos e lactentes, para o isolamento de vírus rábico (RUDD et al., 1980). Contudo, após a implantação da técnica de imunofluorescência direta por Goldwasser e Kissling, em 1958, o número de casos falso-negativos sofreu uma redução drástica. Também foi possível a detecção de antígeno viral em glândulas salivares e outros tecidos (GOLDWASSER e KISSLING, 1959).

## 4.2. Taxonomia viral

O vírus da raiva ou vírus rábico está classificado na ordem *Mononegavirales*, na família *Rhabdoviridae* e no gênero *Lyssavirus*, de acordo com o ICTV (2008). Na família *Rhabdoviridae*, os gêneros *Ephemerovirus*, *Lyssavirus* e *Vesiculovirus* infectam mamíferos e englobam vírus com ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, polaridade negativa, e possuem natureza proteica complexa, o que os torna bons indutores de imunidade, quando comparados a outros vírus (ICTV, 2008; FAUQUET et al., 2005; WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001; KING e TURNER, 1993).

No gênero *Lyssavirus* (do Grego *lyssa* ou *lytta*: fúria), além do vírus rábico, estão classificados vários agentes sorologicamente relacionados e, a partir do emprego de anticorpos monoclonais (Mabs), foram reconhecidos distintos sorotipos do vírus rábico. Em 1994, os especialistas da raiva, reunidos em Niagara Falls, EUA, propuseram a denominação de "genótipos" em substituição à "sorotipos", até então utilizada para designar os diferentes membros do gênero *Lyssavirus*, com base em suas características sorológicas e na sequência do genoma do nucleocapsídeo. Embora 34 genótipos já tenham sido catalogados no gênero *Lyssavirus*, oficialmente, apenas 11 genótipos são reconhecidos neste gênero (ICTV, 2008).

Técnicas sorológicas com uso de Mabs e análises moleculares dos membros do gênero *Lyssavirus* permitiram a descrição, a seguir, dos 11 genótipos oficialmente considerados até o momento. Genótipo 1, cuja cepa protótipo é a *Rabies virus* (RABV – vírus clássico da raiva) distribuída mundialmente, na qual estão incluídas a *Challenge virus standard* (CVS), cepas isoladas de campo, de carnívoros, de morcegos insetívoros, frugívoros e hematófagos, e cepas de laboratório de diferentes países. Genótipo 2, cepa protótipo *Lagos bat virus* (LBV), isolada em 1956, de cérebros de morcegos frugívoros em Lagos, na Nigéria (África), mas também isolados de morcegos insetívoros. Genótipo 3, cepa protótipo *Mokola virus* (MOKV), isolada em 1968, de musaranhos, também na Nigéria e, posteriormente, do homem e de animais domésticos, principalmente gatos, em vários países africanos. Genótipo 4, cepa protótipo *Duvenhage virus* (DUVV), isolada em 1970, na África do Sul, infectando o homem e morcegos insetívoros, e também cepas isoladas de mosquitos e de cavalos, no Sudão e na Nigéria. Genótipo 5, cepa

*European bat lyssavirus 1* (EBLV-1), isolada em 1985, de um homem mordido por um morcego insetívoro *Eptesicus serotinus*, iniciando uma ampla investigação. Genótipo 6, cepa *European bat lyssavirus 2* (EBLV-2), isolada também 1985, de um Zoólogo suíço mordido por um morcego insetívoro *Myotis dasycneme*. Genótipo 7, cepa *Australian bat lyssavirus* (ABLV), que infecta os morcegos frugívoros e insetívoros, isolada em 1996, inicialmente de morcegos frugívoros *Pteropus spp.* e, de dois homens que entraram em contato com os morcegos e morreram na Austrália (ICTV, 2008; BRASIL, 2005; WHO, 2004; WUNNER, 2002; BADRANE e TORDO, 2001).

Recentemente, foram incorporados quatro genótipos ao gênero *Lyssavirus*, todos isolados de morcegos, na Ásia Central, Leste da Sibéria e região Caucasiana, são eles: *Aravan virus* (ARAV), *Khujand virus* (KHUV), *Irkut virus* (IRKV) e *West Caucasian bat virus* (WCBV). ARAV apresenta características filogenéticas mais próximas às dos genótipos 5 e 6 (EBLV-1 e EBLV-2) (ICTV, 2008).

Por tratar-se de um vírus muito estável antígenicamente, a identificação das chamadas “variantes” antigênicas e genotípicas do *Lyssavirus* tem concentrado a atenção de muitos pesquisadores. Os quatro primeiros genótipos (1, 2, 3 e 4) podem ser diferenciados por técnicas de soroneutralização viral (VN) e reações com Mabs. Estudos sobre a sequência de nucleotídeos dos genes N e G de numerosos isolamentos de *Lyssavirus* mostram diferenças entre os diversos genótipos, com uma média de substituição de nucleotídeos entre 30 a 35%. A identificação de variantes do genótipo 1 são diferenciadas por reações com Mabs, tipificação antigênica e sequenciamento genético. Os genótipos 5, 6 e 7, isolados de morcegos não-hematófagos, são descritos como *Lyssavirus* (BRASIL, 2005; WHO, 2004; WUNNER, 2002; BADRANE e TORDO, 2001).

No Brasil, embora os principais transmissores da raiva sejam os morcegos hematófagos, o papel de outras espécies de morcegos (insetívoras e frugívoras) merecem atenção especial, pois o vírus tem sido isolado de 41 espécies. O estudo de Castilho et al. (2008) descreveu o primeiro isolamento do vírus da raiva em morcego insetívoro *Eumops perotis*, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. A análise filogenética mostrou que o vírus isolado agrupou-se no mesmo *cluster* dos vírus isolados de morcegos insetívoros *Nyctinomops spp.* (CASTILHO et al., 2008).

### 4.3. Estrutura e composição viral

O vírus rábico possui genoma constituído de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, polaridade negativa não segmentada e envelope glicoproteico com projeções espiculares. A partícula viral completa (*virion*) é cilíndrica, com uma de suas extremidades arredondada ou cônica, e outra plana ou convexa, em forma de “bala de revólver”. A camada mais externa consiste nas projeções de superfície, seguida pelo envelope. Internamente, encontra-se a ribonucleoproteína (RNP), constituída por proteína N, proteína P e o RNA viral, formando o capsídeo helicoidal. O *virion* possui em média 180 nm (130-200 nm) de comprimento, incluindo as projeções de superfície e 75 nm (60-110 nm) de diâmetro, sem incluir as projeções de superfície. A simetria cilíndrica do *virion* é formada por um nucleocapsídeo helicoidal que mede aproximadamente 165 x 50 nm e possui 30 a 35 espirais que dão a simetria à partícula viral. O envelope viral apresenta espessura de 7,5 a 10 nm, envolve o nucleocapsídeo, onde se inserem as moléculas de glicoproteína, formando as espículas de 6 a 10 nm que se projetam além da superfície do vírus (ICTV, 2008; WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001; SMITH, 1996; GOSZTONYI, 1994; KING e TURNER, 1993).

O *virion* é composto uma membrana externa (envelope viral) derivada da célula infectada e por cinco proteínas, denominadas nucleoproteína (N), fosfoproteína (P, NS ou M1), proteína de matriz (M ou M2), glicoproteína (G) e a proteína RNA polimerase RNA dependente ou *large* (L) (ICTV, 2008; WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001).

O nucleocapsídeo é composto pelo genoma viral e pelas proteínas N, L e P. O RNA possui entre 11 e 12 Kb de tamanho e é altamente compactado, com o auxílio da proteína N, formando uma estrutura helicoidal com aproximadamente 35 voltas. Associadas à nucleoproteína estão as proteínas L e P, que juntas formam a RNA polimerase RNA dependente. As proteínas L e P estão em número aproximado de 50 e 500 por *virion*, respectivamente (ICTV, 2008; WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001).

A proteína N promove o empacotamento do genoma e produz um cerne resistente a RNase. Cada proteína N participa do empacotamento de aproximadamente nove nucleotídeos, totalizando cerca de 1.200 proteínas N no *virion*. O complexo N–RNA interage com o complexo polimerase P–L durante a transcrição e a replicação; e com a proteína M, na condensação do nucleocapsídeo, na união do cerne com a membrana e no brotamento (ICTV, 2008; WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001).

A proteína P possui diferentes locais com domínios para a fosforilação, os quais têm a função de regular a transcrição e a replicação. A proteína P forma trímeros após a fosforilação e, dessa forma, torna-se apta a unir-se à proteína L e ao complexo N–RNA. Portanto, o complexo polimerase completo é o seguinte: N-L-P<sub>3</sub>-RNA. A fosforilação em pontos diferentes da proteína P pode estar relacionada à formação de dois complexos polimerase distintos: um que funciona como transcriptase e outro, como replicase. A proteína P não possui nenhuma atividade enzimática conhecida, mas funciona como cofator que pode modificar o funcionamento da proteína L (ICTV, 2008; WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001).

A proteína L, além de formar junto com a proteína P o complexo polimerase que faz a transcrição do genoma viral em RNAm e a replicação do genoma no sentido positivo (antigenoma) e negativo (genoma), promove a adição da estrutura quepe (*cap*) no RNAm, metilação das estruturas *cap* e poliadenilação. O grande tamanho da proteína L, a maior proteína do *virion*, é justificado pela complexidade das reações que catalisa e a multifuncionalidade que ela apresenta (ICTV, 2008; WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001).

A proteína M, a menor e a mais abundante proteína do *virion*, participa de numerosas funções, tais como, a condensação do nucleocapsídeo durante a montagem, a união do envelope ao nucleocapsídeo, a degradação do citoesqueleto e a inibição de funções da célula hospedeira. A proteína M, expressa sozinha na célula, é capaz de causar brotamento de vesículas, o que permite supor que seja importante no processo de brotamento viral (ICTV, 2008; WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001).

No envelope viral, estão as proteínas G, que possuem glicosilações na sua estrutura de 505 aminoácidos. Possuem três domínios: o C-terminal citoplasmático,

com 44 resíduos de aminoácidos; o domínio transmembrana hidrofóbico com 22 aminoácidos; e o domínio externo antigênico que se estende do domínio transmembrana ao resíduo N-terminal. A proteína G é responsável pela adsorção do vírus à célula hospedeira, auxilia o desnudamento viral, catalisa a fusão da membrana endocítica e é o principal antígeno viral. Portanto, quase todas as vacinas, humanas e veterinárias, são produzidas com base nas reações imunológicas contra essa proteína (ROSE e WHITT, 2001; DE MATTOS et al., 2001).

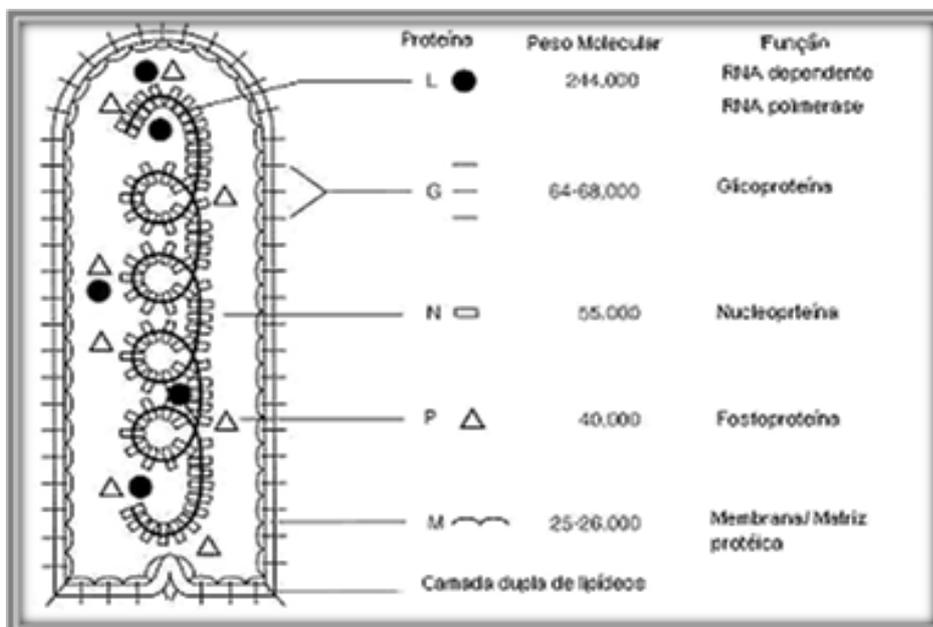
Vários detergentes têm sido usados para a obtenção da glicoproteína em diferentes formas. O uso do clássico Triton X-100, seguido da adição de n-octil glicosídeo, produz monômeros que se agregam após a remoção do segundo detergente, formando rosetas de formas e tamanhos variáveis. Por meio da combinação das técnicas de microscopia eletrônica e da análise de sedimentação da proteína G solubilizada com o detergente zwitteriônico CHAPS, determinou-se que a forma nativa da espícula na superfície do vírus corresponde a um trímero (WUNNER, 2002; ROSE e WHITT, 2001; DE MATTOS et al., 2001).

A proteína N é a segunda mais estudada e funciona como principal antígeno para as células T auxiliares, que reagem cruzadamente com todos os sorotipos do vírus rábico. As proteínas N e P, no complexo que forma a RNP, estão intimamente associadas e parecem obedecer à proporção de 2:1, não se conhecendo a natureza das interações entre essas proteínas no complexo RNP ativo. A proteína M, a menor proteína estrutural, ainda tem as propriedades imunológicas e biológicas pouco conhecidas. A proteína M do vírus rábico é a que apresenta a menor similaridade na sequência de aminoácidos, embora haja grande homologia estrutural. O envelope viral possui uma estrutura lipídica de camada dupla, composta por fosfolipídios, lipídios neutros e glicolipídios, em proporções que variam de acordo com o tipo celular utilizado para a replicação viral. Os fosfolipídios são os mais abundantes e correspondem a 42-66% do total, com destaque para fosfatidiletanolamina (35,1%), esfingomiéline (31,3%) e fosfatidilcolina (23,4%) e, em menores proporções, o fosfatidilinositol (0,25%), o ácido lisobifosfatídico (0,2%), e somente traços de ácido fosfatídico. É possível que o vírus rábico não utilize membranas celulares pré-formadas, e outras evidências sugerem que o vírus adquira a membrana no interior

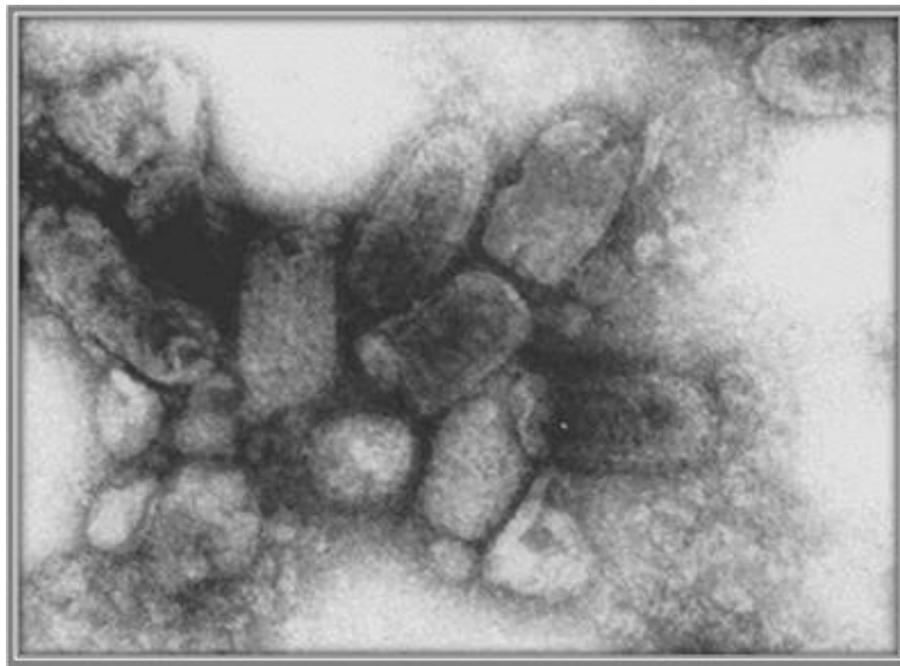
da célula. A observação de membranas com multicamadas no interior de inclusões citoplasmáticas de células reforça essas hipóteses (WUNNER, 2001; DE MATTOS et al., 2001; ROSE e WHITT, 2001).

Embora a glicoproteína G seja imunodominante, a proteína N também é capaz de induzir anticorpos neutralizantes, sendo a mais conservada dentre as proteínas dos *Lyssavirus*. A proteína N é um polipeptídeo longo com 450 aminoácidos, peso molecular de 50.500 Da, sendo fosforilada no resíduo de serina na posição 389 e situa-se no interior do cilindro helicoidal do nucleocapsídeo. A proteína N forma o capsídeo e está intimamente associada ao RNA viral, protegendo-o da ação de ribonucleases. Possui grande importância estrutural na encapsidação do RNA genômico, além de estar envolvida nas etapas de transcrição e replicação, já que estas etapas não iniciam sem que uma quantidade suficiente de proteína N esteja unida ao RNA genômico. A proteína N participa ativamente no transporte axoplásmico intraneuronal e, além disso, apresenta regiões que são importantes epitopos para o reconhecimento de linfócitos T. Pelo fato de a nucleoproteína ser uma região gênica muito conservada, esta facilita o desenho de iniciadores (*primers*) hábeis na amplificação de inúmeras variantes virais (WUNNER, 2002, 1991; CREPIN et al., 1998; TORDO e POCH, 1988; TORDO et al., 1986).

Os componentes do *virion* do vírus rábico são mostrados em um diagrama esquemático na Figura 1 e em uma micrografia eletrônica na Figura 2.



**Figura 1.** Diagrama esquemático mostrando a estrutura e a composição do vírus rábico (adaptado de Rupprecht, E.C. **Rhabdoviruses: Rabies Virus**, 2009; <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch061.htm>).

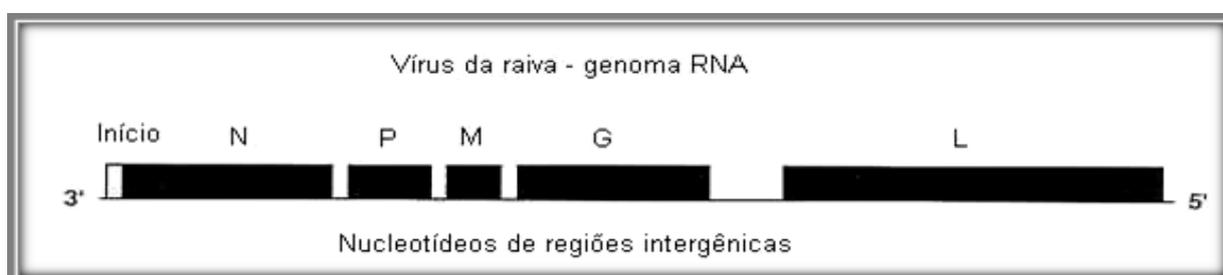


**Figura 2.** Partículas do vírus rábico, negativamente coradas, vistas pelo microscópio eletrônico de transmissão. Note o envelope viral com as espículas de glicoproteínas e o nucleocapsídeo interno com simetria helicoidal. x150.000 (da página **Disease Carriers - Viruses: Rabies** – *Wadsworth Center – New York State Department of Health site, 1997; <http://www.wadsworth.org/databank/rabies.htm>*).

#### 4.4. Replicação viral e biossíntese de macromoléculas

Há cinco genes estruturais no RNA do vírus rábico, que estão ordenados da extremidade 3' → 5' da seguinte maneira: N, P, M, G e L. Seus produtos são denominados, respectivamente, nucleoproteína, fosfoproteína, matriz, glicoproteína e transcriptase L. Na extremidade 3' do genoma viral, localiza-se uma pequena sequência de nucleotídeos, responsável pelo primeiro produto viral transcrito, que produz um curto RNA positivo com 58 nucleotídeos, penetra no núcleo celular e provoca a interrupção da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e RNA (GOSZTONYI, 1994; WUNNER, 2001; ROSE e WHITT, 2001).

O genoma RNA do vírus rábico está representado em um diagrama esquemático na Figura 3.



**Figura 3.** Diagrama esquemático mostrando a sequência de nucleotídeos do genoma do vírus rábico (adaptado de Rupprecht, C.E. **Rhabdoviruses: Rabies Virus**, 2009; <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch061.htm>).

Os genes estruturais correspondem a sequências no genoma viral, copiadas em cinco RNA mensageiros (RNAm<sub>s</sub>) monocistrônicos, que codificam as cinco proteínas estruturais. Cada gene inicia-se pelo tetranucleotídeo UUGU na extremidade 3' e termina no trecho UUUUUUU na extremidade 5'. No RNAm, o início corresponde à sequência AACA da extremidade 5' e o término ocorre na posição 3' da cauda poli A. O RNAm apresenta, em ambas as extremidades, trechos não

codificáveis, ou seja, sequências que não correspondem a aminoácidos na cadeia polipeptídica produzida, tendo cada gene destas sequências, tamanho variável. Da extremidade 5' até o códon AUG que codifica o primeiro aminoácido, observam-se trechos contendo 12, 29, 15, 27 e 30 nucleotídeos para os RNAm<sub>s</sub> das proteínas N, P, M, G e L, respectivamente. Na extremidade 3', a região não codificável corresponde aos nucleotídeos do códon de finalização até os primeiros sete nucleotídeos da cauda poli A, compreendendo, respectivamente, a 62, 71, 184, 75 e a 19 nucleotídeos. Cada RNAm possui uma longa e única sequência de leitura aberta que começa no códon iniciador AUG e termina próxima à extremidade 3' no códon UM para as proteínas N, P e M, e no códon UGA para as proteínas G e L. Para codificar as cinco proteínas virais, o RNAm utiliza 90% do total de nucleotídeos do genoma viral (TORDO et al., 1986).

Tordo et al. (1986) descreveram uma longa região intergênica entre os genes G e L. Dentro dessa região, foram observadas duas sequências de relevância. A primeira, parecida com a sequência consenso de início de transcrição, localizada 10 nucleotídeos a jusante (*downstream*) do sinal de parada do RNAm da proteína G. A segunda, parecida com o sinal de poliadenilação (sinal de parada da transcrição), foi encontrada no final de cada gene, localizada 25 nucleotídeos a montante (*upstream*) do gene L. Nenhum RNAm que correspondesse à região do genoma viral entre os sinais de início e de parada da transcrição foi encontrado, portando, a região intergênica pode ser um pseudogene. A região intergênica G-L não é essencial para a replicação viral, como se pode perceber em um trabalho onde se substituiu o intergene G-L do *Lyssavirus* pelos genes das cadeias leve e pesada da imunoglobulina G (IgG) (MORIMOTO et al., 2001; TORDO et al., 1986).

É possível que a região intergênica apresente formas diversas em cepas virais diferentes, portanto, é provável que existam os três modelos para a região intergênica G-L: presença de pseudogene na região intergênica G-L, proposto por Tordo et al., em 1986 (modelo 1); incorporação da região intergênica G-L à proteína G, proposto por Ravakov, Smith e Nichol, em 1995, (modelo 2); ou ausência de pseudogene e a não incorporação da região intergênica G-L à proteína G, proposto por Morimoto, Ohkubo e Kawai, em 1989 (MORIMOTO et al., 2001)

Nos *Lyssavirus*, as regiões intergênicas não são iguais para todos os genes. Entre o gene N–P, há dois nucleotídeos; entre os genes P–M e M–G, há cinco nucleotídeos; e entre os genes G–L, há 423 nucleotídeos, isso quando se considera a região intergênica G–L como não-codificante. Tordo et al. (1986) analisaram o DNA complementar ao genoma do vírus rábico e observaram que a sequência de nucleotídeos, consenso do iniciador da transcrição, é composta por nove nucleotídeos localizados entre 12 e 30 nucleotídeos a montante do códon de início de transcrição. Os quatro primeiros (AACA) e os dois últimos (CT) nucleotídeos da sequência consenso são invariáveis. Nas posições cinco e seis, há dois resíduos de pirimidina, mas a citosina é mais freqüente que a timina, e finalmente a sétima posição é variável. Analisando o DNA complementar ao genoma do vírus rábico, pode-se observar uma sequência consenso após o códon de parada da transcrição de todos os genes. A sequência consenso é uma região contendo sete adeninas (com exceção do gene G que possui oito), essa região no genoma promove a poliadenilação da molécula de RNAm (MORIMOTO et al., 2001; TORDO et al., 1986).

A replicação viral ocorre no citoplasma e inicia-se com a transcrição de RNAm, pela proteína L, a partir do RNA do genoma. Só há um promotor na extremidade 3' do genoma viral, e a proteína L liga-se ao RNA nesta posição e move-se ao longo da molécula; no caminho, encontra sinais de finalização e início nas extremidades de cada gene. Nem todas as moléculas de polimerase são capazes de continuar a transcrição até o último gene (transcrição atenuada). Por esse motivo, existe um gradiente de concentração de proteínas que se acumulam no citoplasma, cujas concentrações tornam-se cada vez menores para os produtos dos genes situados no final da cadeia de RNA do genoma, nesta ordem: N>P>M>G>L. Assim é produzida uma quantidade relativamente grande de nucleoproteína, quando comparada com a de polimerase (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

Resumidamente, o processo de replicação ocorre da seguinte forma: a adsorção é o processo no qual os antígenos da superfície viral se ligam aos receptores da superfície celular; em seguida, há a penetração do vírus na célula por endocitose. O desnudamento decorre de reduções subsequentes de pH do compartimento endocítico, que desencadeiam uma reação de fusão entre o

envelope viral e a membrana endossomal catalisada pela proteína G. Dessa fusão, ocorre a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. O RNA viral é transcrito para o sentido positivo, feito pela transcriptase do vírus, e as proteínas L e P produzem cinco RNAm<sub>s</sub> para as diferentes proteínas. Com os RNAm<sub>s</sub> formados, dá-se início à tradução, mecanismo pelo qual uma sequência particular de bases do RNAm resulta na produção de uma sequência de aminoácidos numa proteína. Após a formação de algumas proteínas, é possível ocorrer a replicação de toda a fita de RNA. Com as proteínas N, P, L, M e o RNA formados, é possível montar o nucleocapsídeo helicoidal. Na maturação, ocorre o processo de brotamento pela união do nucleocapsídeo helicoidal com a membrana da célula (vírus envelopado), terminando com a liberação do *virion*. A membrana da célula, onde está ancorada a proteína G, forma o envelope viral (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

Apesar de várias etapas do processo de replicação viral ocorrerem ao mesmo tempo, é interessante estudá-las sob uma perspectiva linear. Desta forma, pode-se dividir o ciclo em oito etapas: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação completa do genoma, montagem e brotamento (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

A adsorção é o processo pelo qual o vírus se liga à membrana da célula hospedeira. A glicoproteína G promove a união entre o vírus e o receptor da membrana celular. Os receptores nicotínicos de acetilcolina permitem a adsorção do vírus da raiva. Há também outros receptores que podem estar envolvidos na adsorção (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

A penetração ocorre por endocitose mediada por receptores, através de vesículas revestidas com clatrina. Subsequente redução do pH no compartimento endocítico conduz a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma. Essa fusão é catalisada pela proteína G, e resulta na liberação do cerne de ribonucleoproteína (RNP) no citoplasma da célula. Concomitantemente ou logo após a fusão, a proteína M se dissocia da RNP. Os processos de liberação do nucleocapsídeo e a dissociação da proteína M constituem o desnudamento ou descapsidação viral (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

Logo após a entrada do vírus no citoplasma celular, o genoma viral não é capaz de codificar proteínas, para isso deve ser transcrito em sentido positivo na forma de RNAm. Este processo de transcrição primária pode ocorrer na ausência da síntese de proteínas, pois o *virion* carrega, consigo e para dentro da célula, sua própria RNA polimerase. A transcrição se inicia, obrigatoriamente, na terminação 3' do genoma, produzindo um RNA líder com 48 nucleotídeos, seguida, em ordem, pela transcrição dos RNAm<sub>s</sub> individuais que codificam as proteínas N, P, M, G e L (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

A cada junção gênica, a transcriptase faz uma pausa e a transcrição é atenuada cerca de 20 a 30%, o que resulta num gradiente de RNAm e, conseqüentemente, num gradiente de proteína decrescente em relação à ordem gênica: N>P>M>G>L. Nos RNAm<sub>s</sub> individuais, são adicionados uma estrutura “quepe” (*cap*) na extremidade 5', e uma cauda poli A na extremidade 3'. Essa última adição, aparentemente, ocorre pela cópia repetitiva da sequência U7 presente no final de cada gene (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

A tradução dos RNAm<sub>s</sub> ocorre nos ribossomas. Todas as proteínas são codificadas pelos ribossomas livres no citoplasma, exceto a proteína G que é codificada pelos ribossomas do retículo endoplasmático rugoso (RER) (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

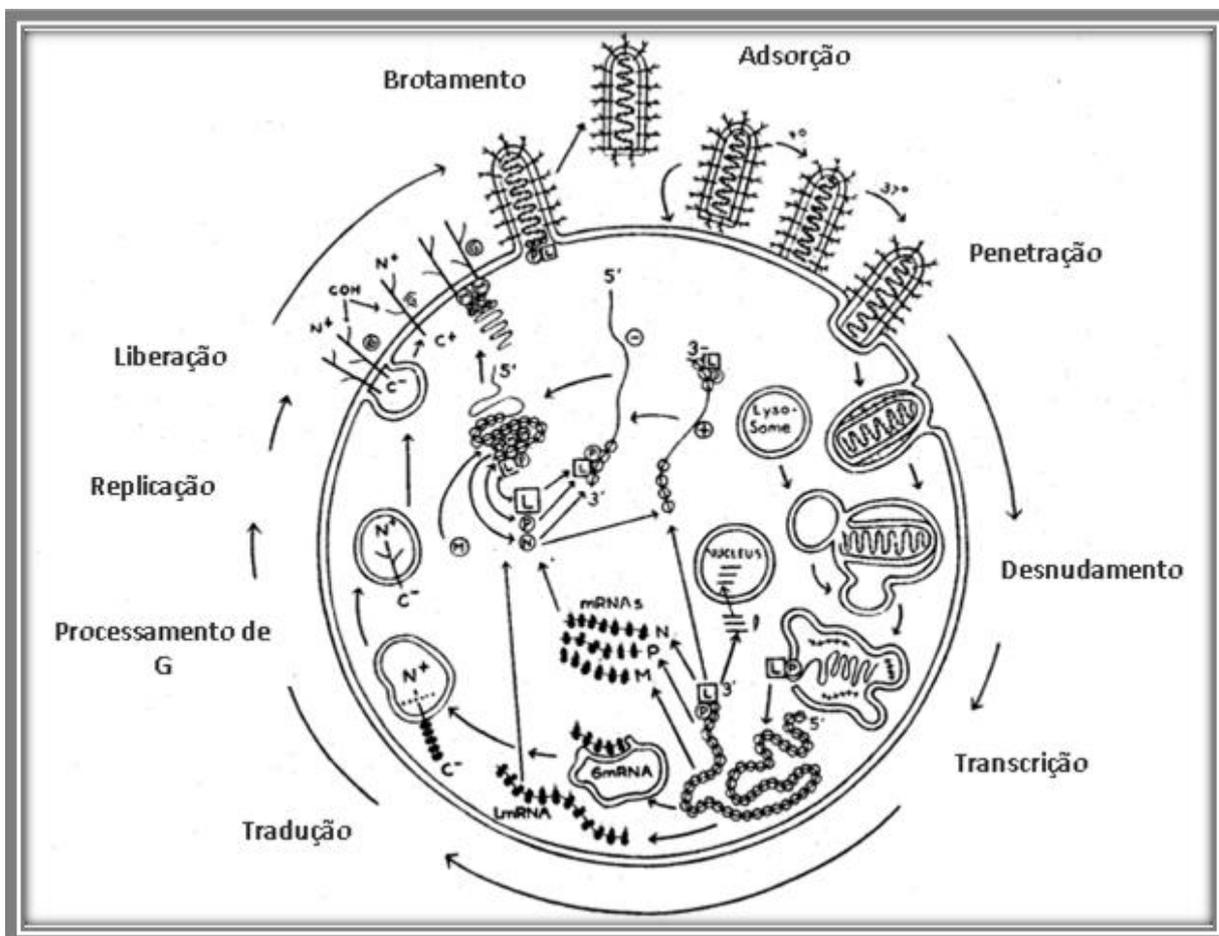
Diferente da transcrição, a replicação do genoma viral, propriamente dito, depende da síntese ativa de proteínas vírus-codificadas, principalmente a N e a P. A replicação do genoma viral ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, o genoma infeccioso é usado como molde para produzir fitas de RNA de sentido positivo. Na segunda, a polimerase produz uma fita de RNA de sentido negativo, que originará as fitas da progênie viral. Para tal procedimento, a polimerase usa, como molde, a fita de RNA de sentido positivo, produzida na primeira etapa do processo replicação do genoma (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

Ainda não está bem explicado como funciona a chave que determina, ao complexo polimerase, quando realizar a transcrição ou a replicação do genoma. Um modelo aceito é que o RNA líder funcione como sinal para que se realize a transcrição em RNAm, porém, esse sinal não é mais reconhecido quando o RNA líder se une ao complexo das proteínas N-P e, então, a polimerase realiza a

replicação completa do genoma viral. Esse modelo é aceito, porque, logo após a entrada do vírus na célula, não ocorre síntese de proteínas virais, o que permite a transcrição, mas, à medida que a concentração das proteínas N–P aumenta, o sinal do RNA líder é contido, o que permite a replicação completa do genoma (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

No processo de morfogênese viral, a montagem do *virion* tem início quando o RNA da progênie se une às proteínas N, P e L, para formar o cerne de RNP ou o nucleocapsídeo. Em seguida, o nucleocapsídeo se liga à membrana plasmática e, posteriormente, é compactado pela proteína M. No processo de maturação viral, ocorre a união entre o nucleocapsídeo e a membrana da célula, o que culmina com a liberação da partícula viral por brotamento. A partícula viral, ao brotar da célula hospedeira, leva consigo parte da membrana plasmática, formando um envelope onde se ancora a glicoproteína G (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

O ciclo replicativo completo do vírus rábico, com a biossíntese de suas macromoléculas, está representado em um diagrama esquemático na Figura 4.



**Figura 4.** Diagrama esquemático mostrando o ciclo de replicação e a biossíntese de macromoléculas do vírus rábico (adaptado de Cann, A. **Rhabdoviruses**, 1999; <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Rhabdoviruses.html>).

#### 4.5. Instabilidade genômica

A replicação do genoma do vírus rábico apresenta fidelidade limitada, uma vez que a RNA polimerase viral não tem atividade corretiva, o que acarreta a formação de diferentes genomas virais, os quais apresentam uma mesma origem, sendo relacionados, entretanto, distintos (KISSI et al., 1999).

As mutações em genomas de vírus RNA ocorrem em taxas variáveis entre  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  substituições nucleotídicas por ciclo, dependendo da região viral considerada. Vários outros fatores podem estar envolvidos na geração de heterogeneidade nas sequências de RNA do vírus rábico, como, por exemplo, a duração da infecção, rota de transmissão, carga viral, resposta imunológica do hospedeiro e as interações de proteínas virais com as proteínas da célula hospedeira. Considerando uma distribuição randômica das mutações ao longo do genoma, as variantes genômicas formam populações de *quasispecies*, as quais aumentam rapidamente com os ciclos de infecção em diferentes hospedeiros (KISSI et al., 1999).

Como resultado desta alta instabilidade genômica, variantes virais podem apresentar características fenotípicas diferenciadas. Por exemplo, várias mutações identificadas em regiões codificantes do genoma estão correlacionadas com o tropismo seletivo por neurônios. Por outro lado, as mutações em regiões não codificantes, podem afetar o equilíbrio entre a replicação e a formação de partículas defectivas, assim, alterando a sobrevivência da célula hospedeira e, desta forma, do próprio hospedeiro. Além disso, as interações mais longas entre o vírus e as particularidades de cada hospedeiro podem estar envolvidas (DOMINGO e HOLLAND, 1997).

Desta forma, o modelo de *quasispecies* das populações mistas de vírus RNA provê uma explicação plausível para a rápida seleção de mutantes que surgem em novas condições ambientais. Este processo seletivo pode ocorrer em qualquer gene viral codificante de proteínas que pode afetar, de forma particular, a estrutura, a função ou o fenótipo do vírus (MORIMOTO et al., 1998).

#### 4.6. Propriedades físicas e químicas do vírus

O vírus rábico, usualmente de transmissão pelo contato direto, é pouco resistente aos agentes químicos, físicos e às condições ambientais. É bastante sensível aos solventes orgânicos, como o éter e o clorofórmio, aos sais minerais, aos ácidos e aos álcalis fortes, e pouco resistente ao calor, aos raios solar e ultravioleta. O vírus rábico não resiste a condições ambientais, como a dessecação, luminosidade e temperatura excessiva (BRASIL, 2005, LIEBERMANN, 1988).

No caso da desinfecção química de instrumentais cirúrgicos, vestuários ou do ambiente onde foi realizada a necropsia de um animal raivoso, formol a 10%, formaldeído e glutaraldeído a 1-2%, ácido sulfúrico a 2%, fenol e ácido clorídrico a 5%, creolina a 1%, entre outros, são os desinfectantes indicados. Para a desinfecção de ambientes, soluções de formalina, entre 0,25 % e 0,90%, e de bicarbonato de sódio, a 1% e 2%, inativam o vírus de forma rápida e eficiente (BRASIL, 2005, LIEBERMANN, 1988).

A perda de sua infecciosidade à temperatura de 80°C ocorre em apenas 2 minutos; à luz solar, em 14 dias a 30°C; ou ainda quando carcaças de animais infectados com vírus rábico são expostas à temperatura de 18°C, por 23 dias, e a 37°C por cinco dias (BRASIL, 2005, LIEBERMANN, 1988).

Na dependência das condições ambientais adversas, o vírus rábico pode manter sua infecciosidade por períodos relativamente longos, sendo inativado naturalmente pelo processo de autólise. A putrefação destrói o vírus lentamente, aproximadamente em 14 dias, porém, em carcaças enterradas em terrenos argilosos e secos a uma profundidade de um metro, as partículas virais permaneceram infecciosas por até cinco semanas (LIEBERMANN, 1988).

O vírus rábico pode manter-se ativo por semanas à temperatura de 4°C, e por meses, quando acondicionado abaixo de 0°C ou em tecidos infectados, quando colocado em glicerina neutra a 4°C; e pode permanecer ativo por anos, quando liofilizado (BRASIL, 2005, LIEBERMANN, 1988).

#### 4.7. Patogenia

A transmissão da raiva ocorre pela inoculação do vírus, presente na saliva do animal infectado, principalmente por mordedura, e, menos frequentemente, por inalação de aerossóis e lambedura de mucosas. Portanto, a penetração do vírus no organismo do hospedeiro é usualmente transdérmica (ROSE e WHITT, 2001).

A infecção de glândulas salivares determina a eliminação do vírus rábico pelos fluidos orais de animais raivosos, visto que estas recebem inervação parassimpática por meio dos nervos facial e glossofaríngeo, da inervação simpática via gânglio cervical superior (ou cranial) e da inervação aferente (JACKSON, 2002).

A fixação do vírus rábico à superfície da célula do hospedeiro é o primeiro evento na infecção, e depende da interação mútua entre os receptores celulares e os antígenos virais (TSIANG, 1993). Os achados de partículas virais no espaço intercelular, entre as terminações de nervos sensoriais e as fibras musculares do fuso neuromuscular, sugerem que essas estruturas participam da translocação viral dos músculos ao sistema nervoso periférico (SNP) (HARRISON e MURPHY, 1978), e o mesmo ocorre nas terminações motoras na junção neuromuscular (WATSON et al., 1981). Há também fortes evidências de que o receptor nicotínico para a acetilcolina, presente na junção neuromuscular, participa da fixação de vírus às células musculares (LENTZ et al., 1982).

O vírus rábico progride ascendentemente pelos nervos periféricos (migração centrípeta) ao sistema nervoso central (SNC). No SNC, ocorre a sua replicação e disseminação, atinge os nervos cranianos e progride no sentido descendente (migração centrífuga) aos tecidos não-nervosos. Por fim, o vírus é excretado, principalmente, pelas glândulas salivares (CHARLTON, 1988; KAPLAN et al., 1986; MURPHY, 1977).

Rose e Whitt (2001) citaram, em detalhes, o percurso do vírus rábico antes de percorrer o SNP. O local primário de replicação viral são as células musculares estriadas. Murphy e Bauer (1974) propuseram que esta etapa serve para amplificar, em número suficiente, a quantidade de partículas infecciosas, para posterior invasão do PNS. Tsiang (1985), no seu estudo *in vitro*, indica a possibilidade de partículas virais entrarem diretamente nas terminações dos nervos periféricos, sem prévia

replicação nos músculos. Tal possibilidade é confirmada por Shankar et al. (1991) (ROSE e WHITT, 2001).

As partículas virais em contato íntimo com os nervos periféricos são endocitadas pelo axônio terminal e também podem entrar nesses nervos pela fusão direta com o axolema (BAER e LENTZ, 1991). Tsiang (1993) propõe que o transporte do vírus rábico é intra-axonal, confirmando Baer et al. (1965 citados por TSIANG, 1993) que descarta a possibilidade de deslocamento perineural. De acordo com Baer e Lentz (1991), as partículas virais, fora do SNP, replicam-se primeiramente nos gânglios espinhais e, rapidamente, chegam ao cérebro pela medula espinhal (TSIANG, 1993; BAER e LENTZ, 1991).

A exata morfogênese do vírus rábico, durante o fluxo axoplasmático passivo, como vírus intacto ou nucleocapsídeo (ribonucleoproteína), permanece ainda obscura. Contudo, importantes estudos de Gosztanyi et al. (1993) levam a crer que a transferência sináptica do vírus rábico, provavelmente, siga na forma de nucleocapsídeo vazio. Experimentalmente, tem sido observado que o vírus rábico, após alcançar o SNC, é encontrado germinando do pericário neuronal e das membranas pós-sináptica e dendrítica da sinapse axo-dendrítica. Tal fato sugere que a disseminação do vírus rábico pode ser devido tanto à transmissão célula a célula, via fluxo axoplasmático retrógrado, como pela livre passagem nos espaços intercelulares (GOSZTONYI et al., 1993; IWASAKI, 1991).

A difusão da infecção pelo vírus rábico ocorre geralmente numa forma espacialmente integrada, difundindo-se em etapas para áreas adjacentes, do local de entrada no SNC para outras áreas do cérebro e medula espinhal. A difusão pode ser extremamente rápida e a infecção pode saltar para áreas distantes por meio de neurônios com longos axônios, via intra-axonal (CHARLTON, 1988). Outra via não menos importante de disseminação no SNC é pelo fluido cérebro-espinhal (IWASAKI, 1991).

O caminho viral para as glândulas salivares é através dos nervos que se originam próximo aos centros nervosos vitais, e essa difusão geralmente coincide com o comportamento agressivo do animal (SCHNEIDER, 1991). Tal fato está relacionado, principalmente, ao comprometimento do hipotálamo medial e dos núcleos da rafe localizados no tronco encefálico, já que esses são centros inibitórios

que regulam o comportamento agressivo. A distribuição do vírus rábico pelo cérebro, provavelmente, influencia na manifestação da doença, quer na forma paralítica, quer na forma excitativa (CHARLTON, 1988).

A difusão centrífuga do vírus alcança outros tecidos não nervosos. Logo, há relatos do acometimento de rim, pâncreas, musculatura cardíaca, glândula adrenal, mucosas nasal e oral, papilas gustativas, folículos pilosos, córnea e retina (MURPHY et al., 1973). Contudo, o órgão com mais alto título é a glândula salivar submaxilar, que produz vírus nas células acinares mucogênicas, posteriormente, excretados na saliva (MURPHY, 1985).

A análise ultraestrutural através da microscopia eletrônica em culturas de células BHK (*baby hamster kidney*) (IWASAKI et al., 1973) e de miotúbulos de embrião de galinha infectados com amostras de vírus “fixo” (LENTZ et al., 1982) mostra o ciclo infeccioso do vírus rábico na célula, iniciado-se com a adsorção mediada pela glicoproteína viral à membrana citoplasmática do hospedeiro. Vários componentes da membrana citoplasmática têm sido implicados como receptores, entre estes, estão os carboidratos (CONTI et al., 1986), fosfolipídeos (WUNNER et al., 1991; SUPERTI et al., 1984) e gangliosídeos (SUPERTI et al., 1986). A utilização de extratos solubilizados de cérebro de ratos sadios revelou que os gangliosídeos são importantes em diferentes tipos de células (CONTI et al., 1986).

O estudo de culturas celulares infectadas também revela a penetração viral pela fusão à membrana citoplasmática (IWASAKI et al., 1973), ou pela endocitose mediada por receptores (SUPERTI et al., 1984; IWASAKI et al., 1973). Após a penetração, uma série de alterações no pH do endossoma conduz a liberação do RNA viral no citosol (MARSH e HELENIUS, 1989). Substâncias que atuam nos lisossomas alcalinizando o pH, como o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , inibem a fusão entre a partícula viral e a parede do lisossoma, impedindo a infecção. A acidificação do meio parece causar duas alterações na glicoproteína: a primeira ocorre em pH 6,0 e é responsável pela hemaglutinação; a segunda ocorre em pH inferior a 6,0 e associa-se com a fusão às membranas (GAUDIN et al., 1991).

A replicação no tecido muscular *in vivo* foi evidente em experimentos utilizando *hamsters* neonatos, e o início da detecção de antígeno, por imunofluorescência no sítio de inoculação, ocorria 40 horas após a inoculação.

Com o passar dos dias, as células tornavam-se individualmente mais ricas em antígenos e um maior número de células tornava-se infectado. Estes resultados estimularam a hipótese de que o tecido muscular pudesse atuar como sítio de amplificação viral, necessário para a invasão do SNP (MURPHY e BAUER, 1974).

A utilização de cultivos de miotúbulos de ratos revelou que, quando a infecção era causada pela amostra de vírus “fixo” CVS, não havia liberação de partículas virais infecciosas para fora da célula (TSIANG et al., 1986). Entretanto, quando esse mesmo tipo de célula era infectada com uma amostra de vírus de “rua”, ocorria a liberação de partículas virais infecciosas (TSIANG, 1988). A infecção de camundongos adultos com CVS demonstrou a presença de vírus nos neurônios sem a prévia multiplicação no músculo (COULON et al., 1989). Provavelmente, o vírus de “rua” comporta-se de maneira diferente do vírus “fixo”, o primeiro sendo capaz de se replicar em tecido muscular e se manter no sítio de inoculação por determinado período antes de alcançar o sistema nervoso (TSIANG et al., 1988).

Após a replicação no tecido muscular, observam-se, através da microscopia eletrônica de transmissão, partículas virais no espaço extracelular entre as fibras musculares e as células nervosas da placa motora (HARRISON e MURPHY, 1978). Obtêm-se resultados positivos, 1 hora após a infecção, em sítios de células musculares contendo receptores colinérgicos (WATSON et al., 1981); e através de autorradiografia obtém-se o mesmo padrão de distribuição do antígeno, 6 horas após a infecção (COULON et al., 1989). O fato de haver acúmulo de partículas virais na placa motora pode favorecer a penetração no axolema, através de mecanismos inespecíficos ou através de endocitose, responsável pelo retorno da membrana da vesícula sináptica, durante a reciclagem dessas membranas (BAER e LENTZ, 1991).

A progressão do vírus rábico ocorre através da fibra nervosa, na secção de nervos periféricos da área de inoculação, e anteriormente à infecção impede a manifestação da doença. Após a inoculação, a secção do nervo só é eficiente para reduzir a mortalidade, se preceder a passagem do vírus (BAER e LENTZ, 1991). O vírus prossegue o seu trajeto utilizando somente o axônio, pois a remoção de estruturas perineurais como o epineuro, perineuro e epitélio perineural, não impede a progressão do vírus. Ao contrário, a secção do axônio e a manutenção das demais estruturas não resultam em morte dos animais (BAER e LENTZ, 1991).

O vírus é conduzido até o CNS através do transporte axoplásmico retrógrado, pois agentes químicos que inibem esse tipo de transporte neuronal, como a colchicina e a vinblastina, impedem a disseminação do vírus (LYCKE e TSIANG, 1987; TSIANG, 1979; BIJLENGA e HEANEY, 1978). Não há evidências sobre o estado em que o vírus é transportado, tendo sido observadas partículas virais no interior de membranas, vacúolos ou túbulos do axônio. Estas observações obtidas vários dias após a infecção podem representar o transporte ante-retrógrado de partículas produzidas no pericárium, ou talvez haja transporte de nucleocapsídeo, como ocorre em culturas de células de gânglio dorsal infectadas com o *Herpes simplex virus* – HSV (LYCKE et al., 1984; CHARLTON e CASEY, 1979; MURPHY et al., 1973).

A presença de grande número de inclusões intracitoplasmáticas refere-se à maturação intracelular, já que o processo de brotamento na membrana citoplasmática não necessita da formação de inclusões; uma evidência sugestiva de transporte axonal é a frequência de brotamento das partículas virais nas regiões pós-sinápticas dos dendritos e subsequente absorção pelas células vizinhas. A disseminação através dos interstícios também pode ocorrer, pois se observam partículas virais no espaço intercelular distante dos sítios de brotamento (IWASAKI, 1991).

No SNC observa-se infecção em virtualmente todas as partes do cérebro e o antígeno viral não fica confinado ao pericárium do neurônio. É possível observar massa antigênica nos filetes nervosos de dendritos e axônios distantes do pericárium, o que pode significar que essas estruturas desempenham um papel importante como sítios de replicação e/ou transporte viral (IWASAKI et al., 1985).

Vários estudos revelaram que somente os neurônios são primariamente infectados e estes estudos sustentaram a replicação viral no SNC (CHARLTON e CASEY, 1979; MURPHY et al., 1973). Cultivos primários de células gliais infectadas por diferentes amostras de vírus rábico, mostraram que a infecção dessas células *in vivo* pode concorrer para a difusão e persistência viral, assim como para a disfunção neurológica (RAY et al., 1997).

#### 4.8. Patologia

A patologia da raiva é surpreendente, pois apesar de ser uma doença aguda e fatal, possui a característica de causar relativa escassez de lesões cerebrais (TSIANG et al., 1991). Aparentemente, o prejuízo nas funções neurológicas é maior que as alterações histopatológicas no desenvolvimento dos sinais clínicos da virose (ROSE e WHITT, 2001).

A alteração macroscópica usualmente visível é a congestão dos vasos sanguíneos leptomeníngeos (dura-máter e aracnóide) e um suave edema cerebral que está presente em muitos casos (PERL e GOOD, 1991). Microscopicamente, ocorre o acúmulo frequente de linfócitos ao redor dos vasos sanguíneos (manguito perivascular) no SNC, primariamente no pedúnculo cerebral e medula espinhal (PERL e GOOD, 1991). A degeneração neuronal com neuronofagia, em certo grau secundária a hiperpirexia e a proliferação das células gliais, são lesões histológicas que podem estar presentes. Outras lesões importantes são as encontradas nos gânglios de Gasser (gânglio trigeminal) e nos gânglios da raiz dorsal, decorrentes da proliferação de células capsulares (PERL e GOOD, 1991). Basicamente, as alterações histológicas da raiva refletem uma encefalomielite não-supurativa caracterizada por degeneração hialina neuronal da medula espinhal e do cérebro (PERL e GOOD, 1991; DULBECCO e GINSBERG, 1980).

Em cães, várias lesões inflamatórias têm sido frequentemente observadas, enquanto em herbívoros geralmente registra-se pouca degeneração neuronal ou inflamação (PERL e GOOD, 1991). Sullivan (1985) menciona que a raiva em muitos animais é tipicamente uma encefalomielite não-supurativa com ganglioneurite e significativas lesões do hipotálamo à ponte, e associada com parotidite na parte cervical da medula espinhal. A localização da lesão no SNC é variável e depende da espécie afetada. Em carnívoros, sinais da infecção são mais evidentes no córtex, no hipocampo e no tálamo, do que nas áreas posteriores do cérebro, e em herbívoros o inverso é encontrado (PERL e GOOD, 1991; SUREAU et al., 1991). No homem, constatou-se que as lesões da forma paralítica e da forma excitativa são assim caracterizadas: a primeira, pela destruição da célula nervosa, proliferação microglial e infiltração perivascular, principalmente na medula espinhal e pedúnculo cerebral;

a segunda, por reação inflamatória, alterações vasculares e corpúsculos de inclusão, sendo mais difusas e atingindo o tálamo, hipotálamo, cerebelo e córtex cerebral (CHOPRA et al., 1980).

A única lesão histológica específica, patognomônica da infecção pelo vírus rábico, é o corpúsculo de Negri (NEGRI, 1903 citado por TSIANG, 1985), que é encontrado tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Antígenos virais estão presentes no corpúsculo de Negri e o processo de sucessivas passagens de vírus rábico “de rua” em culturas de células, usualmente resulta no desaparecimento destes corpúsculos (MATSUMOTO, 1975; TSIANG, 1993). Os corpúsculos de Negri são proeminentes em grandes neurônios, tais como aqueles do hipocampo, cerebelo, hipotálamo, pedúnculo cerebral, e são menores no córtex (TSIANG, 1993).

Segundo Sureau et al. (1991), em herbívoros os corpúsculos de Negri não são tão proeminentes nos neurônios. Assis e Rosenberg (1984), não encontraram nenhuma correlação entre a localização dos corpúsculos de Negri e a presença de lesões histológicas, bem como o local de replicação do vírus. Postula-se que as alterações funcionais do cérebro possam desencadear a letalidade. Uma das hipóteses levantadas é que as disfunções fisiológicas sejam causadas pelo acúmulo de material viral dentro dos neurônios (JOHNSON, 1965 citado por TSIANG, 1993). Em equinos, postula-se que ocorra uma margem de erro significativa no diagnóstico com base na detecção de corpúsculos de Negri, pois são menos encontrados que em outras espécies de herbívoros (PEIXOTO et al., 2000). Quando os corpúsculos de Negri são detectados em equinos, ocorrem com maior frequência nos gânglios trigêmios (LIMA et al., 2005). Ao passo que, em bovinos os corpúsculos de Negri são detectados com maior frequência nas células de Purkinje do cerebelo (LANGOHR et al., 2003). Apesar de suas limitações, o diagnóstico patológico pela detecção de corpúsculos de Negri pode fazer parte de um arsenal complementar utilizado para caracterização de uma cepa viral, de acordo com a sua região geográfica e com a espécie animal acometida (LIMA et al., 2005).

As lesões de caráter macroscópico mais frequentes nos herbívoros são: paralisia dos esfíncteres da vesícula urinária e anal (principalmente na raiva paralítica, transmitida por morcegos). A bexiga de bovinos necropsiados mostra-se cheia de urina, e a ampola retal repleta de fezes (LIMA et al., 2005).

#### **4.9. Características clínicas**

Os sinais clínicos da raiva são variados e inespecíficos. Três formas clássicas de apresentação da virose podem ser descritas: a forma excitativa ou “raiva furiosa”, a forma parálitica ou “raiva muda” e a atípica. Tais formas são denominadas de acordo com a característica predominante na apresentação da doença. O período de incubação (PI) também é variável e sua variabilidade depende de fatores como capacidade invasiva, patogenicidade, carga viral do inoculo inicial, ponto de inoculação (quanto mais próximo do sistema nervoso central, menor será o período de incubação), idade e imunocompetência do animal. A manifestação da doença, no geral obedece a seguinte evolução: fase prodrômica, excitativa (“raiva furiosa”) e parálitica (“raiva muda”). Nos herbívoros, a forma predominante quando transmitida por morcegos hematófagos é a forma parálitica ou “raiva muda” (BRASIL, 2005; LANGOHR et al, 2003; DELPIETRO, 2001; PEREIRA, 1997; KOTAIT et al., 1998; BAER, 1991; ACHA e SZYFRES, 1986; STÖBER, 1984).

##### **4.9.1. Em herbívoros**

Em ruminantes, a manifestação clínica da raiva obedece a mesma evolução dos carnívoros (fase prodrômica, excitativa ou “raiva furiosa” e parálitica ou “raiva muda”). Stober (1984), nos estudos sobre a raiva transmitida por raposas (“raiva vulpina”) relatou que o PI pode variar de 2 semanas a 4 meses. No período prodrômico, que pode durar de 1 a 3 dias, ocorre alteração na percepção com olhar indiferente e fixo, por vezes estrabismo convergente, lábios pendentes, orelhas firmes e voltadas para frente, deixando de comer e de beber água, buscando o isolamento. Os bovinos com a raiva furiosa podem ser perigosos, atacando e persuadindo humanos e outros animais. No início da fase excitativa, segundo Stober (1984), os bovinos emitem mugidos perante qualquer estímulo externo, repetindo-se mais vezes com a progressão da doença, enfraquecidos e roucos em razão da paralisia das cordas vocais (vocalização), sendo uma das manifestações mais evidentes da raiva furiosa. Os animais ficam inquietos, mordem objetos que estão ao

seu redor e investem contra pessoas e cercas, elevando a cabeça várias vezes, e apresentando tenesmo. A seguir, inicia-se a fase parálitica ou “muda”, com paralisia da faringe e laringe, flacidez dos membros posteriores e do quarto traseiro, conseqüentemente decúbito, e finalmente a morte. A duração da doença é geralmente de 4 a 7 dias, terminando, invariavelmente com a morte, que se dá por paralisia da musculatura envolvida na respiração (KOTAIT et al., 1998; STÖBER, 1984).

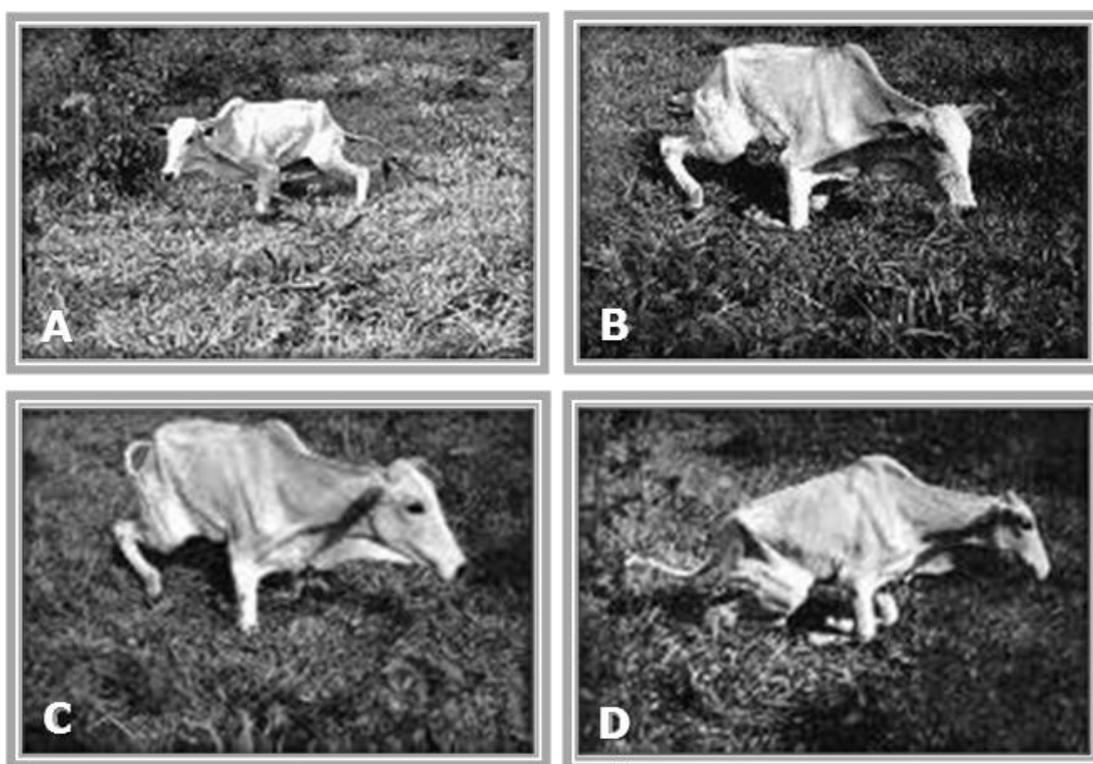
Em bovinos, espécie considerada muito susceptível a infecção pelo vírus rábico, a forma mais comum da raiva transmitida por morcegos hematófagos é a parálitica, com as sinonímias: “raiva parálitica bovina“, “mal das cadeiras dos bovinos”, “raiva paresiante”, “peste das cadeiras” e “raiva muda”. A raiva bovina, geralmente é transmitida pela mordedura do morcego hematófago *Desmodus rotundus* e, por isso, é também conhecida como “raiva desmodina”. A raiva desmodina ou raiva parálitica bovina é causada pelas variantes antigênicas do vírus rábico comuns ao *D. rotundus* e outros morcegos tropicais e caracteriza-se pela predominância de sintomas neurológicos de paralisia (DELPIETRO, 2001).

Ao passo que, a raiva bovina transmitida por cães, geralmente apresenta sinais de hiperexcitação, antes do aparecimento dos sintomas de paralisia, levando os animais a perseguir e investir contra outros animais e pessoas. A raiva bovina transmitida por cães torna os animais muito atentos, a excitação toma o lugar da lugar da expressão plácida normal os movimentos e ruídos ao seu redor são seguidos com os olhos e as orelhas (KOTAIT et al, 1998). Já na raiva parálitica bovina, transmitida por morcegos hematófagos, raramente ocorre raiva excitativa ou raiva furiosa. O PI, comumente, varia entre 20 e 80 dias podendo chegar até 5 meses (BAER, 1991; ACHA e SZYFRES, 1986).

Os animais raivosos isolam-se dos demais animais do rebanho, Alguns podem apresentar midríase e pêlos arrepiados, enquanto outros podem ser observados com sonolência. A incoordenação dos membros posteriores é tida como um dos primeiros sinais importantes da doença, seguido por anorexia, repetidos mugidos, presença de fezes secas, compactas e fétidas, incoordenação progressiva com fraqueza dos membros posteriores e dobramento dos boletos posteriores, e logo sobrevém a morte (BAER, 1991; KOTAIT, 1998).

Os acessos de fúria são raros e podem ser notados tremores musculares, inquietude, priapismo e hipersensibilidade no local da mordedura do morcego hematófago (porta de entrada do vírus), levando o animal doente a raspar e coçar essa região, até causar ulcerações. Muitas vezes há aumento da libido e o tenesmo é bastante frequente (INSTITUTO PASTEUR, 2002a; KOTAIT, 1998).

Uma sequência de aspectos clínicos em bovino acometido pela raiva pode ser observada em quatro fotografias na Figura 5.



**Figura 5.** Aspectos clínicos da raiva parálitica bovina. A sequência de fotos (A–D) mostra a dificuldade do animal em levantar (adaptado da página mantida pela superintendência em produção animal do **INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA – IMA**, 2005; <http://www.ima.mg.gov.br/>).

Em equinos, no geral, os sintomas paralíticos e o período de duração da doença são bastante semelhantes aos descritos em bovinos (LIMA et al., 2005). Na raiva equina, o PI varia entre 21 e 90 dias, podendo prolongar-se até 4 meses. Ocorre prurido intenso no ponto de penetração do vírus, levando os animais a se morder, causando graves lesões. Intranquilidade, apetite deprimido, retroversão patológica dos lábios, andar cambaleante e incoordenação motora são sinais comuns. Quando a fase furiosa está presente, esses animais tendem a morder e a escoicear, o que os torna praticamente não manejáveis e extremamente perigosos (KOTAIT et al., 1998). De acordo com Mohanty e Dutta, em 1981, os sinais clínicos da raiva em equinos assemelham-se aos do tétano (MOHANTY e DUTTA, 1981).

Em ovinos e caprinos, a sintomatologia paralítica também é semelhante a dos bovinos. Na raiva ovina e caprina, o PI varia entre 21 e 60 dias. Em ovinos, é comum a ausência da fase de excitação. Ao passo que, em caprinos esta fase é frequente (KOTAIT et al., 1998). No entanto, na raiva ovina se o transmissor for cão, provavelmente a sintomatologia predominante será a da raiva furiosa (LIMA et al., 2005).

Em suínos, quase sempre há o período de excitação e agressividade, salivação abundante e prurido no ponto de entrada do vírus. Antes da morte, há sinais evidentes de paralisia como descrito em bovinos. Na raiva suína, à semelhança da raiva ovina e caprina, o PI varia entre 21 e 60 dias (KOTAIT et al., 1998).

#### **4.9.2. Em quirópteros**

Em quirópteros, morcegos hematófagos e não-hematófagos, ainda é pouco conhecido o comportamento da raiva. O mais importante a considerar é o fato de o quiróptero pode albergar o vírus rábico em sua saliva e ser fonte de infecção antes de adoecer, por períodos maiores que em outras espécies. Algumas apresentações da doença em quirópteros foram assim registradas: raiva furiosa típica, com paralisia e morte; raiva furiosa e morte sem paralisia; raiva paralítica típica e morte (INSTITUTO PASTEUR, 2002b).

Durante vários anos, acreditou-se que os morcegos se infectavam com o vírus rábico e podiam transmiti-lo, sem nunca contrair a doença. Entretanto, estudos realizados na década de 80, relacionados à infecção experimental de morcegos, evidenciaram que estes animais reagem ao vírus como os outros mamíferos, com PI variável e com excreção de vírus pela saliva. Os morcegos não apresentam o estado de “portador são” e não se recuperam após mostrarem sintomatologia da raiva ou eliminarem vírus pela saliva (INSTITUTO PASTEUR, 2002b).

O PI em morcegos é extremamente variável, desde semanas a períodos prolongados, acima de 1 ano. Segundo Constantine, que em 1967 constatou a transmissão da raiva por inalação, o fato de estes animais apresentarem taxa metabólica elevada e possuírem características de hipotermia, pode levar ao PI prolongado. Na verdade, há uma ausência de dados concretos, devido às dificuldades de realização de pesquisas e de observação de animais doentes e saudáveis. O PI em espécies de morcegos não-hematófagos varia, na infecção experimental, de 2 a 25 semanas. Ao passo que, em morcegos hematófagos, o PI experimental médio é 17 dias (CONSTANTINE, 1979; INSTITUTO PASTEUR, 2002b; KOTAIT et al., 1998).

Em morcegos hematófagos, os principais sintomas da raiva são: atividade alimentar diurna, hiperexcitabilidade e agressividade, falta de coordenação dos movimentos, tremores musculares, paralisia e morte. Em morcegos não-hematófagos, geralmente ocorre a paralisia sem agressividade e excitabilidade, e os espécimes são encontrados em locais não habituais. Uma vez surgidos os sintomas, em morcegos não-hematófagos, a morte ocorre dentro de poucos dias. (CONSTANTINE, 1979; INSTITUTO PASTEUR, 2002b).

A Figura 6 mostra aspectos clínicos da raiva em quirópteros (morcegos).



**Figura 6.** Morcego infectado pelo vírus rábico mostrando mudança de hábitos, encontra-se no chão e, à luz do dia, seus pelos tornam-se desalinhados e sujos, apresenta dificuldade de caminhar e sustentar o corpo, os sintomas paralíticos estão mais nas asas do que nas extremidades posteriores (da página **Rabies Virus, Symptoms, Vaccine, and Treatment** – *Survive Outdoors Inc. web site*, 2008; <http://www.surviveoutdoors.com/reference/rabies.asp#symptoms>).

### 4.9.3. Em humanos

A variabilidade no PI do vírus rábico em humanos, que é usualmente de 2 a 8 semanas, podendo ainda variar de 10 dias a 8 meses ou mais, parece estar relacionada a fatores como a inervação do local da mordida, proximidade da mordida com o SNC, severidade da mordida, quantidade de inóculo viral, idade e estado imunológico do indivíduo (HELD et al., 1991; ACHA e SZYFRES, 1986).

A hidrofobia (do gr. *hydrophobía*, do lat. *Hydrophobia*, que significa “horror aos líquidos”) é um sintoma próprio da raiva humana. Esta reação ocorre devido a espasmos dolorosos do diafragma e músculos acessórios do pescoço, o que ocasionam espasmos inspiratórios longos e duráveis (KAPLAN et al., 1986).

No período de infecção da raiva humana, ocorrem três estágios: prodrômico, neurológico excitativo e neurológico paralítico. O primeiro, prodrômico, é caracterizado pelos sinais de coceira, dormência e dor no local da mordida. Esses difundem-se gradualmente para toda a região com o ferimento (porta de entrada do vírus) por mordedura ou arranhadura (de animal raivoso) e, eventualmente, para todo o corpo. Estes são sinais inespecíficos e que não permitem um diagnóstico (TSIANG, 1993). O estágio neurológico, no qual a encefalite é registrada na maioria dos casos, inicialmente, é caracterizado por hiperestesia e uma extrema sensibilidade à luz e ao som, dilatação das pupilas e um aumento da salivação. À medida que a doença progride, ocorrem espasmos nos músculos da deglutição, resultando numa violenta contração muscular, impedindo a deglutição da própria saliva (hidrofobia). Por fim, ocorrem espasmos dos músculos respiratórios e convulsões. A hiperatividade é um importante sinal deste estágio, associado à ansiedade, nervosismo e confusão mental, alternando com períodos de lucidez e preservação da inteligência. A consciência é mantida até próximo à morte (ACHA e SZYFRES, 1986).

A raiva encefalítica típica é diagnosticada pela disfunção do SNC, hidrofobia e aerofobia, períodos de agitação, hiperexcitação, confusão mental, hiporreatividade e sonolência (HEMACHUDHA, 1989). Em alguns casos, o estágio de excitação é muito curto e, em quase todo o curso, predomina a raiva paralítica, decorrendo a morte. A enfermidade dura de 2 a 6 dias (ACHA e SZYFRES, 1986).

A Figura 7 mostra aspectos clínicos da raiva humana.



**Figura 7.** Vítima da raiva humana hospitalizada em contenção. Apresentando contrações súbitas dolorosas do diafragma e músculos acessórios do pescoço que causam espasmos inspiratórios longos e duráveis (da página **Rabies** mantida pelo CDC – *Centers for Disease Control and Prevention – Department of Health and Human Services web site*, 2005; <http://www.vaccineinformation.org/photos/rabicdc010.jpg>).

#### **4.10. Resposta imune do hospedeiro à infecção viral**

Os possíveis mecanismos, pelos quais anticorpos neutralizantes de vírus exercem seus efeitos, incluem neutralização extracelular de vírus, lise de células infectadas com vírus, mediada por complemento e citotoxicidade dependente de anticorpo (ROSE e WHITT, 2001; DAVIS e METZGER, 1983).

No curso da infecção natural pelo vírus rábico, entretanto, uma resposta imune adequada do hospedeiro é dificultada pelo extremo neurotropismo do vírus que, durante a maior parte do processo infeccioso, permanece protegido da vigilância do sistema imunológico. Assim, níveis consideráveis de anticorpos neutralizantes somente são exibidos no hospedeiro, após o vírus se replicar no cérebro, usualmente na fase terminal da doença, quando uma maior quantidade de antígenos é detectada pelo sistema imunológico (ROSE e WHITT, 2001; KING e TURNER, 1993).

Os vertebrados adquirem imunidade à infecção viral rábica, na maioria das vezes, da mesma forma que o fazem em outras infecções virais agudas. A infecção primária resulta em uma resposta imune humoral. Também há resposta imune celular, que ocorre principalmente nas infecções subagudas, como as pelo vírus rábico. Os anticorpos neutralizantes são direcionados principalmente a dois grupos de proteínas antigênicas: a proteína N, específica para o grupo viral; e a glicoproteína G, específica para o tipo viral (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER, 1996).

A glicoproteína G é o mais importante antígeno viral, visto que é o alvo de anticorpos neutralizantes e de células T citotóxicas, principais elementos da resposta imune protetora. Os antígenos proteicos do nucleocapsídeo (RNP), embora imunogênicos, possuem provavelmente importância limitada para a proteção do hospedeiro. Contudo, o complexo RNP é também um importante antígeno que induz a resposta específica vírus-anticorpo e, possivelmente, esses anticorpos induzidos contribuem para proteção contra a infecção viral rábica. No entanto, o mecanismo pelo qual esses anticorpos inibem a replicação viral ainda não está bem claro (ROSE e WHITT, 2001; LODMELL et al., 1993; NATHANSON e GONZALES-SCARANO, 1991).

Outros componentes importantes da resposta imune são as células T, efetoras da imunidade celular, que também auxiliam na indução da resposta das células B para a produção de anticorpos. Na infecção viral rábica, durante a imunidade mediada por célula, a resposta mais evidente é a das células T citotóxicas. As células T específicas para antígenos RNP podem aumentar a produção de anticorpos neutralizantes de vírus, através de um mecanismo conhecido como “reconhecimento intraestrutural de antígeno”, um importante fator mediador da resposta imune protetora induzida por RNP (ROSE e WHITT, 2001; NATHANSON e GONZALES-SCARANO, 1991).

A destruição de células infectadas é um dos importantes mecanismos da resposta imune. Células infectadas são alvos de anticorpos, complemento e células T citotóxicas; assim, o conjunto de mecanismos imunes efetores pode levar à destruição celular. Quando a destruição de células infectadas ocorre no início da infecção, a perda de poucas células é um preço modesto a se pagar na recuperação da doença. Entretanto, quando muitas células são infectadas, a destruição imune pode causar massiva necrose celular com doença severa e morte (ROSE e WHITT, 2001; NATHANSON e GONZALES-SCARANO, 1991).

O interferon é outro componente relevante na resposta de defesa do hospedeiro à infecção viral rábica. A produção de altos níveis de interferon no cérebro durante a infecção viral tem sido descrita, mas, não há correlação entre a sua presença e a eliminação de vírus rábico ou indução do estado de resistência. Parece que o interferon produzido no curso inicial da doença retarda o início da infecção viral rábica. (ROSE e WHITT, 2001; TSIANG, 1993; NATHANSON e GONZALES-SCARANO, 1991).

Wiktor e Koprowski (1967) demonstraram, *in vitro*, que culturas de células cronicamente infectadas com vírus rábico “fixo” produzem interferon, e que ciclos periódicos de altos e baixos, na produção de vírus rábico, estão relacionados aos níveis de síntese de interferon (WIKTOR e KOPROWSKI, 1967 citados por WIKTOR e CLARK, 1975).

#### **4.11. Diagnóstico**

O diagnóstico conclusivo da raiva exige o diagnóstico laboratorial, além de um exame clínico detalhado e um histórico completo do caso suspeito, com o estudo da situação epidemiológica na região que o envolve. Portanto, é imprescindível o envio de diversas regiões do sistema nervoso central (SNC) para as provas de imunofluorescência direta e isolamento viral em camundongo (prova biológica), atualmente, preconizadas, além do estudo histológico de regiões do SNC (LIMA et al., 2005).

##### **4.11.1. Diagnóstico clínico**

Embora seja muito difícil o diagnóstico da raiva apenas pelos dados clínicos aliados aos epidemiológicos, em muitas partes do mundo este tem sido o único meio utilizado para diagnosticar a virose. Somente com base nos sinais e sintomas, principalmente em animais e, em especial, no período prodrômico, a raiva é facilmente confundida com outras enfermidades, tornando o diagnóstico conclusivo impossível. Uma vez que o período prodrômico é bastante inespecífico e várias doenças que afetam o SNC apresentam sintomatologia parecida com a raiva, os testes laboratoriais devem ser realizados para confirmar uma suspeita clínica de raiva (BRASIL, 2005; LIEBERMANN, 1988).

##### **4.11.2. Diagnóstico laboratorial**

As peculiaridades da evolução da raiva e suas características clínicas iniciais pouco aparentes tornaram o diagnóstico laboratorial o ponto crucial na pronta determinação do agente infeccioso e, conseqüentemente, na atuação decisiva da escolha dos critérios terapêuticos para o infectado. Assim, técnicas rápidas e confiáveis, para detecção direta ou indireta do vírus rábico e/ou antígenos virais, são obviamente recomendadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; LIEBERMANN, 1988).

No diagnóstico laboratorial de quaisquer viroses há três abordagens básicas: o exame direto do material clínico para a presença do vírus e antígenos virais; o isolamento do vírus em sistemas celulares e a identificação por métodos virológicos; e a sorologia com a demonstração de significativo aumento de anticorpos durante o curso da doença. No diagnóstico *intravital* da raiva, a escolha das técnicas varia de acordo com o estágio da virose. As técnicas para a detecção de antígenos virais são sensíveis nos primeiros dias da infecção, já os anticorpos neutralizantes no liquor e no soro, aparecem em 7 a 10 dias após a infecção. No diagnóstico *postmortem*, pode-se empregar tanto técnicas histológicas como técnicas imunológicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; KUCERA e MYRVIK, 1985).

#### **4.11.2.1. Colheita e envio de amostras ao laboratório**

De modo geral, as regiões de eleição para a colheita de amostras do SNC são: corno de Ammon, tronco cerebral, tálamo, cerebelo e medula. Para a realização do isolamento viral e imunofluorescência, utiliza-se a amostra fresca, refrigerada ou congelada. As amostras devem ser embaladas em saco plástico duplo, etiquetado com o número do animal, a espécie, a data da colheita, o sexo, a idade e a procedência. Para o exame histopatológico, utiliza-se a amostra fixada em formalina tamponada a 10% (BARROS e MARQUES, 2003; KOTAIT et al., 1998).

Para a remoção do encéfalo da caixa craniana, primeiramente, desarticula-se a cabeça, depois se faz um corte a partir do forame magno, de forma que os ossos occipital e temporal sejam cortados dos lados direito e esquerdo. Outro corte é realizado traçando-se uma linha imaginária imediatamente após as apófises supraorbitárias dos ossos frontais, unindo-se o extremo caudal de um olho ao outro. Em seguida, retira-se a calota craniana. Com auxílio de tesoura e pinça, cortam-se as meninges longitudinalmente, rebate-se a dura-máter lateralmente e remove-se o cérebro juntamente com o cerebelo (BARROS e MARQUES, 2003; KOTAIT et al., 1998).

Em bovinos, quando não é possível abrir a caixa craniana, pode-se retirar fragmentos do cerebelo pelo forame magno, após a desarticulação do occipital com

o atlas. Para animais de pequeno porte, como cães e gatos, pode-se enviar a cabeça inteira e sem conservante, desde que não ultrapasse o período de 3 horas a partir da morte do animal até seu destino. Se demorar mais que 3 horas, deve-se enviar a cabeça refrigerada. Morcegos podem ser enviados inteiros e refrigerados (BARROS e MARQUES, 2003; KOTAIT et al. 1998).

As amostras do SNC colhidas devem ser embaladas em saco plástico, vedado hermeticamente, identificadas de forma clara e legível, não permitindo que a identificação se apague em contato com o gelo. No momento do envio ao laboratório, as amostras devem ser acondicionadas em caixa isotérmica para o transporte, com gelo normal ou reciclável, em quantidade suficiente para que cheguem bem conservadas ao seu destino, e acompanhadas de fichas com a identificação completa. A caixa deve ser rotulada, bem fechada, não permitindo vazamentos que possam contaminar quem a transporte. O modo de conservação depende do tempo (estimado) da remessa ao laboratório: até 24 horas – refrigerado; mais de 24 horas – congelado; na falta de condições adequadas de refrigeração, conservado em solução salina com glicerina a 50%. A qualidade do resultado laboratorial depende do estado de conservação do material enviado. Materiais autolisados interferem nas técnicas laboratoriais, muitas vezes tornando impossível a emissão do resultado (BARROS e MARQUES, 2003; KOTAIT et al. 1998).

#### **4.11.2.2. Detecção de antígenos virais**

Várias técnicas foram desenvolvidas para a detecção de antígenos do vírus rábico. Há mais de 30 anos, a detecção dos corpúsculos de Negri foi substituída pela detecção de antígenos específicos, pela técnica de imunofluorescência direta (*direct immunofluorescence technique* – DIF) ou pelo teste de anticorpo fluorescente direto (*direct fluorescent antibody test* – DFA ou FAT). Método rápido e sensível para diagnosticar a infecção viral rábica em animais e em seres humanos, a partir de impressões de tecido fresco e cortes de tecidos fixados ou em criomicrotomo (LIMA, 2005; DEAN et al., 1996). Recomendado como “padrão-ouro”, pela OMS e pela OIE, é o método mais amplamente utilizado para o diagnóstico da raiva, devido a sua

rapidez e acurácia (WHO, 1992). A principal vantagem desta técnica é a rapidez com que se obtêm os resultados (WHO, 1992; DEAN et al., 1996; WHITFIELD et al. 2001; WOLDEHIWET, 2005).

Bourhy e Sureau (1990) também preconizam a utilização da DIF no diagnóstico rotineiro da raiva em cultivo de células. Estes autores, na comparação das técnicas de detecção e isolamento de vírus rábico, afirmaram que a DIF é o método de referência para o diagnóstico laboratorial da raiva, possuindo sensibilidade ligeiramente superior ao isolamento viral (em camundongo – “prova biológica” ou em culturas de células). Contudo, ambos os métodos, DIF e isolamento viral, devem ser empregados complementarmente no diagnóstico laboratorial da raiva, de acordo com “as recomendações da OMS sobre a raiva” (WHO, 1992, 2004; BOURHY e SUREAU, 1990).

A DIF exerce um papel crítico na conduta médica de pessoas mordidas por animais suspeitos de estarem raivosos, pois possibilita uma determinação confiável da infecção em poucas horas, definindo o diagnóstico antes da administração do tratamento profilático para a raiva. O princípio fundamental do teste baseia-se na detecção de antígenos rábicos em tecidos, primariamente antígenos de nucleocapsídeos, intracitoplasmáticos, mediante o emprego de anticorpo específico marcado com isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo), e examinado em microscópio do tipo epifluorescente com luz que emite radiação energizante (luz ultravioleta). Esses antígenos aparecem sob várias formas e emitem fluorescência verde-amarelada brilhante, geralmente são ovalados ou arredondados, com as bordas lisas e mais intensamente brilhantes que a área central. Algumas destas inclusões são muito grandes, e provavelmente são os clássicos corpúsculos de Negri (TRIMARCHI e DEBBIE, 1991).

Alternativamente à DIF, pode-se realizar a detecção de antígeno rábico através de métodos imunoistoquímicos, imunoenzimáticos e hibridização *in situ* (WOLDEHIWET, 2005; ZIMMER et al., 1990; ANJARA e JHALA, 1985; KOTWAL e NARAYAN, 1985).

Os métodos imunoistoquímicos, basicamente, utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para o vírus em tecidos. Tais como, anticorpos primários e anticorpos espécie-específicos conjugados com peroxidase

ou avidina-biotina, como anticorpos secundários, fornecendo resultados tão sensíveis quanto a DIF (WOLDEHIWET, 2005; ANJARA e JHALA, 1985; KOTWAL e NARAYAN, 1985). Sua execução não requer equipamentos especializados e nem uma infraestrutura complexa. Tais características tornam a imunoistoquímica uma técnica ideal sob condições de campo, em que há uma limitação de laboratórios de diagnóstico, contribuindo, assim, com a vigilância epidemiológica da raiva em áreas de difícil acesso, nas quais os resultados podem definir a tomada de decisões em relação aos indivíduos agredidos (ARSLAN et al., 2004).

Outra vantagem apresentada pela técnica de imunoistoquímica é a segurança do pessoal de laboratório que trabalha diretamente com as amostras a serem analisadas, visto que a amostra colocada em solução de formol a 10%, torna o vírus inativo. Após a fixação do material nessa solução e emblocamento em parafina, este pode ser manipulado sem maiores riscos. Além disso, o material conservado em parafina fica preservado por tempo ilimitado, possibilitando, assim, estudos retrospectivos, o que é mais difícil em amostras congeladas, devido aos vários congelamentos e descongelamentos do material, o que pode muitas vezes resultar na inviabilidade da amostra (WOLDEHIWET, 2005; BOURGAN e CHARLTON, 1987).

A imunoistoquímica constitui, portanto, um método rápido de diagnóstico que pode ser usado na rotina, em cujos casos, inicialmente, houver suspeita de raiva (MACHADO et al., 2004). Especialmente, em casos nos quais fragmentos de cérebro submetidos ao laboratório foram fixados em formol, impossibilitando a realização da DIF ou a inoculação intracerebral em camundongo. Por vezes, a detecção de antígenos do vírus rábico por imunoistoquímica tem sido relatada mesmo em tecido nervoso em processo de autólise (ARSLAN et al., 2004). Estudos feitos com materiais deteriorados comprovaram que o primeiro exame que resulta em falso-negativo é a detecção dos corpúsculos de Negri, seguido pela inoculação em camundongo e, por último, a DIF (FERNANDES e RIET-CORREA, 2007).

Estudos indicam que a detecção de antígenos da raiva através da técnica de imunoistoquímica é mais sensível do que a detecção de corpúsculos de Negri visualizados pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) e tão sensível quanto a DIF

(WOLDEHIWET, 2005). Outros estudos ainda indicam uma maior sensibilidade da imunistoquímica em relação à DIF (BOURGAN e CHARLTON, 1987).

A técnica de imunistoquímica, permitindo o uso de tecidos fixados em formol, possibilita o envio das amostras ao laboratório, quando as condições de refrigeração e transporte são inadequadas (HAMIR e MOSER, 1994). Além disso, esta técnica pode ser também usada, particularmente em estudos retrospectivos, quando tecidos frescos ou congelados não podem ser avaliados ou quando as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente. (ARSLAN et al., 2004).

Os métodos imunoenzimáticos (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA, *enzyme immunoassay* – EIA e *rapid rabies enzyme immuno-diagnosis* – RREID), basicamente, consistem na detecção de antígenos do nucleocapsídeo. Anticorpos IgG de coelho antinucleocapsídeo viral são sensibilizados em microplacas de poliestireno e usados para capturar o antígeno no material suspeito, seguido do mesmo anticorpo conjugado à peroxidase para demonstrar ligação específica. Podem ser usados para detecção de antígenos em amostras em decomposição, as quais são inadequadas para a DIF (BOURHY e PERRIN, 1996; SAXENA et al., 1989).

O imunodiagnóstico enzimático rápido da raiva (RREID), além de ser uma reação com resultados rápidos e facilmente obtidos (BOURHY e PERRIN, 1996), consiste na detecção de antígenos de nucleocapsídeos presentes no SNC, através de anticorpos conjugados com uma enzima (peroxidase) que, por sua vez, são revelados por um substrato cromogênico. A intensidade da cor da reação é diretamente relacionada à quantidade de antígeno presente, que pode ser detectado visualmente ou por meio de espectrofotômetro (SUREAU et al., 1991; PERRIN et al., 1986).

Variações foram introduzidas no RREID e, além de estas ampliarem a sensibilidade da técnica, pelo acoplamento de biotina ao anticorpo antinucleocapsídeo, seguido da adição de estreptavidina conjugada à peroxidase – RREIDbiot - aumentaram o espectro de detecção do gênero *Lyssavirus*, pela utilização de anticorpo policlonal contra vários sorotipos do vírus – RREIDlyssa (BOURHY e PERRIN, 1996; BOURHY e SUREAU, 1990). O RREID é comparável

em especificidade e sensibilidade à DIF, com a vantagem de não ser necessário o microscópio de fluorescência. A OMS também cita que o RREID pode ser usado para examinar amostras de tecidos parcialmente decompostos, o que pode ser muito útil em levantamentos epidemiológicos. Além disso, o RREID *kit* teste possui a praticidade de poder ser transportado ao campo, acondicionado em estojos especiais, para o diagnóstico *in loco* (WHO, 1992).

Outra forma alternativa de detectar o vírus rábico é através da técnica de hibridização *in situ*, que utiliza sondas RNA de fita simples (RNAfs), cujo alvo é o RNA genômico ou o RNA mensageiro (RNAm), codificante para uma ou todas as cinco proteínas virais (WARNER et al., 1997; JACKSON et al., 1989).

O vírus rábico pode ser também detectado por meio do ensaio de aglutinação em látex, no qual são utilizadas partículas de látex revestidas com anticorpo antirrábico IgG purificado de soro equino hiperimune. Os resultados obtidos com essa técnica mostraram sensibilidade e especificidade altas. Uma modificação da técnica pode ser utilizada para a dosagem de anticorpos neutralizantes (WOLDEHIWET, 2005; KASEMPIMOLPORN et al., 2000).

Com a clonagem e o sequenciamento do genoma do vírus rábico, além da confirmação diagnóstica do mesmo e de *Lyssavirus* relacionados, tornou-se possível também sua caracterização molecular e epidemiológica, utilizando-se sondas de ácidos nucleicos ou iniciadores (*primers*) específicos para um ou mais genes. A detecção de ácidos nucleicos, por técnicas moleculares, é particularmente importante em espécimes com avançado estado de decomposição e em amostras fluidas (como saliva e fluido cérebro espinhal), além de reduzir em horas o tempo requerido para o estabelecimento do diagnóstico. Os iniciadores utilizados visam, como principal alvo, ao gene da nucleoproteína, em virtude de ser o mais conservado entre todos nas espécies de *Lyssavirus* (DAVID et al., 2002; CREPIN et al., 1998).

#### 4.11.2.3. Inoculação em camundongo (prova biológica)

O teste de inoculação em camundongo (*mouse inoculation test* – MIT), por via intracerebral (IC), para o isolamento de vírus rábico, também conhecido como “prova biológica”, foi introduzido por Webster e Dawson (1935 citados por RUDD et al., 1980). Até hoje, é usado como importante prova de apoio ao diagnóstico da raiva, especialmente em casos de exposição humana frente à DIF negativa. Embora seja sensível e fácil de realizar, o MIT apresenta uma grande desvantagem: o período de incubação de amostras de vírus rábico de “rua” (cepas originais isoladas, sem modificação em laboratório) é tipicamente longo e pode variar de 7 a 28 dias. Assim, não é possível esperar pelo resultado desta prova para iniciar o tratamento no paciente exposto ao vírus rábico. Portanto, o isolamento de vírus de “rua” em culturas de células e a detecção de seus antígenos por diferentes métodos vêm sendo estudados para apressar o diagnóstico da raiva (KING, 1996; KING e TURNER, 1993; RUDD et al., 1980).

No diagnóstico rotineiro da raiva, os camundongos desmamados, com 21 a 30 dias e pesando de 9 a 15 g, são preferidos, embora os camundongos lactentes, abaixo de 4 dias de idade, sejam mais susceptíveis. O camundongo albino suíço é a estirpe selecionada. Segundo Koprowski (1996), os sintomas frequentemente observados após o 5º dia da inoculação intracerebral (IC) de vírus rábico são: pelos eriçados, tremor ao ser suspenso pelo rabo, falta de coordenação das patas posteriores, paralisia, prostração e morte. A morte do animal antes do 5º dia pós-inoculação (p.i.) é considerada inespecífica (ATANASIU, 1975; KOPROWSKI, 1996).

Em infecções com cepas de “rua”, os sintomas surgem de 9 a 12 dias p.i. IC, frequentemente, com paralisia. No entanto, camundongos podem apresentar a forma furiosa, a forma paralítica, ou a forma espasmódica da raiva com morte súbita, após um período curto de agitação. As cepas de “rua” em camundongos, raramente, provocam a forma furiosa, em que eles atacam pessoas ou objetos. No camundongo, o vírus também pode ser excretado pela pele do nariz, papilas da língua e intestinos, além das glândulas salivares (ATANASIU, 1975).

Segundo Webster (1942 citado por CUNHA, 1968), os camundongos inoculados pela via IC com vírus rábico, usualmente, mostram corpúsculos de Negri

após o 5<sup>o</sup> ou 6<sup>o</sup> dia e apresentam os primeiros sintomas de raiva entre o 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia p.i. IC. A doença clínica em camundongos dura de 1 a 3 dias, e o PI pode variar comumente de 7 a 20 dias, entretanto, durante o MIT, os animais devem ser observados preferencialmente até 28 dias. O período de incubação (PI) da raiva no camundongo lactente varia entre 5 e 10 dias, e os sinais de infecção são poucos, mas a morte pode ocorrer até o 21<sup>o</sup> dia p.i. IC (SUREAU et al., 1991; BOURHY e SUREAU, 1990; CUNHA, 1968).

Sureau et al. (1991) destacam que sinais clínicos “típicos” em camundongos não são suficientes para determinar o diagnóstico de raiva. Assim, deve-se examinar o cérebro destes animais pela DIF, ou para a detecção de corpúsculos de Negri, ou ainda pela prova do índice de neutralização viral, utilizando-se soro antirrábico de referência, para a confirmação do diagnóstico da virose (SUREAU et al., 1991).

Mais recentemente, o MIT já vem sendo substituído por bioensaios em sistemas de cultura de células, nos quais o vírus rábico pode ser isolado *postmortem* de tecido cerebral, além de utilizar glândulas salivares e saliva, pele e fluido cérebro-espinhal para o diagnóstico *intravitam* em humanos e *antemortem* em animais. Essa substituição tem sido gradativa e vem ocorrendo em virtude do baixo custo, da relativa sensibilidade e da redução substancial do tempo requerido para a obtenção dos resultados: de até 30 dias no MIT para 4 a 5 dias em cultura de células, além de dispensar o uso de animais. A linhagem celular que se mostrou mais susceptível para o isolamento do vírus é a de neuroblastoma murino C-1300 (N2A), produzindo resultados em 5 dias, com sensibilidade semelhante à do MIT para vírus “fixo” e “de rua” (WOLDEHIWET, 2005).

#### **4.11.2.4. Inoculação em culturas de células**

Há quase 50 anos, Enders et al. (1949 citados por SCHMIDT, 1979) descobriram que os poliovírus poderiam replicar-se em culturas de células de origem não-neural, estimulando o uso extensivo de culturas *in vitro* para propagação de vírus humanos e animais. Vieuchange et al. (1956 citados por KISSLING, 1958) foram os primeiros a propagar o vírus rábico em cultura de células de origem não-

neural. Kissling (1958), subsequentemente, relatou a passagem seriada de vírus rábico “fixo” e de “rua” em células de tecido primário de rim de *hamster*. Posteriores relatos de replicações bem sucedidas de ambas as cepas, “fixa” e de “rua”, em cultura de células de várias origens, tornaram-se mais numerosos (CELER et al., 1991; SCHMIDT, 1979; KISSLING, 1958).

Segundo os autores, grande atenção foi voltada para a obtenção de maior quantidade de vírus (“massa viral”) para a produção de vacina de uso humano e animal e, com este propósito, cepas de vírus “fixo” foram adaptadas a diversas culturas celulares, dentre as quais destaca Roumiantzeff et al. (1985) em seu trabalho: células primárias de rim de hamster (*hamster kidney cells* – HKC), de rim de feto bovino (*foetal calf kidney cells* – FCKC), de rim de cão (*dog kidney cells* – DKC), de embrião de galinha (*primary chicken embryo cells* – PCEC), e de embrião de codorna japonesa (*japanese quail embryo cells* – JQEC); em linhagem de células diplóides humanas WI-38 (*human diploid cell strain* – HDCS); em linhagem contínua de fibroblasto renal de hamster neonato (*baby hamster kidney* – BHK21), e de epitélio renal de macaco verde africano (*african green monkey kidney epithelia cells* – VERO). De acordo com Clark (1979), aproximadamente todas as linhagens de células de mamíferos e aves testadas podem ser infectadas com o vírus rábico, embora muitos sistemas requeiram prolongados períodos de adaptação antes da obtenção de altas produções de vírus (KING e TURNER, 1993; WHO, 1992; ROUMIANTZEFF et al., 1985; CLARK, 1979).

Tem sido amplamente admitido que cepas de vírus rábico de “rua” possuem baixa eficiência em infectar culturas de células, e crescem lentamente *in vitro*, dificultando sua utilização no diagnóstico da raiva. Entretanto, novas possibilidades surgiram a partir da demonstração de Largui et al. (1975), ao aumentarem consideravelmente a sensibilidade das células BHK21C13 (BHK n<sup>o</sup>. 21 clone 13) à infecção de amostras de vírus rábico de “rua”, mediante a adição de diethylaminoethyl (DEAE)-dextran. Rudd et al. (1980) mostraram também que células BHK21C13 sensibilizadas com DEAE-dextran têm igual sensibilidade ao teste de inoculação em camundongo (prova biológica) para vírus rábico de “rua” (LARGUI et al., 1975; RUDD et al., 1980).

Smith et al. (1978) evidenciaram que os vírus de “rua” poderiam ser facilmente isolados nas linhagens contínuas e de neuroblastoma murino (clone N18), abreviando o tempo de diagnóstico da raiva em relação à inoculação em camundongos. Em um estudo comparativo entre as linhagens BHK21C13 e de neuroblastoma murino C-1300 (clone N2 A), Rudd e Trimarchi (1987) constataram a maior sensibilidade da linhagem de origem neural à infecção por vírus rábico de “rua”, sendo tão sensível quanto à inoculação em camundongos. Este fato já havia sido constatado por Webster (1986). A grande vantagem de se trabalhar com a linhagem celular de neuroblastoma murino (N2A), para evidenciação do efeito citopático (*cytophatic effect* – CPE), é devido ao fato de as células serem morfológica e fisiologicamente semelhantes às células nervosas, e possuírem a capacidade de divisão por serem de origem tumoral (RUDD e TRIMARCHI, 1989; WEBSTER, 1986; SMITH et al., 1978).

Rudd e Trimarchi (1989), em seu vasto estudo sob diversos aspectos do isolamento de vírus de “rua”, em amostras de cérebro de animais com neuroblastoma murino C-1300, constataram as reais possibilidades do teste da infecção de cultura de tecido à raiva (*rabies tissue culture infection test* – RTCIT), como alternativa à inoculação em camundongos (RUDD e TRIMARCHI, 1989).

Atualmente, a OMS considera a linhagem celular de neuroblastoma murino (N2A) tão eficaz, no isolamento de vírus rábico de “rua”, quanto a inoculação em camundongos, além de reduzir consideravelmente o tempo necessário para o diagnóstico da raiva (WHO, 2004; KING, 1996).

Alguns fatores podem afetar profundamente o desempenho do vírus rábico em culturas celulares. A produção de vírus rábico é inibida em meio ácido; a faixa ótima de pH do meio de cultura deve ser mantida entre 7,6 e 8,0 (BOURHY e SUREAU, 1990; CLARK, 1979; WIKTOR, 1976). Similarmente, a temperatura exerce importante efeito na produção de vírus, sendo a faixa aceitável de 30 a 38°C, e a temperatura ótima entre 32 e 33°C (WIKTOR e CLARK, 1975).

Uma característica frequentemente citada é a não ocorrência do CPE, isto é, efeito da replicação viral em monocamadas de cultura de células infectadas com vírus rábico (WIKTOR e CLARK, 1975; HUMMELER e KOPROWSKI, 1969). Contudo, tem sido relatada a lise de células em cultura, após algumas passagens

seriadas de vírus rábico (WIKTOR e CLARK, 1975), comumente em BHK21C13 (WIKTOR, 1976), em VERO (RIFKY, 1987), em McCoy (NOGUEIRA, 1992) e, mais recentemente, em N2A (KING, 1996).

Outra característica importante é a observação nítida de inclusões intracitoplasmáticas de coloração amarelo-esverdeada na DIF (SUREAU et al., 1991; BOURHY e SUREAU, 1990). No entanto, conforme caracterizado por Trimarchi e Debbie (1991), a utilização de anticorpo monoclonal glicoproteico determina a visualização de pontos fluorescentes sobre a membrana celular; inversamente, com a utilização de anticorpo monoclonal para nucleocapsídeo, os grânulos fluorescentes aparecem no citoplasma celular (TRIMARCHI e DEBBIE, 1991; SUREAU et al., 1991; BOURHY e SUREAU, 1990).

#### **4.11.2.5. Demonstração do corpúsculo de Negri**

Adelchi Negri (1903) observou a presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas em tecidos cerebrais infectados, denominadas posteriormente de corpúsculos de Negri, de caráter patognomônico para raiva, representando um diagnóstico definitivo. Entretanto, esses corpúsculos, em cortes histológicos, são detectados em apenas 50 a 80% dos animais infectados, sendo, dessa forma, necessária a utilização de técnicas imunológicas para obtenção de resultados fidedignos (WOLDEHIWET, 2005; JOGAI et al., 2000; TRIMARCHI e DEBBIE, 1991).

Nos procedimentos histológicos de esfregaços e impressões de amostras frescas para exames de corpúsculos de Negri, comumente usa-se o corante de Sellers. Nas amostras fixadas em formalina tamponada, posteriormente embebidas em parafina, o melhor método na procura de corpúsculos de Negri é de hematoxilina-eosina (HE), mas o corante de Mann pode também ser usado (TRIMARCHI e DEBBIE, 1991).

Corpúsculos de Negri são inclusões intracitoplasmáticas, redondas ou ovais, fortemente refringentes e acidófilas, coradas em magenta com HE e Sellers, e em vermelho cereja com corante de Mann, variando de 0,24 a 27  $\mu\text{m}$  em tamanho, com

média de 2 a 6  $\mu\text{m}$ , quando grânulos azuis profundos podem ser observados na matriz dos corpúsculos, que nunca são intranucleares. Os corpúsculos de Negri são maiores e mais numerosos, quando o período de incubação e a fase clínica da doença são longos. São encontrados mais frequentemente na raiva experimental e variam de tamanho e número, de acordo com a cepa viral. No homem, estas inclusões intracitoplasmáticas são encontradas com maior frequência, em ordem decrescente, nas células de Purkinje do cerebelo, nas células piramidais do corno de Ammon e no córtex. Em carnívoros, são mais frequentes no hipocampo (corno de Ammon) e, em ruminantes, nas células de Purkinje do cerebelo (SUREAU et al., 1991; RUSSEL e EDINGTON, 1985).

Destaca-se a citação de Schneider e Diringer (1976) a respeito de o vírus rábico “fixo” não induzir a formação de corpúsculos de Negri. Neste sentido, Hummeler e Koprowski (1969) observaram em microscópio eletrônico que vírus rábico de “rua” produzem grandes agregados de nucleoproteínas no citoplasma das células, o mesmo não ocorrendo com vírus “fixo” que resultaram em poucas e pequenas inclusões. Estudos de microscopia eletrônica e de imunofluorescência mostraram que o corpúsculo de Negri consiste de uma matriz reticulogranular, contendo estruturas tubulares contíguas com partículas virais em maturação (SCHNEIDER e DIRINGER, 1976; HUMMELER e KOPROWSKI, 1969).

#### **4.11.2.6. Técnicas moleculares**

O presente tópico mostra uma pequena revisão sobre as técnicas de biologia molecular desenvolvidas nos últimos anos, tendo como princípio o estudo de diferentes polimorfismos de DNA, para a identificação precisa de isolados do vírus rábico. Uma vez que, análises com finalidade identificatória de componentes caracterizadores de isolados do vírus rábico, têm sido utilizadas com sucesso nos últimos anos, em decorrência do acelerado avanço das técnicas de biologia molecular para análise do genoma viral. Avanço que possibilitou, em 1981, o relato da primeira sequência dos genes do vírus rábico e o estabelecimento das bases para a classificação definitiva do vírus, mediante análise antigênica comparativa

(WUNNER et al., 1988). Do mesmo modo, possibilitou que a estrutura molecular fosse identificada e o genoma viral fosse codificado, estabelecendo a correlação entre as sequências do ácido nucleico primário e aminoácidos, e propriedades biológicas e imunológicas do vírus rábico (NATARAJAN et al., 1992; WUNNER et al., 1988).

Também foi possível, utilizando os recursos da biologia molecular, determinar a extensão total do nucleotídeo dos genes estruturais, nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), matriz proteica (M) e glicoproteína (G) e, em parte, da transcriptase (L). Bem como, descrever suas estruturas e funções; mapear e definir os sítios antigênicos; reconhecer as exigências estruturais necessárias para a atividade imunogênica; constatar as diferenças de qualidade entre o antígeno solúvel e a glicoproteína inteira; identificar as regiões imunogênicas essenciais para a indução de anticorpos neutralizantes; e comprovar que fragmentos de peptídeos podem ser utilizados como determinantes antigênicos para linfócitos B e T (SINCHAISRI et al., 1992; FRONTINI et al., 1992; BOURHY, 1990; GERMANO et al., 1988; WUNNER et al., 1988).

Os estudos moleculares sobre o vírus rábico têm demonstrado, claramente, a importância da obtenção de sequências nucleotídicas que possibilitem traçar estratégias moleculares para uma detecção rápida, sensível e específica do vírus. Molecularmente, o gene N vem sendo amplamente utilizado, pois ressalta pequenas variações filogenéticas, que permitem identificar diferentes variantes virais (HEATON et al., 1997). Este fato permite uma abordagem mais completa acerca da caracterização viral, bem como o reconhecimento do relacionamento de espécies hospedeiras e sua distribuição geográfica, dentre outros, o que tem contribuído de forma decisiva para a compreensão da epidemiologia molecular da raiva (NADIN-DAVIS, 1998; BADRANE e TORDO, 2001).

Logo, as pesquisas efetuadas com base na biologia molecular têm sido de relevante importância, não só para complementar o diagnóstico virológico, como para os conhecimentos sobre a epidemiologia, a imunologia e a patogênese da infecção rábica. Além disso, sua relevância para a determinação da variabilidade genética do vírus rábico, inclusive entre cepas e isolados deste, e para o

esclarecimento dos mecanismos de replicação e transmissão viral (WUNNER et al., 1988).

A biologia molecular nasceu em novembro de 1943, com a publicação de um artigo na revista *Genetics*, assinado por Salvadore Luria e Max Delbrück, com o título “*Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance*”. No final da década de 1950, Arthur Kornberg identificou e purificou a enzima DNA polimerase. Verificou-se que a replicação do DNA era auxiliada por inúmeros tipos de enzimas e fatores, mais tarde revelados, tais como: DNA topoisomerasas, helicases, proteínas de proteção contra degradação do DNA quando na forma monofilamentar, ligases, primases, etc. O dogma central define o paradigma da biologia molecular, em que a informação é perpetuada por meio da replicação do DNA e é traduzida por dois processos: a transcrição que converte a informação do DNA em uma forma mais acessível (uma fita de RNA complementar), e pela tradução que converte a informação contida no RNA em proteínas (KONEMAM et al., 2001).

As primeiras técnicas moleculares, utilizadas há mais de duas décadas, são fundamentadas na extração e tratamento de ácidos nucleicos e, dentre estas, pode-se destacar: análise de DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição (*restriction endonuclease analysis* – REA); ribotipagem (*ribotyping*); análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (*fragment length polymorphism* – RFLP); eletroforese em gel de campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE); *western blot*; e *fingerprinting*. O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR), em 1985, por Kary Banks Mullis, tornou possível a análise de pequenos fragmentos de DNA, aumentando assim as chances de sucesso nas investigações moleculares. Em 1989, a *Hoffman La Roche & Perkin-Elmer Corporation* patenteou este processo. O impacto da PCR e dos métodos dela derivados levaram Mullis, Bioquímico norte-americano, a ser laureado com o Prêmio Nobel de Química de 1993. Ao longo do tempo, a técnica de PCR foi-se aperfeiçoando e, hoje, há derivações desta sendo usadas para a detecção e identificação do vírus rábico. Dentre as derivações da técnica de PCR, pode-se destacar: DNA polimórfico amplificado ao acaso (*restriction fragment length polymorphism* – RAPD-PCR); transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (*reverse transcription-polymerase chain reaction* –

RT-PCR); *nested* PCR; *multiplex* PCR; e *real-time* PCR (KONEMAM et al, 2001; MULLIS e FALLOONA, 1987; SAIKI et al., 1985).

Desde a sua concepção, a PCR causou uma verdadeira revolução na biologia molecular, tanto na pesquisa, visando ao entendimento de processos biológicos fundamentais, quanto nas áreas aplicadas, envolvendo diagnóstico e melhoramento genético de animais domésticos e plantas. A PCR é usada habitualmente nos laboratórios de investigação para uma variedade de tarefas, como a construção de árvores filogenéticas (árvores de relação entre espécies), a clonagem de genes, teste de paternidade e exames para detecção de agentes patogênicos, como os vírus. É uma técnica altamente sensível, por meio da qual, são obtidas milhões de cópias de sequências de ácidos nucleicos, por meio de uma reação enzimática, a partir de diminutas quantidades de sequências de DNA ou de RNA específicas. Esta técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA, por meio da ação da enzima *Taq* DNA polimerase, e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA-molde. Apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como, maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação. Tal técnica é realizada, em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (KONEMAM et al, 2001; MULLIS, 1991)

A rapidez, a versatilidade e a sensibilidade tornam a PCR particularmente poderosa para os estudos moleculares que dispõem de grande número de indivíduos. PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (*primers*), que delimitam a amplificação da sequência de DNA-alvo. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região-alvo (MULLIS, 1991; SAIKI et al., 1988).

Nos experimentos iniciais de PCR, utilizou-se a enzima DNA polimerase de *Escherichia coli*, cuja temperatura ótima de polimerização é a de 37°C. Ela era adicionada manualmente a cada ciclo de amplificação, uma vez que, sendo termicamente lábil, era destruída quando a temperatura elevava-se para 95°C, a fim de promover a desnaturação do DNA-molde. O passo decisivo, para a expansão da técnica de PCR, ocorreu quando Saiki et al. (1988) isolaram uma DNA polimerase (*Taq* DNA polimerase) de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que vive em fontes térmicas, polimeriza a 72°C, mantendo, assim, a atividade por algumas horas a 95°C. Isto possibilitou a completa automatização do processo de PCR (SAIKI et al., 1988).

Nos experimentos atuais de PCR, sabe-se que um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA-alvo é desnaturada mediante a elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as sequências complementares que flanqueiam a região-alvo. Em seguida, a temperatura é elevada a 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos, utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da sequência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência-alvo. Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas – pg; ou nanogramas – ng) e terminar a reação com grande quantidade de DNA de uma sequência específica de interesse (KONEMAM et al, 2001; MULLIS, 1991).

Um dos aspectos fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de se gerar grande quantidade de DNA de segmentos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu, diretamente em gel de eletroforese, por meio de corantes específicos para DNA (ex. brometo de

etídeo). Entretanto, a técnica de PCR ainda apresentava uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares anônimos distribuídos pelo genoma. A construção de *primers* para a amplificação, via PCR, dependia essencialmente do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a sequência de DNA de interesse. Para se conhecer estas sequências, são necessários a clonagem e o sequenciamento da região. Em vista disso, com exceção de alguns genes de sequência conhecida, a PCR apresentou, de início, um uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares. Grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizarem *primers* mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da sequência (TANG e PERSING, 1999; WELSH e MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990).

Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR. Uma destas derivações é a tecnologia do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma, utilizando-se *primers* de sequência arbitrária. RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) ou AP-PCR (*arbitrarily primed PCR*) foi descrita, originalmente, por Welsh e McClelland (1990), e envolve o uso de um *primer* único e pequeno (usualmente de 10 a 15 bases), arbitrariamente escolhido, para amplificar DNA genômico em condições de baixa estringência, não sendo necessário o conhecimento prévio da região de ligação do *primer* (TANG e PERSING, 1999; WELSH e MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990).

Essa técnica foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos nos Estados Unidos. Williams et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), DNA polimórfico amplificado ao acaso. No trabalho clássico, este grupo descreveu a técnica no contexto da análise Mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento. Welsh e McClelland (1990), por sua vez, propuseram a denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de *arbitrarily primed PCR* (AP-PCR), uma vez que os *primers* possuem sequência arbitrária, mas, tecnicamente, a amplificação não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos

no genoma. O experimento deste grupo foi, essencialmente, a geração de *fingerprints* (impressões digitais) genômicos simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando-se géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução, juntamente com *primers* um pouco mais longos. Independentemente do nome utilizado e das pequenas variações na metodologia, a técnica de PCR com o uso de *primers* de sequência arbitrária abriu uma perspectiva inteiramente nova para as análises genômicas (WELSH e MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990).

Quando submetidos à PCR, estes *primers* arbitrários resultarão na amplificação de uma ou mais sequências de DNA, gerando conjuntos de fragmentos que funcionam como marcadores genéticos. O número e o tamanho destes fragmentos são a base da tipagem de isolado de vírus e micro-organismos. A principal vantagem da RAPD sobre a PCR tradicional é a possibilidade de detectar polimorfismos do DNA, sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos de um gene relevante ou do DNA-alvo. Entretanto, a escolha dos *primers* que originem resultados reprodutíveis é um pouco trabalhosa, exigindo, muitas vezes, o teste de dezenas destes. Por isso, raros são os estudos realizados utilizando esta técnica na Virologia (KONEMAM et al., 2001; MASLOW et al., 1993).

Dentre as variações da técnica de PCR tradicional que foram descritas, uma destas é a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), desenvolvida para amplificar DNA obtido por meio da transcrição reversa de RNA. Para tal, primeiramente, o RNA é convertido em DNA complementar (c-DNA), pela ação da enzima transcriptase reversa (RT), e o c-DNA é amplificado por PCR. RT-PCR tem sido utilizada na análise de expressão de genes (de virulência e/ou produção de toxinas) e possui ampla aplicação para o estudo de RNA viral (KONEMAM et al, 2001; TANG E PERSING, 1999).

O diagnóstico genético de vírus rábico é normalmente realizado por demonstração direta do gene N (da nucleoproteína do vírus), por meio de RT-PCR ou, indiretamente, pela realização de hibridação, após amplificação por RT-PCR. RT-PCR, em um diagnóstico *antemortem*, permite a detecção precoce da infecção e a profilaxia pós-exposição, esta para as pessoas expostas ao vírus rábico (CREPIN et al., 1998; SACRAMENTO et al., 1991).

Em geral, o sequenciamento do DNA é utilizado para realizar a tipificação genética de vírus rábico e, frequentemente, é utilizado em epidemiologia molecular. No entanto, a utilização de um painel de anticorpos monoclonais é de fundamental importância, para que a detecção imunológica seja segura e indicativa de mudanças genéticas não silenciosas (CARNIELI Jr. et al., 2005; NADIN-DAVIS et al., 1993).

Anticorpos monoclonais (Mabs) contra o vírus rábico foram produzidos pela primeira vez por Wiktor e Koprowski (1978) e estes atuam na glicoproteína ou no nucleocapsídeo viral (WIKTOR e KOPROWSKI, 1978). Com esta técnica, foi possível caracterizar e classificar o vírus rábico e os vírus relacionados, além de permitir a diferenciação de vírus isolados de hospedeiros terrestres e de morcegos nos Estados Unidos, Europa, Ásia, África e na América Latina. Embora tal técnica seja usada principalmente em investigações epidemiológicas, tem-se mostrado útil no diagnóstico em certas circunstâncias, como nos casos de raiva humana “importada” e em casos sem histórico de exposição (KAPLAN et al., 1996; SMITH et al., 1991). Atualmente, há um painel com oito Mabs antinucleoproteína, produzido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, GA, USA), para a caracterização antigênica de isolados do vírus rábico da América Latina e Caribe. Vários pesquisadores têm feito novas descobertas utilizando-se do teste de Mabs, tanto na América Latina e Caribe, como no Brasil (FAVORETTO et al., 2002).

A RT-PCR não apresenta especificidade suficiente em amostras muito degradadas, porque podem ocorrer migrações de bandas inespecíficas. Contudo, os produtos amplificados hibridizados com sondas, acompanhando *southern blot*, caracterizam bandas específicas e inespecíficas (NADIN-DAVIS et al., 1993; SACRAMENTO et al., 1991). Assim, a utilização simultânea de RT-PCR e sondas evita o risco de resultados falso-positivos em diagnósticos, por aumentar a sensibilidade e a especificidade (WHITBY et al., 1997a; 1997b).

Dantas Junior et al. (2004) propuseram a implantação de um protocolo de amplificação genômica, precedida de transcrição reversa (RT-PCR) para o gene N do vírus rábico. Neste estudo, foram utilizadas 50 amostras de tecido encefálico de animais (44 bovinos, 5 equinos e 1 quiróptero), provenientes do Estado do Rio de Janeiro, positivos por imunofluorescência direta e/ou prova biológica para o vírus rábico. A extração do RNA foi feita a partir da suspensão a 10% em PBS pH 7,2 do

tecido encefálico, utilizando-se a metodologia de *TRizol<sup>®</sup> Reagent* (Life Technologies™) e o protocolo de RT-PCR descrito por Heaton et al. (1997), incluindo algumas modificações (HEATON et al., 1997). Dentre as 50 amostras analisadas, 50 foram positivas pela prova biológica e pela RT-PCR e, destas, 49 foram positivas pela imunofluorescência direta. Esses resultados demonstram ser este protocolo de RT-PCR uma metodologia sensível, específica, rápida e extremamente valiosa, podendo ser utilizada como rotina em laboratórios que trabalham no diagnóstico de vírus rábico (DANTAS JUNIOR et al. 2004)

O gene N é a região mais conservada no genoma do vírus rábico e, por isso, é o alvo para o diagnóstico molecular (BADRANE e TORDO., 2001). Carnieli Jr. et al. (2006) produziram uma sonda marcada com digoxigenina, a partir da amostra *Pasteur virus* (PV), para a detecção do gene N do vírus rábico. A amostra PV, usada para produção da sonda de N, uma vez que é uma cepa vacinal extensamente usada, teoricamente, possui características antigênicas e genéticas semelhantes para um número grande de populações de vírus rábico circulantes. A hibridação da sonda foi efetuada em amplificadores do gene N obtidos, mediante a técnica de RT-PCR, e os resultados de RT-PCR e hibridação foram 100% concordantes. Neste estudo, concluiu-se que a hibridação, quando realizada em produtos amplificados por RT-PCR, aumenta ainda mais a sensibilidade desta técnica e confere especificidade ao diagnóstico. Os resultados deste estudo mostram que a sonda produzida permitiu a detecção do gene N em amostras positivas das duas mais importantes populações de reservatórios da raiva: cães e morcegos vampiros. A técnica descrita neste estudo poderia ser útil em laboratórios de diagnóstico da raiva, uma vez que tem custo compatível com as técnicas tradicionais para este diagnóstico (CARNIELI Jr. et al., 2006).

O estudo de Castilho et. al. (2008) descreveu o primeiro isolamento do vírus da raiva em um morcego insetívoro *Eumops perotis*, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo (CASTILHO et. al., 2008). O vírus foi identificado pelo teste de imunofluorescência direta (DIF) em amostras de sistema nervoso central (SNC), e o isolamento foi realizado em cultura de células N2A e em camundongos adultos. O isolado foi submetido à tipificação antigênica, utilizando-se de um painel de oito Mabs (CDC/Atlanta/USA). A sequência de DNA do gene da nucleoproteína,

localizada entre os nucleotídeos 102 a 1.385, foi alinhada com sequências homólogas presentes no *GenBank*, usando o método *CLUSTALW*, e o alinhamento foi utilizado para a construção da árvore filogenética de distância *Neighbor-Joining* com o modelo *Kimura-2-Parameters*. RT e PCR foram realizadas com o *primer* senso 21G e o *primer* antissenso 304, como, previamente, descrito (ORCIARI et al., 2001).

Neste estudo, para RT-PCR e sequenciamento do DNA, o RNA total foi extraído do SNC do morcego com *TRIZO<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>™</sup>)*, de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas do vírus fixo *Challenge virus standard (CVS)* e água foram usadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Selecionou-se o par de *primers* 21G-sense (5'-ATGTAACACCTCTACAATG-3') e 304-antisense (5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3') para RT e PCR. O fragmento de DNA amplificado foi purificado com o *kit GFX<sup>®</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Bioscience<sup>™</sup>)*, visualmente quantificado com *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen<sup>™</sup>)* e sequenciado, utilizando-se o *kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems<sup>™</sup>)*, com os *primers* senso e antissenso, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram então resolvidas em um ABI-3130 *automatic sequencer (Applied Biosystems<sup>™</sup>)*. As identidades entre as sequências alinhadas foram calculadas utilizando-se o programa *BioEdit*. O SNC testado foi negativo por DIF, e somente um camundongo morreu após inoculação com a suspensão do SNC do morcego. A tipificação antigênica apresentou resultado incompatível com os padrões definidos pelo painel. A análise filogenética mostrou que o vírus isolado agrupou-se com outros vírus isolados de morcegos insetívoros, gênero *Nyctinomops* spp. (98,8% de identidade de nucleotídeos). A análise genética foi essencial para a caracterização molecular do isolado, uma vez que a análise antigênica teve um resultado inconclusivo, como previamente ocorreu com a vasta maioria de variantes isoladas de morcegos insetívoros. Logo, a caracterização molecular de isolados é essencial para esclarecer aspectos epidemiológicos da raiva em morcegos, com vistas a implementar medidas relacionadas aos morcegos em áreas urbanas e ao controle da raiva (CASTILHO et al., 2008).

Recentemente, Carnieli Jr. et al. (2009) mostraram que a história biogeográfica da raiva pode ser reconstruída, utilizando-se dados moleculares.

Com o uso de RT-PCR e sequenciamento do DNA, para posterior análise filogenética, este trabalho descreve a caracterização genética da variante do vírus rábico que circula na população de *Desmodus rotundus* em uma área epizootica e que é transmitido ao gado. As sequências genéticas obtidas, neste estudo, foram comparadas com outras do *GenBank*. Os genes N e G deste vírus foram sequenciados, e as árvores filogenéticas geradas foram topologicamente concordantes. Três agrupamentos genéticos foram identificados na área epizootica estudada. Os resultados mostram diferentes origens das epizootias em cada área, os dois genes conservados e suas identidades (maiores que 98%) mantidas em termos de tempo e espaço. Os resultados sugerem que as linhagens do vírus rábico de *D. rotundus*, originárias da costa Atlântica da América do Sul, são altamente conservadas, adaptam-se e são rigorosamente selecionadas pela espécie (CARNIELI Jr. et al., 2009).

Outra técnica molecular de interesse para o diagnóstico da raiva é a de *nested* PCR (“PCR alinhado”). Esta é uma técnica na qual são realizados diversos ciclos de amplificação com um grupo de *primers*, cujo produto é, então, reamplificado, utilizando-se outro grupo de *primers* dirigidos para uma sequência que se encontra dentro da sequência amplificada pelo primeiro grupo. Atualmente, vários estudos têm sido realizados com esta técnica para a detecção do vírus rábico (CARNIELI Jr. et al., 2005; KONEMAM et al., 2001).

Kamolvarin et al (1993) descreveram um simples, sensível e específico protocolo de *nested* PCR, para a detecção de vírus rábico. O processo consiste na preparação de amostra, transcrição inversa, duas etapas de amplificação do DNA e detecção do produto amplificado. O RNA foi extraído de cérebro de animal e de humano, por fenol-clorofórmio utilizando-se tiocianato de guanidinium. O RNA viral foi amplificado, então, em uma segunda etapa de PCR, utilizando-se dois pares de *nested primers* projetados para amplificar a sequência do nucleocapsídeo (N) do vírus rábico. A sequência de N foi amplificada de todas as amostras de cérebro (95 cães e três humanos) com raiva confirmada pelo teste de anticorpo fluorescente (FAT) e inoculação em camundongo (MIT). Amostras de cérebro negativas para raiva (110 cães, 2 humanos) foram PCR-negativas. O processo requer menos de 24 horas. A detecção de RNA viral ainda foi possível em material de cérebro deixado

à temperatura ambiente por 72 horas. O mínimo de 8 pg de RNA do vírus rábico pôde ser detectado. Esta técnica poderia ter aplicações práticas como um teste confirmatório para o FAT em centros diagnósticos da raiva (KAMOLVARIN et al., 1993).

O primeiro relato de um protocolo de *heminested* PCR (hnRT-PCR) para o vírus rábico foi de Heaton et al. (1997). Este protocolo de hnRT-PCR foi rápido, sensível e capaz de detectar seis genótipos do vírus rábico e vírus relacionados. Seis dos sete genótipos conhecidos foram *screened* com sucesso pela hnRT-PCR e hibridização *southern blot*. Este estudo também relatou uma comparação da sensibilidade do FAT para antígeno rábico, e a de hnRT-PCR para RNA viral, em tecido degradado e infectado vírus do genótipo 1. Os resultados indicaram que o FAT falhou para detectar antígeno viral em tecido cerebral que foi incubado a 37°C por mais de 72 horas, enquanto o hnRT-PCR detectou RNA viral em tecido cerebral que foi incubado a 37°C por 360 horas (HEATON et al., 1997).

A habilidade para detectar vírus rábico, em amostras clínicas, pode ser aumentada com o uso de uma segunda etapa de amplificação, usando a técnica de *nested* PCR, embora este procedimento aumente o risco de resultados falso-positivos devido à contaminação de DNA. Um aspecto vantajoso do uso da hibridação é a mais baixa probabilidade de contaminação em laboratório com DNA, e a sua sensibilidade é comparável à *nested* PCR (CARNIELI Jr. et al., 2005; HEATON et al., 1997).

A técnica de *multiplex* PCR (mPCR) é aquela que utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de diferentes sequências de DNA. Esta técnica pode ser utilizada para amplificar, de modo simultâneo, sequências-alvo de diferentes agentes infecciosos em uma única reação, tendo potencial para ser utilizada na rotina laboratorial. Desde a sua primeira descrição, em 1988, esta técnica tem sido utilizada com sucesso em diversos estudos moleculares, incluindo análises de deleção, mutação e polimorfismos ou em estudos quantitativos com RT-PCR. Vários artigos de revisão e de pesquisa têm provido descrições detalhadas dos parâmetros fundamentais que podem influenciar o desempenho da PCR padrão (*uniplex* PCR ou uPCR), enquanto poucas

publicações discutem a *multiplex* PCR (KONEMAM et al., 2001; TANG e PERSING, 1999; HENEGARIU et al., 1997; EDWARDS e GIBBS, 1994).

O trabalho de Elnifro et al. (2005) revisou os princípios, a otimização e a aplicação da *multiplex* PCR para a detecção de vírus de importância clínica e epidemiológica. A técnica de PCR revolucionou o campo do diagnóstico de doenças infecciosas. Para superar a desvantagem inerente ao custo e melhorar a capacidade diagnóstica da técnica, foi desenvolvida a *multiplex* PCR, uma variante da PCR, na qual mais de uma sequência-alvo é amplificada, usando mais de um par de *primers*. *Multiplex* PCRs têm sido descritas para detecção viral, bacteriana e/ou outros agentes infecciosos, em um tubo de reação. Estudos precoces realçaram os obstáculos à produção de ensaios *multiplex* sensíveis e específicos, mas estudos recentes têm provido protocolos sistemáticos e melhorias técnicas para *design* de testes simples. Os mais úteis destes são a escolha empírica de *primers* de oligonucleotídeos e o uso de metodologia de PCR baseada no calor padrão. Estes avanços, junto com outros para aumentar a sensibilidade e a especificidade de ensaios *multiplex*, e para facilitar a automatização têm resultado em publicações relativas à aplicação de *multiplex* PCR no diagnóstico de agentes infecciosos, especialmente, quando ácidos nucleicos de vírus são os alvos (ELNIFRO et al., 2005).

As vantagens da mPCR em relação a PCR convencional, para apenas uma sequência-alvo (*uniplex* PCR – uPCR), estão na diminuição da intensidade e do período de trabalho laboratorial, na redução do número de reagentes e, por consequência, na redução dos custos. Por outro lado, as desvantagens desta técnica em relação à uPCR estão associadas à redução da sensibilidade de detecção, não sendo, às vezes, detectada uma sequência-alvo, à necessidade de uma grande concentração inicial das sequências-alvo e à presença de polimorfismos, fatores associados à competição entre os *primers* pelas sequências-alvo e pelos reagentes presentes. Por isso, em pesquisas que usam mPCR são necessários ensaios preliminares de otimização da reação, a fim de estabelecer o programa de PCR ideal, a concentração de reagentes e a sequência-alvo mais adequada, de forma a amplificar todas sequências-alvo de modo similar, eliminando

produtos de amplificação inespecíficos (PERRY et al., 2007; ELNIFRO et al., 2005; KONEMAM et al., 2001).

O estudo de Sato et al.(2005) investigou a utilidade da *multiplex* RT-PCR para determinar as origens de 54 vírus rábico isolados de várias espécies de hospedeiros no Brasil. E, para avaliar a *multiplex* RT-PCR como uma ferramenta para o diagnóstico potencial, a sensibilidade deste método também foi investigada. Além disso, os resultados com uma árvore filogenética desenvolvida, a partir das sequências de gene da glicoproteína viral (proteína G), foram comparados. Os produtos da *multiplex* RT-PCR mostraram cinco tamanhos diferentes de produtos, enquanto a árvore filogenética mostrou seis grupos. Destes seis grupos, quatro corresponderam com os quatro tamanhos dos produtos da *multiplex* RT-PCR. Os outros dois grupos mostraram correspondência com o outro tamanho dos produtos da *multiplex* RT-PCR, indicando que os resultados da *multiplex* RT-PCR refletiram a linhagem dos 54 isolados. Este estudo também mostrou que este método pode detectar rastro de RNA. Em conclusão, o método de *multiplex* RT-PCR permite a rápida, específica e simultânea detecção de vírus rábico isolados de várias espécies de hospedeiros no Brasil (SATO et al., 2005).

Nova metodologia denominada PCR em tempo real (*real-time* PCR) foi desenvolvida em função de uma limitação da PCR tradicional, que está na característica qualitativa desta técnica, limitando-a para estudos quantitativos. Esta metodologia refere-se à utilização de processos químicos automatizados de monitoramento do acúmulo de produtos de PCR em uma reação, em tempo real, utilizando sondas químicas fluorescentes. A PCR em tempo real, possui um sistema tubular para detectar o acúmulo de produtos da PCR, composto de um termociclador com câmeras detectoras refrigeradas para detecção de luz fluorescente, em que a ressonância emitida é diretamente proporcional à intensidade de fluorescência e, por sua vez, ao número de *amplicons* produzidos, gerando uma curva-padrão, associando a ressonância emitida aos produtos amplificados. Possui ainda, um sistema informatizado com *software* que realiza a separação, quantificação e interpretação do espectro gerado, realizando, assim, a distinção e quantificação de mais de um fluoróforo que, por sua vez, permite a detecção de mais de um DNA-alvo (BUSTIN, 2002; 2000).

Atualmente, as sondas utilizadas na *real-time PCR* variam em função do fabricante e da tecnologia aplicada. As mais utilizadas são as sondas *TaqMan* (5' exonuclease) *probes*, *fluorescent resonance energy transfer* (FRET) *probe*, *molecular beacons* e *scorpion probes*, sendo que cada tipo de sonda promove a detecção dos fragmentos amplificados de forma diferente. Duas tecnologias de PCR, em tempo real, destacam-se atualmente, a *SYBR Green Real-Time PCR* e a *5'-Nuclease Real-Time PCR*. Na primeira tecnologia, são utilizados nucleotídeos ligados a sondas *SYBR Green* para quantificar produtos de PCR. A segunda está fundamentada na atividade 5'-3' exonucleolítica da enzima *TaqDNA Polimerase*, em que a mistura de reação é composta por sondas fluorogênicas, formadas pela associação de um oligonucleotídeo com um fluoróforo, e um elemento que emite ressonância denominado de *quencher* (PERRY et al., 2007).

Segundo Rodríguez-Lázaro et al. (2007), a *real-time PCR* possibilita o monitoramento da síntese de produtos de amplificação, no decorrer da própria reação de síntese PCR, e não apenas no final da reação, como ocorre na PCR tradicional. Para os mesmos autores, as principais vantagens estão na possibilidade de execução de estudos quantitativos, e não apenas qualitativos e na eliminação do risco de contaminação, visto que esta reação ocorre em um sistema tubular fechado, não havendo também a necessidade de eletroforese para visualização das amplificações (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2007).

Vários métodos de RT-PCR têm sido reportados para a detecção de vírus rábico e vírus relacionados. Estes métodos, invariavelmente, envolvem transferências múltiplas de ácidos nucleicos entre tubos diferentes, com o risco de contaminação que leva à produção de resultados falso-positivos. Wakeley et al. (2006) descreveram um simples fechado-tubo, *nonnested* RT-PCR, com a tecnologia de *TaqMan* que distingue, em tempo real, entre vírus rábico clássico (genótipo 1) e *European bat Lyssavirus 1* e 2 (genótipos 5 e 6). A incorporação da tecnologia de *TaqMan*, em um ensaio de tempo real, não só habilita o modelo de *Lyssavirus* a ser detectado, mas também permite que ele seja genotipado. O uso de somente dois *amplimers* universais (JW12 e N165-146) mais uma única sonda para cada genótipo simplifica, consideravelmente, o método de *TaqMan*, desenvolvido para uso em um *Applied Biosystems LS50B instrument* (BLACK et al., 2002), embora seja

reconhecido que o ensaio só é aplicável a três genótipos diferentes do grupo de *Lyssavirus*. O ensaio de *TaqMan* é rápido, sensível e específico, e permite a genotipagem de isolados desconhecidos, concomitantemente, com a RT-PCR. O ensaio pode ser aplicado quantitativamente e o uso de um controle interno habilita a qualidade do modelo isolado a ser avaliado. Apesar da heterogeneidade de sequências no gene N entre os genótipo diferentes, um par de *primers* universal e reverso foi projetado, seguindo a simplificação de ensaios previamente descritos. Os autores propuseram isso, dentro de uma área geograficamente restrita. Este ensaio poderia ser uma ferramenta útil para a detecção e diferenciação de membros do gênero de *Lyssavirus* (WAKELEY et al., 2006).

#### **4.11.2.7. Sorologia**

O diagnóstico sorológico pode ser útil na detecção de anticorpos no início do curso clínico de enfermidades, bem como, para avaliar a prevalência de determinada doença em áreas endêmicas/enzoóticas, e também proporcionar uma estimativa da eficácia da vacina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; WHO, 1992; SMITH, 1991).

Segundo Smith (1991), os ensaios sorológicos de anticorpos para o vírus rábico podem ser divididos em três categorias gerais: os ensaios que medem diretamente a interação do anticorpo com o antígeno (ensaio imunoenzimático, imunofluorescência indireta e radioimunoensaio), geralmente mais sensíveis que os demais testes, medem qualquer interação antígeno-anticorpo e que são especialmente úteis para diagnóstico e estudos epidemiológicos; os ensaios que dependem da capacidade do anticorpo que, ao interagir com o antígeno, realiza alguma função não relacionada ao vírus (fixação de complemento, lise celular mediada por complemento, contraimuno-eletoforese, imunodifusão radial simples, hemaglutinação passiva, hemadsorção mista, hemaglutinação imunoaderente), além de serem menos sensíveis para detectar pequenas alterações na concentração de anticorpos e poderem detectar prontamente a IgM (imunoglobulina particularmente ativa na fixação de complemento e precipitação de antígenos, mas de pouco valor como indicadora dos estágios iniciais da raiva); os ensaios que medem a capacidade

de o anticorpo bloquear alguma função viral específica (soroneutralização viral e inibição da hemaglutinação). Estes ensaios medem somente os anticorpos para os antígenos glicoprotéicos do vírus rábico (SMITH, 1991).

A soroneutralização viral pode ser realizada em camundongos ou em culturas celulares, pelo teste rápido de inibição de focos fluorescentes (*rapid fluorescent focus inhibition test* – RRFIT), sendo as provas recomendadas pela OMS (1992) como indicativas da correlação entre os anticorpos neutralizantes mensurados e a proteção contra a infecção rábica (WHO, 1992).

O Ministério da Saúde considera satisfatório um título mínimo de 0,5 UI/mL, nas provas de soroneutralização viral, apresentados por indivíduos vacinados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

#### **4.12. Epidemiologia**

A raiva é uma enfermidade natural dos animais de sangue quente, principalmente cães, gatos, morcegos, herbívoros domésticos, carnívoros selvagens e seres humanos, com considerável variação no grau de susceptibilidade de cada espécie. Trata-se de uma antropozoonose viral, virose que é transmitida de um animal infectado para o ser humano. É considerada uma das antropozoonoses de maior importância em Saúde Pública, não só por sua evolução drástica e letal, como também por seu elevado custo social e econômico. Está distribuída em quase todos os continentes, à exceção da Oceania (BRASIL, 2005; WHO, 2004; TAKAOKA, 2003; KING e TURNER, 1993).

Dois ciclos da raiva podem ser diferenciados e estão inter-relacionados (KING e TURNER, 1993). O primeiro compreende a raiva silvestre e mantém-se em carnívoros e quirópteros na América do Norte, Europa e África. O segundo ciclo compreende a raiva urbana, quando a doença se mantém na população canina e felina. Este segundo ciclo ocorre na América Latina, África e Ásia. Na América Latina, prevalece ainda um ciclo silvestre mantido por morcegos, basicamente os hematófagos, cujo principal transmissor é o *Desmodus rotundus*, principal difusor e reservatório da raiva no meio rural, a chamada “raiva desmodina”. Este tipo de raiva

causa grandes perdas à Pecuária (UIEDA, 1987) e constitui um problema emergente para a Saúde Pública (LOPEZ et al., 1992). Em alguns países do mundo como o Canadá, Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra e outros, a raiva foi erradicada no meio urbano, ficando restrita aos ambientes silvestres. No Brasil, em vários Estados, assim como na Índia, Bangladesh e em outros países do terceiro mundo, esta doença constitui-se em grave problema, com grandes prejuízos para a Produção Animal, além de perdas de vidas humanas (DE SÁ, 2003).

Todas as espécies de quiróptero podem transmitir o vírus rábico, independentemente de seu hábito alimentar. No Brasil, somente no início deste século, em 1911, Antonio Carini, então diretor do Instituto Pasteur de São Paulo, levantou a hipótese de os morcegos hematófagos serem os transmissores da raiva dos herbívoros domésticos. Anos depois, a raiva foi confirmada em morcegos com outros hábitos alimentares, como os frugívoros e insetívoros, porém, só se deu maior importância a este fato quando um menino foi atacado por um morcego insetívoro na Flórida, em 1953. Após esta data, inúmeros casos humanos foram confirmados nos Estados Unidos, fato que se repete até os dias de hoje. No Brasil, há cerca de 150 espécies de morcegos, desse total, o vírus rábico já foi isolado de 36 espécies. Este número é considerado pequeno, quando comparado ao encontrado nos Estados Unidos, onde de 39 espécies identificadas, o vírus rábico foi isolado de 30 (INSTITUTO PASTEUR, 2002b).

Do México à Argentina, o *Desmodus rotundus* é o reservatório mais importante do vírus rábico, que produz a raiva rural dos herbívoros domésticos. Os morcegos não-hematófagos (insetívoros, frugívoros, ictiófagos, entre outros) são também importantes reservatórios, pois o vírus pode ser transmitido ao homem ou a outros animais por meio de secreções desses morcegos, sem uma mordida direta, supostamente pela inalação de aerossóis infectados. Sabe-se, desde a década de 60, que mais de 60 espécies de morcegos não-hematófagos podem infectar-se com o vírus rábico e desempenhar papel importante na disseminação da raiva (INSTITUTO PASTEUR, 2002b).

Os mamíferos selvagens servem como um grande e incontrolável reservatório da raiva silvestre, que é uma ameaça cada vez maior para o homem e para os animais domésticos em todo o mundo. Descreve-se uma hierarquia na

susceptibilidade para as diferentes espécies de mamíferos selvagens, sendo as espécies mais afetadas: raposas, coiotes, chacais e lobos, nesta ordem. A raiva silvestre é caracterizada pelo envolvimento de uma ou mais espécies principais (pequenos carnívoros e mustelídeos), especialmente nas regiões onde este modelo permanece estável por muitos anos (WHO, 2004; CHALMERS e SCOTT, 1969).

Na Europa, América do Norte e Ásia, o principal reservatório da raiva silvestre é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), disseminando a chamada “raiva vulpina”. Sabe-se que uma epizootia em raposas reintroduziu a raiva em vários países da Europa Ocidental, que esteve, durante um certo tempo, relativamente livre da doença. Além da raposa vermelha, o guaxinim (*Procyon lotor*) e o cangambá (*Mephitis mephitis*) são reconhecidamente importantes reservatórios da raiva silvestre na América do Norte (WHO, 2004).

Schneider realizou um criterioso estudo sobre a raiva no Brasil e verificou que somente a raiva transmitida por morcegos vitimou 45 pessoas no período de 1980 a 1990 (SCHNEIDER, 1991; 1996). Entre os anos de 1994 e 1995, o Ministério da Saúde contabilizou um total de 51 óbitos humanos por raiva, transmitida por diferentes vetores, nas diversas regiões do país. A região Nordeste com maior número de casos, seguida pela Sudeste, Norte e Centro-Oeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995). No ano de 1996, foram registrados no Brasil 1.058 casos de raiva canina e 25 casos de raiva humana (FUNASA, 2001).

Na América Latina, no ano de 1995, 75% dos casos de raiva humana foram transmitidos por cães e, no Brasil, 86% dos casos, respectivamente, vindo depois a transmissão pelo morcego e pelo gato, cada qual responsável por 6% dos casos (Organização Panamericana da Saúde – OPAS, 1995). Adicionalmente, dados do Ministério da Saúde revelaram que, de 1986 a 1995, o morcego passou a ser o segundo maior transmissor da raiva humana no Brasil. No período de 1990 a 2001, foram registrados, no Brasil, 458 casos de raiva humana. A média foi de 38 casos por ano. Entre 1990 e 1994, houve redução de 70% no número de casos. No entanto, a partir de 1995 e até 2000, o número de casos manteve-se em torno de 26 por ano. Em 2001, foram notificados 21 casos, correspondendo à redução de 30% em relação à média dos 5 anos anteriores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Até o ano de 2003, o ciclo de transmissão da raiva predominante no Brasil, responsável pelos casos de raiva humana, foi o urbano (por cão ou gato), com 72,5% dos casos, o cão contribuindo com 68,5% destes. No ano de 2004, houve uma inversão dessa situação, e o morcego tornou-se o principal responsável pelos casos de raiva humana, devido à ocorrência de dois surtos de raiva humana transmitidos por morcegos, nos municípios de Portel-PA (15 casos) e Viseu-PA (6 casos). Esta situação manteve-se no ano de 2005, devido aos surtos por morcego hematófagos no Pará e no Maranhão, Estados em que foram notificados 41 casos de raiva humana. Foram registrados, entre 2004 e 2005, 74 casos de raiva humana no Brasil, 64 transmitidos por morcego hematófago, 6 transmitidos por cão e 4 casos transmitidos por outras espécies (SVS / MS, 2008)

Na América Latina, onde a população de bovinos exposta ao risco da raiva é de aproximadamente 70 milhões (KING e TURNER, 1993), estima-se uma mortalidade anual que varia de 100.000 a 500.000 bovinos (SWANEPOEL, 1994), com prejuízo de 50 milhões de dólares para a indústria pecuária (LIMA et al., 2005; KING e TURNER, 1993).

De acordo com o “Boletim da Defesa Sanitária Animal” (2005), a situação epidemiológica da raiva em herbívoros domésticos, no Brasil, foi estimada para as diferentes regiões, no período de 1996 a 2004. Na região Norte, estimaram-se 5.574 animais raivosos; na região Nordeste, 2.564 animais; na região Sudeste, 16.706 animais; na região Sul, 887 animais; e na região Centro-Oeste, 4.238 animais. Portanto, estimou-se um total de 29.969 herbívoros acometidos pela raiva. Somente em bovídeos, no referido período, 27.022 casos de raiva foram notificados (BRASIL, 2005).

Certamente, a epidemiologia da raiva em bovinos foi melhor compreendida quando Carini (1911) observou a ocorrência em Santa Catarina de casos de raiva transmitida por morcegos hematófagos. Houve, na época, grande controvérsia, pois, até então, se achava que os morcegos não estavam envolvidos na transmissão da doença, e os pesquisadores pensaram tratar-se de uma nova “peste” (CARINI, 1911 citado por POZZETTI, 2001). Na década de 30, houve a confirmação do trabalho de Carini (1911), estabelecendo a responsabilidade do morcego hematófago na

transmissão da raiva aos herbívoros domésticos (HURST, 1931; TORRES, 1935, citados por POZZETTI, 2001).

Os primeiros casos de raiva em herbívoros domésticos no Estado de São Paulo foram relatados no ano de 1935 nas cidades de Ubatuba no litoral, e Itu no interior do Estado (CARNEIRO, 1936, citado por POZZETTI, 2001).

Acha (1968) publicou primeiro trabalho sobre epidemiologia de raiva bovina paralítica nas Américas, porém, ainda não havia métodos de controle populacional de morcegos hematófagos e nem vacinas antirrábica eficientes para bovinos (ACHA, 1968).

Na década de 70, iniciaram os avanços para o controle da raiva paralítica dos herbívoros e, com evolução na pesquisa, tornou a vacina antirrábica, para bovinos, eficiente, com 80% de proteção, em virtude do advento do conhecimento da biologia dos morcego hematófago *Desmodus rotundus* e a utilização da “pasta vampiricida” (à base de warfarina sódica) para controle populacional destes (ARELLANO-SOTA, 1988).

Em 1970, no México, foi constatada a presença de 40 cérebros positivos para raiva entre 1.000 animais encaminhados a matadouros para consumo humano, constatando o risco à Saúde Pública (MARTELL, 1971 citado por BAER, 1991).

A raiva dos herbívoros no Brasil é uma das viroses mais importantes para a Pecuária e para a Saúde Pública (ACHA e SZYFRES, 1986). Com o intuito de comprovar esta sugestão, Riet-Correa et al. (1999) realizaram uma estimativa das mortes de bovinos causadas pela raiva, anualmente, em três estados brasileiros, utilizando-se de dados obtidos sobre a frequência da doença de quatro laboratórios de diagnóstico da raiva. Este estudo constatou que, na Paraíba, com uma população de 918.262 bovinos, o número de mortes foi estimado em 8.609 cabeças por ano; no Mato Grosso do Sul, com uma população de 23 milhões de bovinos, as perdas por raiva foram estimadas em 149.500 cabeças; e no Rio Grande do Sul, com uma população de 13 milhões de bovinos, as mortes foram estimadas em 13.000 a 16.250 animais por ano. Portanto, se estas estimativas forem extrapoladas para todo o Brasil, com 195 milhões de bovinos, as mortes podem ser estimadas em 842.688 cabeças por ano (LIMA et al., 2005; RIET-CORREA et al., 1999).

A raiva em equinos tem sido pouco estudada no Brasil, contudo, nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, foram realizados levantamentos epidemiológicos incluindo a raiva em equinos. Em São Paulo, entre os anos de 1980 e 1994, foram diagnosticados 111 casos de raiva em equinos e 983 em bovinos (PEIXOTO et al., 2000). No Rio Grande do Sul, entre os anos de 1978 e 1998, foram diagnosticados 12 casos em equinos e 77 em bovinos (RIET-CORREA et al., 1999).

A raiva em caprinos e ovinos tem sido considerada uma doença rara, mas estes herbívoros são altamente susceptíveis à infecção quando expostos experimentalmente ao vírus (GOMES, 2004). No Brasil, têm sido raros os diagnósticos de raiva em ovinos e não há publicação de diagnósticos em caprinos (LIMA et al., 2005). Todavia, no Rio Grande do Sul, entre os anos de 1978 e 1982, foram diagnosticados quatro surtos de raiva em ovinos e, em dois destes, a doença foi transmitida por cães (RIET-CORREA et al., 1999). Mais recentemente, no mesmo Estado, foi diagnosticada raiva em ovinos transmitida por morcegos hematófagos em duas fazendas (BARROS, 2003).

No Rio Grande do Sul, no Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas, a raiva representou 2,06% dos casos de bovinos entre 1978 e 1998; 2% dos casos de equinos; e 0,7% dos casos de ovinos (RIET-CORREA et al., 1999). Nesse mesmo Estado e período, na Universidade Federal de Santa Maria, a raiva representou 2,5% em bovinos entre 6.021 casos (SANCHES et al., 2000).

No Estado de São Paulo, no ano de 2000, Pozzetti (2001) realizou um estudo, no qual foram registrados 945 casos de raiva em animais domésticos e silvestres. Desse total, a espécie bovina foi a que apresentou o maior número de ocorrências (621 casos), seguida da equina (230 casos) e dos quirópteros (69 casos). Muales, ovinos e suínos corresponderam a 6, 8 e 4 casos, respectivamente, registrados neste estudo em São Paulo. No mesmo estudo, houve ainda 4 casos em cães e 1 caso em guaxinim. Segundo Pozzetti (2001), até abril de 2000, 265 casos de raiva já haviam ocorrido no Estado de São Paulo, 152 casos em bovinos, 74 em equinos e 27 em quirópteros. Em muales, ovinos e suínos foram registrados 5, 2 e 3 casos, respectivamente, além de 1 caso em cão e 1 caso humano (POZZETTI, 2001).

Em Minas Gerais, Silva et al. (2001) constataram positividade para raiva em 50,5% dos bovinos encaminhados ao laboratório de diagnóstico da raiva, entre os anos de 1976 e 1997, evidenciando ainda aumento no número dos casos positivos e de municípios com a virose a partir de 1993 (SILVA et al., 2001).

No Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2000 e 2004, a raiva representou 13% de todos os casos diagnosticados em bovinos (LEMOS, 2005).

No Estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 1999 a 2005, o número de casos positivos para a raiva em herbívoros, pelo diagnóstico laboratorial, foi na ordem de: 134 casos em 1999; 35 em 2000; 42 em 2001; 83 em 2002; 119 em 2003; 136 em 2004; e 107 casos em 2005 (CRMV-RJ, 2005).

No Norte e Noroeste Fluminense, Sales (1997) verificou 57 casos de doença neuromuscular em bovinos, nos anos de 1995 e 1996. Destes casos, 80,70% foram laboratorialmente diagnosticados como positivos para a raiva bovina (SALES, 1997).

No município de Campos dos Goytacazes, Chicarino et al. (2001) estudaram o diagnóstico laboratorial de 29 bovinos suspeitos de raiva, nos anos de 1999 e 2000. Destes, 38% foram positivos para a raiva bovina, sendo ainda comprovada a relação desta incidência com os *habitats* naturais do morcego *D. rotundus*. Dois anos depois, Chicarino et al. (2003) estimaram os óbitos de herbívoros confirmados laboratorialmente e suspeitos de raiva, no período de dezembro de 2000 a julho de 2003. O número de óbitos por raiva, confirmados laboratorialmente, foi na ordem de: 5 em 2000; 4 em 2001; 3 em 2002; e 3 em 2003. Em contrapartida, o número óbitos de animais com sintomatologia nervosa suspeita de raiva, sem diagnóstico laboratorial, foi na ordem de: 5 em 2000; 65 em 2001; 35 em 2002; e 40 até julho de 2003. Tais resultados que comprovaram a subnotificação da raiva em herbívoros domésticos e a ocorrência da virose relacionada à presença do *D. rotundus* no interior do Estado (CHICARINO et al., 2001; 2003).

Cabe ressaltar que, desde que Carini (1911) concluiu que a raiva dos herbívoros era transmitida pelo morcego hematófago *D. rotundus*, os estudos relacionados ao controle da doença vêm, paralelamente, aos estudos do comportamento, controle e dinâmica de populações do morcego, bem como, das características geográficas que favorecem a existência de abrigos para a perpetuação desta espécie (GOMES et al., 2005; ALMEIDA et al., 1994).

Tadei et al. (1991) desenvolveram um estudo sobre a raiva rural, no qual se observou que alguns fatores influenciam a velocidade de movimentação da virose, como a topografia da região, a quantidade de abrigos de morcegos, o número de morcegos hematófagos, o número de morcegos infectados por colônia, a disponibilidade de alimento e a época do ano. Nesse estudo, constatou-se que os morcegos hematófagos infectados transmitem a raiva ao gado e, de fato, sucumbem à doença, com um maior período de incubação viral. No mesmo estudo, determinou-se a velocidade de deslocamento da raiva em herbívoros domésticos. Segundo Tadei et al. (1991), o foco da raiva dos herbívoros desloca-se a uma velocidade entre 16 a 20 km por mês, nos dois sentidos, a partir do foco inicial, e os morcegos infectados estão até 20 km à frente desse foco no gado (TADEI et al., 1991).

Desde 1996, a OPAS iniciou um projeto, para o estudo da epidemiologia molecular do vírus rábico isolado nas Américas e no Caribe, que incluía a utilização de um painel de Mabs cedido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, EUA. Tal estudo permite associar alguns reservatórios às variantes antigênicas conhecidas do vírus rábico, como por exemplo, a variante 3, associada ao morcego hematófago *D. rotundus* (principal reservatório no nosso meio) (BRASIL, 2005).

Vieira (2007) caracterizou, molecularmente, variantes do vírus rábico isoladas de *D. rotundus*, em cidades do Norte e Noroeste Fluminense, e encontrou uma frequência de ocorrência do vírus rábico de 3,52%, correspondente a 7 morcegos positivos entre 119 diagnosticados laboratorialmente para a raiva. Em um estudo de âmbito nacional, Silva et al. (1967) encontraram uma frequência de ocorrência do vírus rábico de 0,75%, correspondente a 8 *D. rotundus* positivos de 1.062 diagnosticados para a raiva. Segundo Vieira (2007), é difícil determinar a frequência de ocorrência da raiva em *D. rotundus* por diversos fatores, entre estes: o desconhecimento sobre tamanho da população dessa espécie na região; poucos abrigos são mapeados; o foco da raiva desloca-se no espaço em relação ao tempo; a morbidade e a mortalidade da raiva são iguais a 100%. Então, para se avaliar a presença do vírus da raiva em uma colônia, é preciso que a captura seja realizada no momento em que o caso de raiva esteja acontecendo numa população de morcegos (SILVA et al., 1967; VIEIRA, 2007).

De acordo com o estudo realizado por Vieira (2007), há morcegos hematófagos dispersos por toda a região do Norte e do Noroeste do Estado do Rio de Janeiro. Em Italva, Miracema e Bom Jesus do Norte, há muitas grutas que podem servir de abrigo aos quirópteros; já na região de Campos dos Goytacazes e Quissamã, são mais raros esses tipos de abrigo, no entanto, os abrigos artificiais formados pelos túneis debaixo da BR101, por onde cruzam alguns córregos, são utilizados pelos morcegos hematófagos e outras espécies de morcegos não-hematófagos. O vírus isolado por Vieira (2007) em *D. rotundus*, no município de Quissamã, Norte do Estado do Rio de Janeiro, foi o mesmo isolado por Kimura (2006) em bovinos dos municípios de Miracema e Porciúncula, no Noroeste do Estado (VIEIRA, 2007; KIMURA, 2006). Para se traçar o perfil epidemiológico da raiva em *D. rotundos* e em bovinos das regiões Norte e Noroeste Fluminense, fazem-se necessárias maiores pesquisas a este respeito. Para tanto, é preciso que os órgãos de Defesa Sanitária atuem em conjunto com os Centros de Pesquisas (VIEIRA, 2007; KIMURA, 2006).

A presença de grande quantidade de bovinos em uma determinada localidade é considerada fator de risco para raiva, já que favorece o desenvolvimento de maior número de colônias de morcegos hematófagos (GOMES et al., 2002 citados por GOMES et al., 2005). Há baixa taxa de natalidade entre os *D. rotundus* em um surto de raiva rural que causa de mortalidade em cerca de 50% da população desta espécie de morcegos na área do foco. Fatos confirmados em um estudo realizado por Delpietro e Russo (1996). Logo, após um surto de raiva rural, há demora no restabelecimento do número de indivíduos na colônia de morcegos. Fato que explica o “comportamento do surto” da raiva dos herbívoros, por levar à morte um grande número de animais e num curto espaço de tempo (GOMES et al., 2005; DELPIETRO e RUSSO, 1996).

A epidemiologia da raiva em herbívoros não envolve só fatores naturais, como o habitat favorável aos morcegos e a circulação do vírus rábico no ciclo silvestre, envolve também fatores sociais, que estabelecem a forma como o homem desempenha a atividade econômica na natureza (SILVA et al., 2001). Silva et al. (2001) utilizaram dados que avaliassem o uso da terra como determinante da distribuição da raiva bovina em Minas Gerais. Constatou-se que a raiva bovina

apresentou-se mais associada às lavouras permanentes e temporárias, às pastagens naturais e plantadas ao efetivo bovino, e menos associada às matas naturais e plantadas, às lavouras em descanso e às terras produtivas não utilizadas. Resultados que mostraram as transformações antrópicas no espaço agrário, especialmente no uso da terra, influenciando de modo determinante a distribuição espacial e temporal da raiva bovina no Estado (SILVA et al., 2001).

Acha e Szyfres (1986), em composição com a OPAS, defendem que a vigilância epidemiológica da raiva é ainda deficiente na maioria dos países e afirmam que, em muitos países, a detecção e a notificação dos casos são incompletas. O Brasil é um dos países que mais tem sofrido as consequências da raiva dos herbívoros, fato agravado pelo elevado número de subnotificações, causado pela falta de consciência dos produtores e a ineficiência de uma vigilância epidemiológica dos órgãos oficiais envolvidos no controle. Estima-se que, para cada caso notificado, outros dez não o são. O grande problema ainda esta no subenvio de amostras suspeitas de raiva, a fim de se proceder à confirmação diagnóstica pelas técnicas laboratoriais preconizadas, fato que reflete na subnotificação da raiva rural e prejudica os serviços de vigilância epidemiológica e de defesa agropecuária (BRASIL, 2005; KOTAIT et al., 1998; ACHA e SZYFRES, 1986).

Atualmente, há importantes ferramentas tecnológicas disponíveis para a vigilância epidemiológica da virose, fruto do avanço no desenvolvimento de pesquisas e introdução de métodos, permitido, assim, um maior conhecimento da raiva rural em seus diversos aspectos. A introdução de técnicas de biologia molecular, anticorpos monoclonais e posicionamento global por satélites (GPS – *global positioning system*) na geoepidemiologia da raiva, permitiram o conhecimento dos principais reservatórios silvestres do vírus rábico, assim como sua associação às áreas geográficas (VIEIRA, 2007; BRASIL, 2005).

#### 4.13. Profilaxia e controle

A primeira imunização antirrábica em animais e humanos ocorreu no final do século XIX, realizada por Pasteur e seus colaboradores, utilizando medula de coelhos infectados com vírus “fixo”. A medula recebia um tratamento de dessecação que variava de 1 a 15 dias, que proporcionava a redução da virulência para animais e humanos que recebiam tratamento diário com doses crescentes de virulência. Högyes (1887) modificou o tratamento, substituindo os diferentes períodos de dessecação pelo uso de diferentes diluições do material dessecado e, dessa maneira, os acidentes alérgicos também foram reduzidos. Puscariu e Vesesco (1895) também obtiveram a redução de virulência, pelo aquecimento a 58°C em diferentes intervalos de tempo. Ferrni (1908) desenvolveu uma vacina, que era aplicada em doses fixas, tratada com fenol (5% de tecido nervoso em 0,5 a 1,0% de fenol) e que não inativava completamente o vírus. A segunda geração de vacinas continuou sendo produzida em tecido nervoso de mamíferos adultos, porém, o vírus passou a sofrer inativação completa. Semple (1911) utilizou suspensão de cérebro infectado inativado pelo fenol. Todas essas vacinas apresentavam sérios riscos de acidente alérgico, devido às altas concentrações de mielina, visto que eram preparadas a partir de cérebros de animais adultos. Fuenzalida e Palácios (1965) desenvolveram uma vacina produzida em cérebros de camundongos lactentes e inativada pela  $\beta$ -propiolactona, que, atualmente, ainda é utilizada na América Latina para imunizar animais e humanos. Seu baixo teor de mielina reduz consideravelmente os riscos de acidentes alérgicos. A terceira geração de vacinas não utiliza tecido nervoso, entre as quais estão as vacinas avianizadas, produzidas em embriões de patas e galinhas; e as vacinas de cultivos celulares, produzidas em células renais de *hamster* neonato (BHK), células diploides humanas (CDH) e células renais de macaco verde africano (VERO). Estas vacinas da terceira geração, produzidas em linhagens celulares definidas, atualmente, são as mais utilizadas para a imunização contra a raiva (BRASIL, 2005; TAKAOKA, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; VODOPIJA e CLARK, 1991; CLARK et al., 1975).

A profilaxia da raiva humana depende, principalmente, da prevenção da raiva animal que, na maior parte do mundo, obtém-se com a vacinação de cães e

gatos, e com a eliminação de animais de rua. A exposição se caracteriza pela solução de continuidade da pele ou mucosas, por mordedura, arranhadura ou mesmo lambedura de mucosas. Como primeiro tratamento, é indicado lavar a área afetada com água e sabão, seguido de aplicação de álcool etílico a 70%. Dados experimentais em cobaias demonstram que este procedimento é eficiente para evitar a infecção quando realizado até 3 horas após o contato com o vírus rábico (DEAN, 1975). Para indivíduos agredidos por animais raivosos, é indicado o tratamento profilático pós-exposição, enquanto, para os indivíduos com atividades profissionais consideradas de risco, deve ser administrado um tratamento pré-exposição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; FUNASA, 2001; PEREIRA, 1997).

As “Normas Técnicas para Tratamento Profilático Antirrábico Humano” têm sofrido várias modificações, levando-se sempre em consideração a gravidade da lesão, a saúde do animal, o diagnóstico laboratorial, a situação epidemiológica, entre outras. Mudanças significativas ocorreram também nos esquemas vacinais preconizados. Um esquema completo de vacinação consiste na aplicação (ou não) de soro antirrábico hiperimune, além de uma dose diária de vacina durante 10 dias consecutivos, seguida por três doses de reforços, administradas em intervalos de 10 dias. Em alguns casos, o número de doses consecutivas pode ser reduzido para 7 dias, seguido por duas doses de reforço em intervalos de 10 dias. Já no tratamento profilático pré-exposição, o número de doses cai para três, administradas em dias alternados, seguido por um reforço no 28º. dia após a primeira dose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; FUNASA, 2001; PEREIRA, 1997).

Os resultados obtidos, com diferentes esquemas de vacinação antirrábica, demonstram que a redução do número de doses, principalmente para indivíduos com histórico de tratamentos anteriores, pode ser uma medida bastante segura e eficaz, evitando a ocorrência de acidentes alérgicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; FUNASA, 2001, 1998; PEREIRA, 1997; LEMOS et al., 1992; SOUZA, 1990).

A vacinação antirrábica animal é sempre pré-exposição, visando inclusive a interromper o ciclo de transmissão dos animais ao homem. Por outro lado, como o vírus rábico necessita de tempo para atingir as terminações nervosas, a prolongada incubação fornece a única oportunidade para se realizar tratamento antirrábico pós-exposição no homem, incluindo a vacina e a soroterapia, a fim de eliminar as

partículas infecciosas antes de atingirem o SNC (ABBAS et al., 2003; PEREIRA, 1997; SOUZA, 1990).

No Brasil, desde 1966, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Divisão de Defesa Sanitária Animal (DDSA), instituiu o “Plano de Combate à Raiva dos Herbívoros” que, atualmente, se denomina “Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros” (PNCRH). O PNCRH é executado pelo Departamento de Saúde Animal (DSA), da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), do MAPA (BRASIL, 2005).

A legislação federal que aprova as “Normas Técnicas para o Controle da Raiva dos Herbívoros no Brasil” é a Instrução Normativa Ministerial nº 5, de 1 de março de 2002. Esta Instrução Normativa determinou a obrigatoriedade de o proprietário notificar de imediato, ao Serviço Veterinário Oficial, a ocorrência ou suspeita de casos de raiva em herbívoros. Entre outras instruções, normatizou o uso da vacinação antirrábica e detalhou as ações de controle da raiva dos herbívoros, nas diferentes Unidades da Federação (BRASIL, 2005).

O Manual Técnico do Instituto Pasteur N°1 – Controle da raiva dos herbívoros (KOTAIT et al., 1998) detalha as recomendações sobre como se deve proceder após a notificação de um caso suspeito de raiva dos herbívoros. Deve-se fazer uma anamnese detalhada sobre o caso, exame clínico, necropsia, colheita de material do SNC para diagnóstico e envio ao laboratório. Deve-se realizar a coleta de dados epidemiológicos: data de início do foco; número total de indivíduos (mamíferos) susceptíveis ao vírus; quantidade de indivíduos expostos por espécie; quantidade de animais doentes por espécie; quantidade de mortos por espécie; data da última vacinação com o tipo de vacina (atenuada ou inativada), o laboratório produtor da vacina, a data de validade e o número da partida; data de ingresso e egresso dos animais, por espécie, na fazenda; as condições clínicas dos animais; e caracterização da espécie transmissora. No caso de resultado negativo para a raiva, pelos exames laboratoriais, deve-se realizar o diagnóstico diferencial para outras doenças. No caso de resultado positivo e, se o transmissor for um cão ou um gato, deve-se rastrear seu trajeto, a fim de se identificar as fazendas por onde passou e os animais com quem teve contato, para que sejam vacinados. Todo animal agressor, comprovadamente infectado pelo vírus, deve ser sacrificado, enquanto os agredidos

devem ficar isolados e sob observação por 60 dias. Quando o agressor for um animal selvagem, deve-se comunicar o fato à Vigilância Epidemiológica, à Direção Regional de Saúde (DIR) e/ou à Prefeitura, e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Todos os humanos que entrarem em contato com o animal agressor devem ser encaminhados ao posto de Saúde mais próximo, levando consigo uma carta do Médico Veterinário que atendeu o caso, e o fato deve ser comunicado à Vigilância Epidemiológica, à DIR e/ou à Prefeitura, como também ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da região (KOTAIT et al., 1998).

A vacinação dos herbívoros domésticos em regiões epizooticas/epidêmicas deve ser realizada de 6 em 6 meses. Animais primovacinados devem receber um reforço 30 dias após a primeira dose; recém-nascidos devem ser vacinados aos 3 meses e revacinados aos 4 meses. Recomenda-se a utilização de vacina inativada e de boa procedência. Região epizootica/epidêmica, normalmente, apresenta topografia acidentada e possui muitos abrigos naturais para os morcegos hematófagos, que facilita a manutenção do número elevado de quirópteros na região. O controle da população de *D. rotundus*, em regiões epizooticas/epidêmicas, deve ser constante, a fim de reduzir a circulação do vírus rábico nessa espécie. Deve-se fazer um levantamento dos abrigos naturais e artificiais destes quirópteros, dos casos de ataque por morcegos hematófagos, da quantidade de animais agredidos e do número de lesões por animal. Recomenda-se a captura do *D. rotundus* e o uso da pasta vampiricida nestes morcegos, em cujas fazendas mais de 5% do gado apresentam mordeduras por este. Por outro lado, o controle dos hematófagos deve ser feito apenas com o uso tópico da pasta vampiricida nas mordeduras onde menos de 5% do rebanho for acometido. Deve-se realizar um trabalho educacional, de forma a conscientizar proprietários e tratadores de animais sobre a importância de se inviabilizar os abrigos artificiais, identificar e comunicar a existência de novos abrigos, bem como, sobre a importância da vacinação e da revacinação dos primovacinados, 30 dias após a primeira dose. Deve-se proceder às ações de vigilância epidemiológica: levantamento do índice de mordedura por *D. rotundus* de 2 em 2 meses; verificar do repovoamento 8 dias após a captura; inspecionar abrigos; atender aos casos suspeitos; realizar exames laboratoriais,

levantamento epidemiológico da virose, além de ações permanentes de educação que mantenham a população, a prefeitura e os CCZs alertas para as questões relativas à raiva dos herbívoros. (BRASIL, 2005; KOTAIT et al., 1998).

A vacinação dos herbívoros domésticos em regiões enzoóticas/endêmicas deve ser realizada normalmente, isto é, uma vez ao ano e com vacina inativada. Os primovacinados devem receber duas doses da vacina, com intervalo de 30 dias entre as aplicações, e os animais recém-nascidos devem ser vacinados aos 3 meses, com dose de reforço 30 dias após a primeira. Para o controle da população de morcegos hematófagos, os métodos utilizados são os mesmos das regiões epizoóticas/epidêmicas. Deve-se ainda proceder às ações de vigilância epidemiológica, da mesma forma que nas regiões epizoóticas/epidêmicas, exceto pelo levantamento do índice de mordedura por *D. rotundus*, que pode ser realizado de 4 em 4 meses (em vez de 2 em 2 meses) (BRASIL, 2005; KOTAIT et al., 1998).

O atendimento a focos de raiva dos herbívoros em regiões consideradas “esporádicas” para a raiva, deve-se empregar todos os esforços para controlar cada episódio, de forma a impedir a propagação da virose para outras propriedades da “área de influência do foco”. Esta área abrange até 5 km de raio de distância do foco. As medidas de controle, em um foco de raiva, são as mesmas adotadas nas regiões enzoóticas/endêmicas e epizoóticas/epidêmicas. Nestas regiões “esporádicas” para a raiva, após o foco controlado, há o chamado “silêncio sintomatológico”, contudo, as ações de vigilância devem perdurar por 12 meses. Deve-se fazer o levantamento do índice de mordedura por morcegos nos rebanhos, por amostragem e com intervalos de 4 meses. Deve-se verificar as condições de repovoamento das colônias dos hematófagos e inspecionar novos abrigos naturais e artificiais encontrados, a fim de verificar a presença do *D. rotundus* (BRASIL, 2005; KOTAIT et al., 1998).

O controle populacional de morcegos hematófagos deve ser realizado com o uso da pasta vampiricida, comercialmente disponível, que possui como princípio ativo o anticoagulante warfarina sódica, aplicada nos métodos seletivos direto e indireto. O método seletivo direto consiste em passar a pasta nos morcegos hematófagos fêmeas após a captura e soltá-los, utilizando-se do comportamento das fêmeas de lambar as outras do grupo e de trocar alimentos. Cada fêmea em que se

usa a pasta (“morcego-isca”) corresponde ao extermínio, na mesma colônia, de 10 a 20 outros morcegos hematófagos fêmeas da mesma espécie. Para morcegos hematófagos machos, não há comprovação de ser efetivo este tipo de controle. Por isso, ao final da captura, os morcegos hematófagos machos devem ser aproveitados para o levantamento da taxa de infecção do vírus rábico na colônia em questão. O método seletivo indireto consiste em passar a pasta na ferida que os morcegos hematófagos provocam nos herbívoros, utilizando-se do hábito destes morcegos de retornar à mesma mordida e que, provavelmente, os levará a ingerir o princípio anticoagulante (BREDT et al., 1998).

Vieira (2007) comprovou a eficácia e a seletividade do método direto com o uso de warfarina sódica a 2%, em seu estudo com *D. rotundus*. Segundo Vieira (2007), a pasta vampiricida aplicada no dorso do morcego hematófago reduziu sua população dentro dos abrigos e o método foi seletivo quanto à espécie em abrigos, onde uma espécie frugívora de morcegos coabitava com *D. rotundus*, já que não foi observada redução no número de indivíduos não-hematófagos desta espécie. Além da seletividade para a espécie, do método de controle populacional do *D. rotundus*, também foi descrita, por Almeida e Rouquayrol (2002), a redução na incidência de mordedura em bovinos e equinos, em uma região, após a utilização da warfarina (VIEIRA, 2007; ALMEIDA e ROUQUAYROL, 2002).

Os primeiros métodos desenvolvidos, para o controle da população de morcegos hematófagos, não eram seletivos quanto à espécie. Métodos como a utilização de gases tóxicos (FORNES et al., 1974) ou a explosão de abrigos com dinamite (THORNTON, 1980) exterminavam além do morcego hematófago, animais de outras espécies. Os métodos seletivos tiveram início com os anticoagulantes de uso sistêmico. Administrava-se o anticoagulante em bovinos, por via intraruminal e em doses certas, que mantinha o efeito tóxico somente para os morcegos (THORNTON, 1980). Atualmente, o anticoagulante de uso tópico é utilizado no controle da população de morcego hematófago, sob a forma de pasta aplicada em morcegos capturados, ou, em herbívoros, no ferimento pela mordedura do morcego (VIEIRA, 2007; ALMEIDA e ROUQUAYROL, 2002; BREDT et al., 1998; KOTAIT et al., 1998).

#### 4.14. Importância para Pecuária e para Saúde Pública

A raiva rural acomete os mamíferos do grupo denominado animais domésticos rurais, animais domésticos de interesse econômico, herbívoros domésticos ou simplesmente herbívoros. Ainda hoje, a raiva é considerada uma das antropozoonoses de maior importância em Saúde Pública, não só por sua evolução drástica e letal, como também por seu elevado custo social e econômico. A procura aos serviços de saúde que fazem a profilaxia da raiva, face à situação epidemiológica da raiva rural, também aumentou. Geralmente, frente a um caso de raiva nesses herbívoros domésticos, há o envolvimento de várias pessoas que manipularam o animal por se encontrar “engasgado” ou “atolado” (BRASIL, 2005; TAKAOKA, 2003).

O principal transmissor da raiva aos herbívoros domésticos, como bovídeos (bovinos e bubalinos), equídeos (equinos, asininos e muares), caprinos e ovinos, assim como aos suínos, é o morcego hematófago da espécie *Desmodus rotundus*, causando grandes prejuízos econômicos. A raiva nesse grupo de animais tem aumentado em número e se disseminado para várias regiões onde, até então, não vinha ocorrendo. No Brasil, o maior contingente é formado por rebanhos de bovídeos que necessitam ser vacinados contra a virose. O Estado do Rio de Janeiro, assim como São Paulo e vários outros com regiões de exploração Pecuária, encontra-se seriamente afetado pela raiva dos herbívoros, com regiões onde a situação é epizootica/epidêmica, e outras onde é enzoótica/endêmica ou “de alerta” (BRASIL, 2005; TAKAOKA, 2003; KOTAIT et al., 1998).

Na América Latina, estima-se que a raiva rural cause prejuízos anuais de centenas de milhões de dólares, diretamente provocados pela morte de milhares de cabeças bovinas, além dos gastos indiretos com vacinação de milhões de animais e inúmeros tratamentos profiláticos pós-exposição (soro/vacinação) de humanos que mantiveram contato com animais suspeitos. Pelo fato de *D. rotundos* (o morcego hematófago da principal espécie transmissora da raiva aos herbívoros) ser abundante em regiões de exploração Pecuária, vários países latino-americanos desenvolveram programas para o seu controle. Isso porque a vacinação de animais domésticos não impede a ocorrência de espoliações, nem a propagação da raiva

entre as populações silvestres (BRASIL, 2005; TAKAOKA, 2003; KOTAIT et al., 1998).

A OPAS instituiu projetos para estudos da geoe epidemiologia e caracterização molecular de vírus da raiva isolados nas Américas e no Caribe, que permitem associar alguns reservatórios silvestres às variantes antigênicas conhecidas do vírus rábico. O Brasil instituiu o “Programa Nacional de Profilaxia da Raiva” (PNPR), com o objetivo de promover atividades sistemáticas de combate à raiva humana, mediante o controle da antropozoonose nos animais domésticos e o tratamento específico das pessoas agredidas. Em uma análise realizada entre 1980 e 2003, pode-se observar que o número de casos diminuiu desde a implantação do PNPR. Porém, a despeito da queda brusca no número de casos em países americanos, percebeu-se que no Brasil, a partir de 1996, esse número manteve-se no mesmo patamar. Portanto, em dezembro 2004, realizou-se o “Encontro Nacional do Programa de Controle da Raiva dos Herbívoros”, cujo principal objetivo era harmonizar e padronizar as ações dos diversos atores do processo de combate à raiva dos herbívoros. Assim, caracterizaram-se as competências nas ações sanitárias frente ao PNCRH (BRASIL, 2005; CRMV-RJ, 2005; WADA et al., 2004).

Os bovinos são os herbívoros domésticos mais atingidos pela raiva em toda a América Latina, cuja população sob o risco é de aproximadamente 70 milhões (KING e TURNER, 1993). Na América Latina, estima-se uma mortalidade anual que varia de 100 mil a 500 mil bovinos (SWANEPOEL, 1994). Os prejuízos diretos, na América Latina, são estimados na ordem de 50 milhões de dólares por ano para a Economia Pecuária (KING e TURNER, 1993). No Brasil, estima-se uma mortalidade anual que varia de 30 mil (RODRIGUES DA SILVA et al., 2000) a 40 mil bovinos, causando perdas anuais estimadas em 15 milhões de dólares (HEINEMANN et al., 2002). Os prejuízos diretos, no Brasil, são estimados na ordem de 15 milhões de dólares e os prejuízos indiretos giram em torno de 22,5 milhões de dólares, por ano. Ações sanitárias têm sido postas em prática para efetivar a prevenção e o controle da raiva rural no país. Três ações devem ser adotadas sistematicamente: vigilância epidemiológica, com atendimento ao foco; vacinação dos herbívoros domésticos, com orientação aos proprietários; e controle de morcegos hematófagos *D. rotundus*,

sempre que houver risco de transmissão da raiva aos herbívoros (BRASIL, 2005; KOTAIT et al., 1998).

O vírus da raiva ocupa o 10º. lugar no *ranking* mundial de causas de mortalidade. A raiva mata, pelo menos, 55 mil anualmente, ou seja, uma pessoa a cada 10 minutos. A grande maioria destas pessoas está, claramente, em países do Terceiro Mundo. O risco para a Saúde Pública parte desde a manipulação de animais positivos por Médicos Veterinários, tratadores de animais e até mesmo açougueiros, quando proprietários inescrupulosos vendem seus animais para o açougue mais próximo. Nunca se deve aproveitar, para consumo, a carne de animais com suspeita de raiva, devido ao fato de que, em diferentes animais raivosos, domésticos e silvestres, já foram detectadas partículas virais no coração, pulmão, rim, fígado, testículo, glândula salivar, músculo esquelético e gordura marrom. Tampouco se deve manipular animal suspeito de raiva sem ter feito um esquema de vacinação antirrábica pré-exposição e sem usar equipamento de proteção individual, como luvas, jaleco e óculos de proteção (BRASIL, 2005; WHO, 2004; TAKAOKA, 2003; DELPIETRO et al., 2001; KOTAIT, 1998; PEIXOTO, 1998).

De acordo com o MAPA, um bovino raivoso pode iniciar sua eliminação do vírus rábico pela saliva de 4 a 5 dias, antes do início dos sintomas até o óbito. Em um estudo realizado com glândulas salivares de bovinos confirmadamente positivos para raiva, demonstrou-se o isolamento do vírus rábico em 46,6% dos casos com potencial de infecção, comprovada pela inoculação em camundongos. Ressalta-se, então, a importância do manuseio adequado dos herbívoros doentes, por parte das pessoas envolvidas com a prática veterinária, para a prevenção da raiva humana (WANDERLEY, 2005). Na prática da veterinária, a manipulação da boca dos herbívoros pode ocorrer quando, no quadro clínico, há disfagia, um dos sinais da raiva, interpretada como uma obstrução na faringe ou esôfago. Na maioria das vezes, este procedimento é realizado por tratadores, sem qualquer medida de biossegurança. Ainda que poucos casos de raiva humana sejam atribuídos a estes contatos, a ocorrência de casos de raiva bovina, em grande escala, acaba por gerar maior contato entre o homem e animais infectados, aumentando dessa forma o risco de contaminação (BRASIL, 2005; TAKAOKA, 2003; DELPIETRO, 2001).

Segundo o Ministério da Saúde, em 2004, foram registrados 36 casos de acidentes causados por morcegos em seres humanos e, em 2005, o número foi de 69, chegando até 91 notificações em 2006. O Brasil registrou, em 2006, seis casos de óbito por raiva humana. Minas Gerais registrou, em maio de 2006, o óbito de um Médico Veterinário que manipulou um herbívoro infectado pelo vírus rábico e que não havia sido vacinado de forma profilática, nem após o contato com o animal infectado. O tratamento profilático humano pós-exposição é sempre indicado, a vacina antirrábica é segura, não apresenta contraindicações e, em alguns casos, o tratamento profilático é feito também com soro antirrábico. A vacina, mesma utilizada no tratamento profilático humano pós-exposição, é recomendada para o tratamento profilático humano pré-exposição de profissionais que tenham contato com animais e/ou vírus, como Médicos Veterinários, Biólogos, Pesquisadores e outros, independentemente de agressões. Em 2008, foram registrados três casos de raiva humana: um em Pernambuco, outro em Goiás, ambos transmitidos por morcegos, e o terceiro no Ceará, transmitido por um sagui (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; CHAVES et al., 2007; MACEDO et al., 2006).

Apesar de a raiva ser uma encefalite viral aguda com letalidade de aproximadamente 100% e considerada um problema de Saúde Pública, principalmente em países em desenvolvimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; WARRELL et al., 2004), em 2004, nos Estados Unidos, houve o primeiro relato na literatura internacional de cura da raiva em paciente que não recebeu vacina. Neste caso, foi realizado um tratamento baseado na utilização de antivirais e sedação profunda – o “Protocolo de Milwaukee” (WILLOUGHBY et al., 2005).

No Brasil, em 2008, na Unidade de Terapia Intensiva do Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco, em Recife-PE, um tratamento semelhante ao utilizado no caso norte-americano foi aplicado em um jovem de 15 anos de idade, mordido por um morcego hematófago, tendo como resultados a eliminação viral (*clearance viral*) e a recuperação clínica, ainda que com sequelas. No caso brasileiro, o paciente não teve nenhuma sequela cognitiva, mas ficou com sequelas motoras, que poderão ser minimizadas após sessões de fisioterapia, fonoaudiologia e terapia ocupacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; GONÇALVES-PEREIRA, 2009).

No mundo até o momento, só há três casos de cura da raiva humana, sendo as três curas obtidas pelo “Protocolo de Milwaukee” estabelecido pelo Infectologista Dr. Willoughby, nos Estados Unidos, e utilizado internacionalmente. O caso do jovem brasileiro, morador do Sertão de Pernambucano, foi um deles. Outro caso ocorreu na Colômbia, mas o paciente, mesmo curado do vírus, morreu de complicações posteriores (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009; GONÇALVES-PEREIRA, 2009).

O primeiro caso de cura de um paciente de raiva humana no Brasil, além de servir para a elaboração do primeiro protocolo nacional de combate à raiva humana, vai alterar o protocolo norteamericano. Além de se adequar à realidade brasileira, os procedimentos defendidos por Médicos pernambucanos, que se reuniram em Recife-PE (no dia 10 de fevereiro de 2009) para um “Encontro Internacional sobre Raiva”, apresentam diferenças do protocolo norteamericano quanto ao uso de algumas drogas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; GONÇALVES-PEREIRA, 2009).

#### **4.15. Protocolo para tratamento da raiva humana no Brasil**

O Médico Infectologista Dr Rodney E. Willoughby, do Hospital Infantil de Wisconsin, nos Estados Unidos, foi o primeiro a conseguir a cura da raiva, usando o “Protocolo de Milwaukee”, em uma adolescente norte-americana, em 2004. Segundo o Dr. Willoughby, atualmente, a jovem frequenta uma Universidade e leva uma vida normal. Até o momento, este é o único caso do mundo de cura da doença e ausência de sequelas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; GONÇALVES-PEREIRA, 2009).

No Brasil, em 2008, Marciano Menezes da Silva, então com 16 anos, onze meses após ter contraído raiva humana ao ser mordido no tornozelo por um morcego, enquanto dormia, recebeu alta do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), em Recife-PE. Morador de Floresta, no Sertão pernambucano, o jovem passou quatro meses na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e outros sete no isolamento do HUOC. O tratamento que incluiu antivirais, analgésicos e sedativos, assim como indução ao coma, foi adaptado do “Protocolo de Milwaukee” e, portanto,

foi semelhante ao utilizado na paciente norte-americana (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; GONÇALVES-PEREIRA, 2009).

A primeira cura de raiva humana no Brasil, bem como o sucesso terapêutico da paciente dos Estados Unidos, abriram novas perspectivas para o tratamento desta doença, considerada até então letal. Diante disso, o Ministério da Saúde reuniu especialistas no assunto e elaborou o primeiro protocolo brasileiro de tratamento para raiva humana, baseado no protocolo norte-americano de Milwaukee. Este protocolo tem como objetivo orientar a condução clínica de pacientes suspeitos de raiva, na tentativa de reduzir a mortalidade dessa doença. Em virtude de o caso ter sido tratado na cidade de Recife-PE e ter sido a primeira experiência bem sucedida no Brasil, esse protocolo foi denominado “Protocolo de Recife” (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A seguir, detalhes do “Protocolo de Recife” (protocolo para tratamento da raiva humana no Brasil) serão descritos, conforme publicado pelo Departamento de Vigilância Epidemiológica / Ministério da Saúde (2009).

Quanto aos critérios de inclusão ao protocolo de tratamento, está recomendado para todo paciente com suspeita clínica de raiva, que tenha vínculo epidemiológico e profilaxia antirrábica inadequada. Endende-se de vínculo epidemiológico o caso em que o paciente tenha manifestação clínica sugestiva de raiva, com antecedentes de exposição de até 1 ano a uma provável fonte de infecção ou procedente de regiões com comprovada circulação de vírus rábico. Endende-se de profilaxia antirrábica inadequada, o paciente que não recebeu o esquema de pós-exposição antirrábico ou que recebeu o esquema de pós-exposição incompleto, ignorando as normas técnicas de profilaxia da raiva humana, ou paciente que não tenha recebido o esquema de pós-exposição em tempo oportuno. É importante que seja aplicado um termo de consentimento livre e esclarecido para os pacientes incluídos neste protocolo de tratamento (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Quanto aos critérios de exclusão ao protocolo de tratamento, são: paciente sem história de febre; história de doença superior a 14 dias; doença sem vínculo

epidemiológico com a raiva; esquema profilático de pós-exposição completo em tempo oportuno; confirmação de outra doença pelo diagnóstico diferencial; doença associada grave ou incurável, seqüela neurológica prévia limitante; ou quando o investimento terapêutico for contraindicado (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Em relação à conduta clínica para o protocolo de tratamento, mesmo antes de ter o diagnóstico confirmado laboratorialmente, deve-se conduzir todo paciente com suspeita clínico-epidemiológica de raiva humana ao Serviço de Referência do Estado para Tratamento de Raiva e ao ambiente de unidade de terapia intensiva (UTI). Colocar o paciente em isolamento de contato, usando equipamento de proteção individual adequado (avental de manga longa, máscara, luvas, óculos). Providenciar precocemente acesso venoso central, sondagem vesical de demora e sondagem nasoenteral. Dar início a uma dieta hipercalórica e hiperproteica, precocemente, por via enteral, quando possível; em adultos, preferir a posição gástrica da sonda; deixá-lo em posição pós-pilórica na presença de distensão e hipersecreção gástricas; em crianças, usar posição pós-pilórica da sonda; fazer acompanhamento nutricional, para monitoração de provável perda ponderal significativa. Manter paciente normovolêmico, usando soluções isotônicas. Intubação traqueal: seguir as indicações clássicas; ressaltar a necessidade de vigilância quanto à possível hipersalivação. Suporte ventilatório: seguir a rotina do serviço, garantindo boa oxigenação, normoventilação e proteção pulmonar. Sedação para adaptação à ventilação mecânica: seguir a rotina do serviço; sugere-se uso de Midazolam (0,03 a 0,6 mg/kg/h) associado a Fentanil (1 a 2 mcg/kg/h); se disponível, trocar Fentanil por Ketamina (0,5 a 1,0 mg/kg/h). Caso não tenha Ketamina, providenciá-la para uso obrigatório, se confirmada a raiva; evitar barbitúricos e propofol e monitorar, com escala de sedação (Ramsey IV), índice bispectral (BIS) ou eletroencefalograma (EEG). Administrar Nimodipina, 60 mg via enteral de 4/4 horas, e Vitamina C, 1 g intravenoso (IV). Profilaxia para trombose venosa profunda (TVP): usar dose recomendada para pacientes de alto risco e preferir heparina de baixo peso molecular. Profilaxia de hemorragia digestiva alta: utilizar Ranitidina (50 mg IV de 8/8 horas) ou inibidor de bomba de prótons. Profilaxia de úlcera de pressão (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Objetivos terapêuticos a serem seguidos para reduzir o risco de lesão neurológica secundária são: cabeceira elevada a 30° com cabeça centralizada em relação ao tronco; realizar mudança de decúbito a cada 3 horas; pressão arterial média (PAM)  $\geq$  80 mmHg; PVC = 8-12 mmHg (10-14 mm Hg quando em ventilação mecânica); saturação periférica de oxigênio (oximetria/SpO<sub>2</sub>)  $\geq$  94%; PaCO<sub>2</sub> = 35-40 mm Hg; NÃO fazer hiperventilação; pressão de platô das vias aéreas  $<$  30 cm H<sub>2</sub>O (proteção pulmonar); hemoglobina  $\geq$  10g%; Natremia (Na<sup>+</sup>) = 140-150 mEq/L; glicemia = 70-110 mg%; em adultos, iniciar infusão venosa contínua de insulina com Glicemia  $>$ 180 mg%, conforme protocolo próprio; manter diurese  $>$  0,5 mL/kg/h com adequada hidratação; evitar uso de diuréticos, aferir a temperatura central (esofágica, retal ou timpânica) mantendo-a entre 35 e 37°C; controlar a temperatura ambiental, drogas e resfriamento superficial (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Em relação à conduta após confirmação laboratorial da raiva, deve-se manter todas as condutas descritas anteriormente e mais as seguintes relacionadas: Amantadina, 100 mg via enteral de 12/12 horas; Não usar Ribavirina; Biopterina 2 mg/kg via enteral de 8/8 horas (disponível no Ministério da Saúde). Sedação profunda: Midazolam (1 a 2 mg/kg/h) associado a Ketamina (2 mg/kg/h) - suspender Fentanil se estiver em uso; as doses citadas não devem ser muito aumentadas; se necessário para otimizar a sedação, associar Fentanil; evitar uso de barbitúricos e propofol e monitorar com escala de sedação (Ramsey VI), BIS ou EEG (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Quanto à monitoração, deve-se iniciar imediatamente, quando o paciente for internado na UTI. Monitoração contínua: eletrocardiograma (ECG); oximetria de pulso; capnografia (quando em ventilação mecânica); PAM (se instabilidade hemodinâmica); BIS ou EEG (quando disponível); temperatura central (quando monitor disponível). Monitoração intermitente: pressão arterial (PA) [pressão não invasiva (PNI)] de 2/2 horas; pressão venosa central (PVC) de 4/4 horas; glicemia capilar de 4/4 horas; diurese de 4/4 horas; balanço hídrico de 12/12 horas; temperatura central de 2/2 horas (se não puder ser contínua); densidade urinária de 4/4 horas; dosagem sérica de sódio sérico (Na<sup>+</sup>) duas vezes ao dia (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

A colheita de amostras para exames laboratoriais deve seguir a rotina do serviço, ressaltando a necessidade de controle de: sódio, dosagem sérica 2 vezes ao dia (ver acima); gasometria arterial, para monitoração de PaO<sub>2</sub> e PaCO<sub>2</sub> quantas vezes forem necessárias; magnésio, dosagem sérica diária pelo risco de estar reduzida em associação ao vasoespasmó cerebral; zinco, dosagem sérica semanal; hormônios tireoidianos (T4 livre e TSH ultrasensível), dosagem semanal (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

A dosagem líquórica de Biopterina (BH4) deve ser realizada após a confirmação laboratorial de raiva humana. Para tal, nova amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR) deverá ser colhida e colocada em cinco frascos apropriados (total de 3,5 mL de LCR, distribuídos respectivamente em: 0,5 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,0 mL e 0,5 mL) e acondicionados em gelo seco. Os frascos serão fornecidos pelo Ministério da Saúde, que providenciará os trâmites para envio ao exterior (cerca de 15 dias). Após a anuência do Ministério da Saúde, o LCR deve ser colhido e os tubos devem ser imediatamente acondicionados em gelo seco até a entrega à transportadora. O funcionário do laboratório local deve estar presente no momento da colheita da amostra e ser responsável pelo acondicionamento e entrega à transportadora. Aproximadamente 15 dias são necessários para recebimento do resultado. Uma vez confirmada deficiência de BH4, devem ser iniciados os trâmites necessários para uma nova dosagem (controle), após 15 dias de reposição em dose máxima: Na presença de deficiência de Biopterina, deve-se fazer reposição com as seguintes doses: 5 mg/kg/dia, divididos em duas tomadas por dois dias, seguido de 10 mg/kg/dia, divididos em duas tomadas por dois dias, seguido de 20 mg/kg/dia, divididos em duas tomadas, e manter essa dosagem por quatro a seis meses. Caso haja aparecimento ou piora de movimentos anormais, deve-se discutir, com os consultores, as doses de manutenção do BH4 (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

A colheita de soro deve continuar sendo efetuada duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras), com a mesma rotina descrita para o diagnóstico definitivo; a colheita de LCR deve ser feita, uma vez por semana (segunda-feira). As colheitas devem ser suspensas, quando todos os itens forem alcançados: nível de anticorpos considerado aceitável para que se retire a sedação (3-5 UI/mL no LCR);

cessação do coma, após suspensão da sedação, sem sinais de edema cerebral e sem elevação rápida dos níveis de anticorpos (discutir com consultores) ou seus títulos não serem muito elevados ( $> 10$  UI/mL no LCR) (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Quanto à suspensão da sedação, deve ser feita de forma gradual (redução de 0,5 mg/kg/h de cada droga a cada 12 horas), quando o nível de anticorpos atingir 3-5 UI/mL no LCR e imunomodulação: deve ser feita quando houver altos títulos de anticorpos no LCR ( $> 10$  UI/mL no LCR) ou elevação rápida (discutir com consultores); deve-se usar corticosteroide, porém, as decisões, sobre a droga a ser utilizada, dose e momento do seu início, devem ser feitas em conjunto com os consultores (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Após o diagnóstico confirmatório, mediante a RT-PCR positiva, a partir de saliva, folículo piloso ou LCR, devem ser realizadas colheitas sucessivas desses tecidos. Amostras de saliva devem ser colhidas duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras), com a mesma rotina descrita para o diagnóstico definitivo. Amostras de folículo piloso e de LCR devem ser colhidas apenas uma vez por semana (segunda-feira). As colheitas de amostras devem ser suspensas quando houver três amostras negativas (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Quanto à suspensão do isolamento de contato, deve ser realizada após três amostras de saliva negativas por RT-PCR e *clearance* viral: confirmada após três amostras negativas pela RT-PCR no espécime clínico que confirmou o caso (saliva, folículo piloso ou LCR) (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Exames de imagem devem ser realizados. Doppler transcraniano (DTC): realizar diariamente a partir do internamento na UTI, quando possível, para o diagnóstico precoce de vasoespasma cerebral (ver complicações). Suspender após 15 dias de doença, se não houver alterações. Ressonância nuclear magnética de encéfalo (RNM): importante no diagnóstico diferencial, mas não é imprescindível para condução do caso. Realizar RNM com difusão (sem contraste) o mais precocemente possível, avaliando risco-benefício do transporte do paciente. Tomografia computadorizada (TC): não é indicada rotineiramente. Deve-se fazer TC

sem contraste e de urgência na vigência de complicações (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

As complicações devem ser previstas nos quadros clínicos confirmados em laboratório e as medidas cabíveis devem ser tomadas. Hipernatremia:  $\text{Na}^+ > 155$  mEq/L. Desidratação: densidade urinária  $> 1025$  e hidratar para manter PVC = 8-12 mm Hg (10-14 mmHg, quando em ventilação mecânica) e evitar hiperviscosidade. Diabetes *insipidus*: densidade urinária  $< 1005$ ; usar Desmopressina (uma a três doses a cada 12-24 horas, intranasal) ou Vasopressina (intravenosa ou subcutânea) e repor a volemia. Hiponatremia ( $\text{Na}^+ < 140$  mEq/L). Síndrome de secreção inapropriada de hormônio antidiurético (SSIHAD): paciente normo ou hipervolêmico; dosar ácido úrico sérico ( $> 4$  mg/dL), após reposição de  $\text{Na}^+$  para diagnóstico diferencial com SCPS; fazer restrição hídrica, evitando desidratação e hiperviscosidade, e realizar controle rigoroso da natremia. Síndrome cerebral perdedora de sal (SCPS): paciente hipovolêmico; dosar ácido úrico sérico ( $< 4$  mg/dL), após reposição de  $\text{Na}^+$  para diagnóstico diferencial com SSIHAD; dosar perda renal diária de  $\text{Na}^+$  (urina de 24 horas), para orientar reposição; reposição venosa de  $\text{Na}^+$  e volume; associar reposição enteral de  $\text{Na}^+$  (3-6 g/dia); limitar elevação diária de  $\text{Na}^+$  em 10-12 mEq/L (evitar mielinólise pontina); considerar uso de Fluidrocortisona (0,15 mg via enteral ao dia) ou Hidrocortisona (50 mg IV de 6/6 horas) e controlar rigorosamente a natremia (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Quando ocorrer disautonomia, deve-se aumentar sedação e, se não melhorar, associar opiáceos (Morfina ou Fentanil, em *bolus* ou contínuo); fazer avaliação com ecocardiograma e curva de enzimas, associando, se necessário, atropina, marcapasso provisório e/ou vasopressor (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Aos sinais inespecíficos sugestivos de hipertensão intracraniana (HIC), deve-se fazer a TC sem contraste de urgência; solicitar avaliação neurocirúrgica; considerar a monitorização da pressão intracraniana (PIC) com objetivos de manter  $\text{PIC} < 20$  mmHg e pressão de perfusão cerebral (PPC) (PAM-PIC)  $> 60$  mmHg e, se a  $\text{PIC} > 20$  mmHg, fazer osmoterapia com: Manitol a 20% = ataque de 0,5-1,5 g/kg IV em *bolus*; repetir 0,25-0,75 g/kg IV a cada 15 a 30 minutos, mantendo a

osmolaridade sérica  $\leq 320$  mOsm/L; ou  $\succ$  Solução salina hipertônica a 7,5% = 2-3 ml/kg IV em 1 hora; preparo: [NaCl(7,5%) – 300 mL] = [SF(0,9%) – 200 mL] + [NaCl(20%) – 100 mL]. Não hiperventilar (manter  $\text{PaCO}_2 = 35\text{-}40$  mmHg) e manter  $\text{Na}^+$  sérico entre 150-155 mEq/L (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Aos sinais de herniação, deve-se fazer osmoterapia (com manitol ou solução salina hipertônica - ver doses citadas) e hiperventilar ( $\text{PaCO}_2 = 28\text{-}30$  mmHg) até reverter a anisocoria; realizar a TC sem contraste de emergência, quando estabilizado, e solicitar avaliação neurocirúrgica de emergência para monitoração da PIC e tratamento definitivo (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Sugere-se haver vasoespasm cerebral (VEC) quando há, ao doppler intracraniano (DTC), velocidade de fluxo elevada em artéria cerebral média (circulação anterior) e em artéria vertebral (circulação posterior). Deve-se confirmar o diagnóstico por angiografia, se disponível. A conduta consiste em monitorar a PIC e o DTC; objetivar a pressão venosa central (PVC)  $> 10$  mmHg; PAM  $> 120$  mmHg; hemoglobina em torno de 10%; usar vasopressor e/ou inotrópico, se necessário, e controle rigoroso do nível sérico de magnésio, repondo-o se necessário (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Quando ocorrerem convulsões, deve-se pensar na possibilidade de HIC e/ou VEC. Tratar com diazepínico, hidantalização e outras drogas, conforme rotina (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Em caso de infecções intercorrentes, o paciente com raiva cursa com febre (poiquiloteremia) e pode apresentar leucocitose com neutrofilia, não relacionadas à infecção bacteriana. Sugerem-se investigações clínico-laboratorial e microbiológica exaustivas para o diagnóstico de infecções secundárias (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

A raiva pode mimetizar a morte encefálica (ME), com arreflexia e supressão de EEG ou BIS. Nesse caso, não está indicada suspensão do protocolo. Deve-se conduzir da seguinte forma: suspender apenas a sedação; fazer nova avaliação clínica e neurológica após 48 horas; em persistindo os sinais de ME, abrir protocolo, conforme legislação vigente; o exame confirmatório deve avaliar o fluxo

sanguíneo cerebral ou a atividade metabólica – não usar EEG. Entretanto, se confirmar ME: suspender o protocolo e seguir as orientações legais; se não confirmar ME: manter o protocolo; não reiniciar sedação; reavaliar fluxo e/ou metabolismo cerebral periodicamente (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009).

Este protocolo para tratamento da raiva humana no Brasil - o “Protocolo de Recife” (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009) - foi elaborado em sistema de colaboração entre representantes de diferentes equipes dos seguintes órgãos: Coordenação de Vigilância das Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (Eduardo Pacheco Caldas e Marcelo Yoshito Wada); Departamento de Doenças Infecção parasitárias, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco (Ana Flávia Campos, Andrezza de Vasconcelos, Gustavo Trindade Henriques Filho, Tomaz Christiano de Albuquerque Gomes e Vicente Vaz); Instituto Pasteur, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (Ivanete Kotait e Maria Luiza Carrieri); Medical College of Wisconsin, Children's Hospital of Wisconsin, USA (Rodney E. Willoughby Jr); Secretaria de Estado da Saúde de Pernambuco (José Lindemberg Martins Machado, Maria de Lourdes Ribeiro, Maria Desi de S. Passos Menezes e Tereza Valença); Hospital de Base do Distrito Federal, Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal (Cesar Zahlouth); Instituto Evandro Chagas e Hospital Universitário (João de Barros Barreto); Universidade Federal do Pará (Rita Medeiros); Sociedade de Terapia Intensiva de Pernambuco (Gustavo Trindade Henriques Filho e Odin Barbosa da Silva); Coordenação Geral de Laboratórios, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (Rosângela Rosa Machado) (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A experiência pernambucana originou o protocolo nacional e mudou documento americano. Agora então, redigido e revisado, o protocolo brasileiro para tratamento da raiva humana deverá ser distribuído às Secretarias de Saúde de todo o país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; GONÇALVES-PEREIRA, 2009).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Amostras obtidas

Entre os anos de 2001 e 2006, foram obtidas 81 amostras do sistema nervoso central (SNC) de herbívoros domésticos (bovinos, equinos e ovinos) positivas para a raiva (pelas técnicas diagnósticas tradicionais) e provenientes de diversas regiões do Estado do Rio de Janeiro.

As amostras provenientes do município de Campos dos Goytacazes e arredores (Norte Fluminense) foram colhidas junto ao Centro de Controle de Zoonoses e Vigilância Ambiental “Dr. Arnaldo Rosa Vianna” (CCZ Campos-RJ) e à Defesa Sanitária Animal do município (DSA Campos-RJ).

As amostras provenientes de outras regiões do Estado do Rio de Janeiro foram gentilmente cedidas pela Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” (IJV-RJ).

A descrição completa de todas as amostras obtidas, para a realização do presente trabalho, encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Amostras do sistema nervoso central (SNC) positivas para raiva, pelas técnicas diagnósticas tradicionais, obtidas de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro entre 2001 e 2006

<b>Nº</b>	<b>Amostra (Registro)</b>	<b>Município</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ano da Colheita</b>
1	056/01	Rio de Janeiro	Equino	2001
2	067/01	Rio de Janeiro	Equino	2001
3	0253/01	Itaperuna	Bovino	2001
4	0287/01	Itatiaia	Bovino	2001
5	0469/01	Rio das Flores	Bovino	2001
6	0594/01	Cantagalo	Bovino	2001
7	0084/02	Cantagalo	Bovino	2002
8	0131/02	Sumidouro	Bovino	2002
9	0133/02	Rio de Janeiro	Bovino	2002
10	0310/02	Teresópolis	Bovino	2002
11	0319/02	Sumidouro	Equino	2002
12	0365/02	Teresópolis	Bovino	2002
13	0570/02	Valença	Bovino	2002
14	0571/02	Valença	Bovino	2002
15	0658/02	Sapucaia	Bovino	2002
16	0697/02	Vassouras	Ovino	2002
17	0726/02	Sumidouro	Bovino	2002
18	0727/02	Sumidouro	Bovino	2002
19	0768/02	Resende	Bovino	2002
20	0771/02	Cantagalo	Bovino	2002
21	0810/02	Casimiro de Abreu	Bovino	2002
22	0812/02	Quatis	Equino	2002
23	0852/02	Duas Barras	Bovino	2002

Tabela 1. Continuação

<b>Nº</b>	<b>Amostra (Registro)</b>	<b>Município</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ano da Colheita</b>
24	0931/02	Teresópolis	Equino	2002
25	0945/02	Teresópolis	Equino	2002
26	0953/02	Rio de Janeiro	Equino	2002
27	002/03	Teresópolis	Bovino	2003
28	020/03	Duas Barras	Bovino	2003
29	021/03	Duas Barras	Bovino	2003
30	064/03	Teresópolis	Bovino	2003
31	065/03	Teresópolis	Bovino	2003
32	077/03	Teresópolis	Bovino	2003
33	0154/03	Paraíba do Sul	Bovino	2003
34	0155/03	Paraíba do Sul	Bovino	2003
35	0192/03	Teresópolis	Bovino	2003
36	0208/03	Sapucaia	Bovino	2003
37	0229/03	Barra Mansa	Bovino	2003
38	0232/03	Barra Mansa	Bovino	2003
39	0235/03	Petrópolis	Bovino	2003
40	0349/03	Teresópolis	Bovino	2003
41	004/04	Duas Barras	Equino	2004
42	005/04	Duas Barras	Equino	2004
43	013/04	Petrópolis	Bovino	2004
44	084/04	Rio Claro	Bovino	2004
45	109/04	Rio Claro	Bovino	2004
46	133/04	Petrópolis	Bovino	2004
47	158/04	Petrópolis	Bovino	2004

Tabela 1. Continuação

<b>Nº</b>	<b>Amostra (Registro)</b>	<b>Município</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ano da Colheita</b>
48	206/04	Rio Claro	Bovino	2004
49	229/04	Resende	Bovino	2004
50	133/04	Petrópolis	Bovino	2004
51	246/04	Petrópolis	Bovino	2004
52	252/04	Resende	Bovino	2004
53	257/04	Petrópolis	Ovino	2004
54	258/04	Petrópolis	Ovino	2004
55	259/04	Petrópolis	Ovino	2004
56	260/04	Petrópolis	Bovino	2004
57	261/04	Rio das Ostras	Equino	2004
58	262/04	Barra Mansa	Bovino	2004
59	344/04	Nova Friburgo	Ovino	2004
60	444/04	Vassouras	Bovino	2004
61	490/04	Rio Claro	Bovino	2004
62	0195/06	Barra Mansa	Bovino	2006
63	0245/06	Campos dos Goytacazes	Equino	2006
64	0252/06	Valença	Bovino	2006
65	0314/06	Campos dos Goytacazes	Bovino	2006
66	0322/06	Cantagalo	Equino	2006
67	0336/06	Campos dos Goytacazes	Equino	2006
68	0337/06	Campos dos Goytacazes	Equino	2006
69	0357/06	Campos dos Goytacazes	Equino	2006
70	0358/06	Rio Claro	Bovino	2006

**Tabela 1.** Continuação

<b>Nº</b>	<b>Amostra (Registro)</b>	<b>Município</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ano da colheita</b>
71	0373/06	Campos dos Goytacazes	Bovino	2006
72	0422/06	Itaboraí	Bovino	2006
73	0423/06	Itaboraí	Bovino	2006
74	0424/06	Itaboraí	Bovino	2006
75	0426/06	Quissamã	Bovino	2006
76	0437/06	Campos dos Goytacazes	Bovino	2006
77	0445/06	Desconhecido	Bovino	2006
78	0451/06	Quissamã	Bovino	2006
79	0452/06	Quissamã	Bovino	2006
80	0468/06	Italva	Ovino	2006
81	0471/06	Desconhecido	Bovino	2006

## **5.2. Colheita, acondicionamento e envio das amostras ao laboratório**

Foram colhidas amostras do SNC de herbívoros eutanasiados ou que vieram a óbito com a suspeita clínico-epidemiológica de raiva. As regiões de eleição para a colheita foram: tronco encefálico, córtex, corno de Amon, cerebelo e medula (para equinos). O uso de equipamento de proteção individual (EPI), como luvas de borracha e visor (óculos), durante a abertura do crânio, foi recomendado (BARROS e MARQUES, 2003; KOTAIT et al., 1998).

Para a remoção do encéfalo da caixa craniana, primeiramente desarticulou-se a cabeça, depois se fez um corte a partir do forame magno, de forma que os ossos occipital e temporal foram cortados, dos lados direito e esquerdo. Outro corte foi realizado, traçando-se uma linha imaginária imediatamente após as apófises

supraorbitárias dos ossos frontais, unindo-se o extremo caudal de um olho ao outro. Isso pôde ser feito com serra comum ou cutelo do tipo usado por açougueiros. Em seguida, retirou-se a calota craniana. Com auxílio de tesoura e pinça, cortaram-se as meninges longitudinalmente; rebateu-se a dura-máter lateralmente; o encéfalo foi, então, exposto com a dura-máter intacta, e pôde ser removido (BARROS e MARQUES, 2003).

As amostras do SNC colhidas foram embaladas em saco plástico duplo, vedado hermeticamente, identificadas de forma clara e legível. Cada amostra tinha sua identificação completa, preenchida em “Ficha Oficial de Remessa de Material para o Diagnóstico de Raiva” (Figura 1A).

O material foi encaminhado ao laboratório com esta ficha epidemiológica contendo: nome e endereço do solicitante; tipo de material colhido; dados do animal; dados do proprietário; possíveis contatos com pessoas e outros animais; se o animal foi sacrificado ou morreu naturalmente; se foi vacinado, quando; e outras informações que se julgarem pertinentes.

O modo de conservação dependeu do tempo (estimado) da remessa ao laboratório: até 24 horas, refrigerado; mais de 24 horas, congelado; na falta de condições adequadas de refrigeração, conservado em solução salina com glicerina a 50%. A qualidade do resultado laboratorial dependeu do estado de conservação do material enviado.

No momento da remessa ao laboratório, as amostra foram acondicionadas em caixa isotérmica para o transporte, com gelo suficiente para que chegassem bem conservada, e foram acompanhadas da Ficha Oficial de Remessa para o diagnóstico de raiva. A caixa foi rotulada, bem fechada, não permitindo vazamentos que pudessem contaminar quem as transportasse.

### 5.3. Local e processamento das amostras

Todas as amostras obtidas para o presente trabalho, 81 amostras do SNC positivas para a raiva dos herbívoros foram diagnosticadas pelas técnicas tradicionais, a imunofluorescência direta e o isolamento viral em camundongo, no Laboratório de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” (IJV-RJ).

O IJV-RJ é um órgão vinculado à Subsecretaria de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária (SUBVISA-RJ) da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil (SMSDC-RJ) – Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro.

Em todo o Estado do Rio de Janeiro, apenas dois órgãos realizam o serviço de diagnóstico da raiva, o IJV-RJ e a PESAGRO-RIO (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro). A PESAGRO-RIO é um órgão vinculado à Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento (SEAPPA-RJ) e o Laboratório de Biologia Animal (LBA – PESAGRO-RIO) realiza o diagnóstico da raiva. Ambos os órgãos, IJV-RJ e PESAGRO-RIO, estão localizados na região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

As amostras positivas para raiva, pelas técnicas diagnósticas tradicionais, foram submetidas ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur de São Paulo (BIOMOL – IP-SP) para análises moleculares. Todas as 81 amostras foram analisadas pela técnica de transcrição reversa, seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), 65 isolados foram positivos na amplificação, 49 isolados foram selecionados para o sequenciamento e 32 que apresentaram sequências viáveis foram analisados filogeneticamente.

O IP-SP, órgão vinculado à Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), é considerado de Referência Nacional e consorciado da OPAS – OMS.

#### 5.4. Imunofluorescência direta

As amostras encefálicas dos animais necropsiados foram submetidas à técnica de imunofluorescência direta (*direct immunofluorescence technique* – DIF), de acordo com as normas e protocolos preconizados pelo *Institut Pasteur – Paris, France* (DEAN et al., 1996).

Uma fração da amostra encefálica foi macerada para a confecção de impressões em lâminas de vidro, sempre em duplicata para cada amostra. As impressões foram realizadas tocando-se a lâmina ligeiramente no macerado. As lâminas foram etiquetadas, circundadas com esmalte, fazendo-se dois campos iguais, sendo identificadas como: impressão A e impressão B. As impressões foram fixadas durante 30 minutos imersas em acetona PA gelada.

Na impressão A (próximo à etiqueta), foi colocado o conjugado diluído em suspensão de cérebro normal (cérebro de camundongo sadio macerado em concentração ótima, diluída em solução salina). Na impressão B, foi colocado o conjugado diluído em suspensão de cérebro infectado (cérebro de camundongo inoculado com vírus “fixo”). Os dois conjugados, marcados com isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo), foram espalhados em seus respectivos campos, com bastão de vidro. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida e estufa a 37°C durante 30 minutos.

Após incubação, as lâminas foram colocadas em um recipiente com solução salina tamponada (pH 7,8) por 10 minutos e, logo após, lavadas com a mesma solução. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. Em seguida, as lâminas foram colocadas em um recipiente com água destilada por 1 minuto. A secagem das lâminas foi feita à temperatura ambiente (TA) e a montagem, com uso de lamínula e glicerina tamponada (pH 7,8). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio epifluorescente (*Olympus® BX61*), utilizando-se objetiva de imersão de 40x.

A amostra foi considerada positiva, quando apareceu a cor esverdeada fluorescente na impressão A, fato que não ocorreu na impressão B. Se a cor fluorescente aparecesse também na impressão B, deveria ser reconsiderada a qualidade do conjugado utilizado. Visto que, nesse campo B, o conjugado foi posto junto com o cérebro sabidamente infectado e, assim sendo, o conjugado ligou-se ao

antígeno presente nesse cérebro e não ao da amostra que estava sendo testada. Pelo fato de o conjugado e o antígeno não estarem fixados à lâmina, normalmente, esses são eliminados na lavagem, logo, não aparecem na visualização ao microscópio. Na impressão A, se o material fosse positivo, o conjugado se ligaria ao antígeno fixado na lâmina e, portanto, não teria sido perdido na lavagem, podendo ser visualizado ao microscópio.

### **5.5. Isolamento viral em camundongo**

O isolamento viral em camundongo (*mouse inoculation test* – MIT), ainda conhecido como “prova biológica”, foi realizado após a DIF, de acordo com as normas e protocolos preconizados pelo *Institut Pasteur – Paris, France* (KOPROWSKI, 1996).

O material encefálico suspeito, variando entre 3 a 4 g, foi macerado com auxílio de grau e pistilo, fazendo-se uma solução a 10% do macerado com solução fisiológica. Adicionaram-se 50 UI de penicilina e 2 mg de estreptomicina por cada mL de suspensão. Este material ficou 30 minutos a 5°C, para que os antibióticos atuassem. Este foi clarificado por centrifugação a 1.400 g durante 5 minutos. Manteve-se o preparo sob refrigeração (4°C) para inoculá-lo em camundongos, no mesmo dia, por via intracerebral (IC).

Oito camundongos albinos suíços de 21 dias, com peso entre 11 e 14 g, foram inoculados por IC com 0,03 mL do sobrenadante de cada amostra preparada, de acordo com a técnica preconizada por Koprowski (1996). Para tal inoculação, foram utilizadas seringas que permitissem medir exatamente a quantidade de inóculo desejada, e agulhas ultrafinas e curtas (agulhas de insulina *ultrafine*, 0,3 mL), a fim de evitar traumatismos excessivos na massa cerebral.

Fichas de identificação e de leitura das amostras inoculadas foram preparadas. Anotou-se nessas fichas, a relação dos animais mortos, doentes e eutanasiados.

Os camundongos inoculados foram mantidos em gaiolas, com água e ração, e supervisionados três vezes ao dia, para a observação do aparecimento dos sinais clínicos da raiva e morte, por 30 dias.

As mortes com menos de 48 horas foram consideradas acidentes de inoculação; mortes após 3 dias foram consideradas suspeitas de raiva, e os cérebros desses animais foram colhidos para a realização da técnica de imunofluorescência direta. Após o quinto dia, os animais que apresentaram sintomatologia condizente com a raiva (pelos arrepiados, isolamento, paralisia dos membros posteriores e apatia), foram considerados positivos.

Os animais que não apresentaram sintomas, 30 dias após a IC, foram considerados negativos e eutanasiados, observando-se as boas práticas laboratoriais.

#### **5.6. Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase**

As amostras de tecido nervoso, positivas para a raiva no MIT e na DIF, foram submetidas à transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (*reverse transcription-polymerase chain reaction* – RT-PCR) para a amplificação de um segmento do gene codificador da nucleoproteína do vírus rábico.

Para a reação de RT e para a PCR, foram utilizados os *primers* 21G senso (5'-ATGTAACACCTCTACAATG-3') na posição 55-73 do gene N, e 304 antissenso (5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3') na posição 1.514-1.533 do gene N, com um produto estimado de 1.478 pares de bases (bp), conforme protocolo descrito por Orciari et al. (2001).

Os isolados que apresentaram resultados negativos na técnica de PCR, utilizando-se os *primers* 21G e 304, foram submetidos a nova PCR com a mudança do *primer* 21G pelo 504 senso (5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3') na posição 1.286-1.317 do gene N, com capacidade de amplificar fragmento menor do gene N, em um produto estimado de 249-bp.

### 5.6.1. Extração de RNA total

Essa etapa tem como objetivo extrair o RNA presente nos isolados estudados, para posterior utilização na RT e obtenção do c-DNA (DNA complementar). A extração foi realizada com o *TRIzol*<sup>®</sup> *Reagent* (Invitrogen<sup>™</sup>), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para cada extração, foram macerados 3 a 5 g de tecido encefálico, com auxílio de bisturi estéril e lâmina descartável. Após a maceração, as amostras foram colocadas em tubos de 1,5 mL, acrescentando-se 1 mL de *TRIzol*<sup>®</sup> *Reagent*. O material foi homogeneizado em vórtex por aproximadamente 20 segundos, e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 200 µL de clorofórmio, homogeneizou-se o material em vórtex por 20 segundos e, depois, este foi incubado à TA por 2 a 3 minutos.

Após a incubação, foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 15 minutos à temperatura de 4°C, seguida da transferência da fase aquosa (sobrenadante), no volume máximo de 650 µL, para outro tubo de 1,5 mL. Foram acrescentados 650 µL (mesmo volume retirado na etapa anterior) de álcool isopropílico a esse novo tubo, que foi, então, submetido à homogeneização em vórtex por 20 segundos e incubado à TA por 10 minutos. Em seguida, o tubo foi submetido a uma nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos, à temperatura de 4°C, o sobrenadante foi descartado e permaneceu, no fundo do tubo, apenas um *pellet* de RNA.

Após a remoção do sobrenadante, acrescentou-se 1 mL de etanol a 75%, submeteu-o à homogeneização em vórtex por 20 segundos, e a outra centrifugação a 12.000 g por 5 minutos à temperatura de 4°C. Após essa centrifugação, o tubo foi vertido para descartar o etanol e foi seco à TA por 1 hora. Seguindo-se a secagem, foi realizada ressuspensão do RNA final em 25 µL de água livre de *DNAse* e *RNAse*. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e submetida à rápida centrifugação (em microcentrífuga por 8 segundos) e, então, deixada em “banho seco” por 10 minutos a 56°C. Em seguida, conservou-se o RNA extraído em freezer a -20°C até o momento do uso.

Para o controle positivo, foram utilizados 300 µL de suspensão de cérebro de camundongo infectado com o vírus “fixo” padrão *Challenge virus standard* (CVS). Para o controle negativo da reação, foram utilizados 300 µL de água livre de *DNase* e *RNase*. Deve-se ressaltar que alguns cuidados tiveram que ser tomados, como a manipulação de todos os tubos com auxílio de papel de filtro para evitar contaminação, procedimento este realizado dentro da cabine de segurança biológica (fluxo laminar vertical, classe II), para evitar a emissão de aerossóis.

### 5.6.2. Transcrição reversa

Antes do início da técnica de transcrição reversa (*reverse transcription – RT*), realizou-se, na sala de reagentes, desinfecção da câmara asséptica (fluxo laminar) com álcool a 70% e luz ultravioleta (UV) por 15 minutos.

Para evitar a contaminação, todo o preparo de reagentes foi realizado em fluxo laminar, instalado em uma sala exclusiva para preparo de reagentes; e a adição de RNA de todas as amostras foi realizada em outra sala, com um fluxo laminar exclusivo.

Todos os reagentes foram descongelados, em “banho de gelo”, e foram identificados os tubos de 0,5 mL ou 0,2 mL para cada amostra testada.

Todos os reagentes utilizados na reação de RT, com exceção da enzima *RT* e *RNAseOUT*<sup>®</sup> (*Invitrogen*<sup>™</sup>) – inibidora da *RNAse*, foram homogeneizados em vórtex por 20 segundos, e centrifugados rapidamente (*spin*).

Após esse preparo, foi feito um *Mix* de todos os reagentes utilizados na reação de RT, para um total de amostras testadas, seguindo o Quadro 1.

Reagente	Volume/Amostra ( $\mu\text{L}$ )
<i>5x First Strand Buffer</i>	8
<i>dNTPs 10 mM</i>	6
<i>DTT 0,1 M</i>	4
<i>RT 200 U/<math>\mu\text{L}</math></i>	1
<i>Primer 21G (10 <math>\mu\text{M}</math>)</i>	5
<i>Primer 304 (10 <math>\mu\text{M}</math>)</i>	5
<i>H<sub>2</sub>O DNase, RNase free</i>	12
<i>RNaseOUT 40 U/<math>\mu\text{L}</math></i>	1
Total de <i>Mix</i>	42
RNA	5

**Quadro 1.** Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT).

Foram distribuídos 42  $\mu\text{L}$  do *Mix* de reagentes, em cada tubo de amostra a ser testada e, em seguida, foram acrescentados 5  $\mu\text{L}$  do RNA extraídos de cada amostra.

Em seguida, cada tubo foi submetido a *spin* e, posteriormente, levado ao termociclador *Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf<sup>TM</sup>)*, sendo submetido a uma ciclagem de 42°C por 1 hora.

Ao término dessa etapa, as reações foram armazenadas a -20°C até o momento de uso para a reação de PCR.

Foi acrescentado um controle positivo (CVS) e um controle negativo (água livre de *DNase* e *RNase*) em cada reação de RT realizada.

### 5.6.3. Reação em cadeia da polimerase

Antes do início da PCR realizou-se, na sala de reagentes, desinfecção da câmara asséptica com álcool 70% e luz UV por 15 minutos.

Os reagentes foram descongelados, em “banho de gelo”, e os tubos de 0,2 mL foram identificados para cada amostra a ser testada.

Cada reagente foi homogeneizado em vórtex e submetido a *spin*, com exceção da *Taq* DNA Polimerase (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) que foi submetida somente a *spin*, para evitar que se formasse espuma nesta enzima e, como consequência, interferisse negativamente na reação.

Os reagentes da PCR foram misturados (*Mix*) nas quantidades especificadas no Quadro 2.

Reagente	Volume/Amostra (µL)
10x PCR <i>Buffer</i>	10
<i>dNTPs</i> 1,25 mM	16
<i>Primer</i> 21G (10 µM)	5
<i>Primer</i> 304 (10 µM)	5
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (cofator da enzima <i>Taq</i> )	5
<i>Taq</i> DNA polimerase 5 U/µL	0,5
H <sub>2</sub> O <i>DNase</i> , <i>RNase free</i>	50,5
Total de <i>Mix</i>	92
c-DNA	10

**Quadro 2.** Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Desse *Mix* de reagentes, foram distribuídos 92  $\mu$ L em cada tubo e, em seguida, foram acrescentados 10  $\mu$ L do c-DNA de cada amostra.

Após esse procedimento, os tubos foram levados ao termociclador *Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf<sup>™</sup>)*, onde foram submetidos a ciclos de temperatura, seguindo o Quadro 3.

Reação	Temperatura/Tempo
Desnaturação	94°C/5 min
Amplificação - 35x	94°C/45 s - desnaturação 55°C/45 s - anelamento 72°C/2 min - extensão
Extensão final	72°C/10 min
Conservação	4°C (ou -20°C)

**Quadro 3.** Ciclos de temperatura para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, e a leitura foi realizada em transluminador de luz UV.

#### 5.6.4. Eletroforese em gel de agarose

Para o preparo do gel de agarose a 1%, 0,5 g de agarose foi adicionado a 50 mL de tampão (TBE 1X). Em seguida, a mistura foi levada ao forno de micro-ondas para dissolver a agarose (1 minuto e 30 segundos).

A agarose já dissolvida foi despejada no suporte da cuba eletroforética, onde foi colocado o pente, que permite a formação de poços para a aplicação de amostras no gel, e foi esperado que a agarose se solidificasse por no mínimo 30 minutos à TA.

O gel foi colocado com o suporte dentro da cuba eletroforética, que foi preenchida com tampão TBE 1X e foram adicionados 7  $\mu$ L de brometo de etídeo para cada 100 mL de tampão. O TBE 1X devia cobrir 2 mm do gel de agarose.

Para cada 10  $\mu$ L do produto da PCR de cada amostra, foram adicionados 2  $\mu$ L de *BlueJuice* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), um corante para visualizar a corrida. Em seguida, cada amostra foi aplicada em um poço no gel. Foram adicionados 5  $\mu$ L do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 100-pb, em cada poço das extremidades.

Após este procedimento, a cuba eletroforética foi ligada para corrida de 1 hora a 110 volts. O resultado da corrida eletroforética foi visualizado em transluminador de luz UV. As amostras positivas apresentaram, no gel, as bandas do tamanho esperado, e os resultados foram documentados digitalmente.

#### 5.6.5. Purificação direta do produto da PCR

A purificação do produto da PCR teve por objetivo retirar todas as sobras de reagentes da reação de PCR para não interferir na reação do sequenciamento.

O fragmento do DNA amplificado foi purificado com o *GFX*<sup>®</sup> *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*Amersham Bioscience*<sup>TM</sup>).

Foram adicionados 100  $\mu$ L do produto da PCR em tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500  $\mu$ L de *Capture Buffer* (presente no *kit* de purificação do

produto de PCR); depois, a amostra foi homogeneizada em vórtex e realizou-se o *spin*.

Esta mistura foi transferida para a coluna (presente no *kit*), já dentro dos tubos coletores identificados (também presentes no *kit*), e foi centrifugada em uma microcentrífuga a 14.000 *g* por 30 segundos.

Após a centrifugação, o material foi descartado dos tubos coletores. Em seguida, retornou-se a coluna para seu tubo coletor correspondente e acrescentaram-se 500  $\mu$ L de *Wash Buffer* (presente no *kit*). Realizou-se, novamente, a centrifugação a 14.000 *g* por 30 segundos.

Seguida da centrifugação, o tubo coletor foi descartado e, a coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL. Para que o DNA da coluna fosse eluído, foram acrescentados de 15 a 50  $\mu$ L de *Elution Buffer* ou água ultrapura pH 8,0 (em quantidade dependente da intensidade das bandas no gel de agrose).

Após a eluição, a coluna foi incubada por 1 minuto à TA, e submetida à centrifugação a 14.000 *g* por 1 minuto.

As colunas foram descartadas e os tubos, contendo o DNA purificado, fechados.

#### **5.6.6. Purificação do produto da PCR a partir do gel**

A purificação do produto da PCR a partir do gel foi necessária quando a reação da PCR resultou em mais de uma banda (aparecimento de bandas inespecíficas) na eletroforese. Nessa etapa, objetivou-se retirar somente a banda específica para que não ocorresse interferência durante a reação de sequenciamento.

Foi preparado um gel de agarose a 1% a fim de separar a banda específica da banda inespecífica. Para cada amostra, foram aplicados 90  $\mu$ L do produto da PCR, divididos em dois poços do gel. Adicionaram-se 5  $\mu$ L de *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) nos poços das extremidades.

A cuba eletroforética foi ligada por 1 hora a 110 volts. Após esse tempo, o resultado da corrida eletroforética foi observado em transluminador de luz UV, e

a banda com o tamanho esperado foi cortada e retirada do gel com a utilização de estilete estéril.

O gel recortado foi pesado e, em seguida, acrescentou-se o *Capture Buffer* em cada tubo, na proporção de 10  $\mu$ L para cada 1 mg de gel.

Posteriormente, os tubos foram fechados vigorosamente, incubados a 60°C, em “banho seco”, até a agarose dissolver-se por completo (5 a 15 minutos).

Durante a incubação, a coluna foi acondicionada no tubo coletor com a identificação da amostra a ser utilizada.

Após completa dissolução da agarose, a amostra foi submetida à homogeneização em vórtex seguida de *spin*, e transferida do tubo para a coluna, já dentro do tubo coletor. Esse material foi incubado à TA por 1 minuto, e submetido à centrifugação a 14.000 *g* por 30 segundos.

Descartou-se o material presente no fundo do tubo coletor, devolveu-se a coluna para o tubo e acrescentaram-se a ela 500  $\mu$ L de *Wash Buffer*. Centrifugou-se a 14.000 *g* por 30 segundos e, em seguida, descartou-se o tubo coletor, e a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL.

Para eluir o DNA da coluna, foram acrescentados de 10 a 50  $\mu$ L de *Elution Buffer* ou água ultrapura (pH 8,0), sendo deixada por 1 minuto à TA e centrifugada a 14.000 *g* por 1 minuto.

A coluna foi descartada e o tubo, contendo o DNA purificado, foi fechado e mantido a -20°C até o momento do uso.

#### **5.6.7. Quantificação de DNA**

Nessa etapa, objetivou-se quantificar o DNA purificado para que se pudesse acrescentar, na reação de sequenciamento, uma concentração exigida, de acordo com a quantidade de DNA purificado.

Para cada amostra, foram aplicados, no poço do gel de agarose a 2%, 4  $\mu$ L do DNA purificado e misturado com 1  $\mu$ L de *BlueJuice* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>).

Foram aplicados 4  $\mu$ L de *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), diluídos a 1:4, nos poços das extremidades.

A cuba eletroforética foi ligada por 1 hora a 110 volts. Após este tempo, o resultado da corrida eletroforética foi observado em transluminador de luz UV.

A intensidade das bandas de cada amostra foi comparada com as bandas do *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™)*, para se inferir a quantidade em nanogramas (ng) de DNA presente na amostra.

A amostra foi conservada a -20°C até o momento da realização de reação de sequenciamento, e o gel de agarose foi desprezado em solução de hipoclorito de sódio a 20%.

## 5.7. Sequenciamento de DNA

O objetivo desta etapa foi sequenciar os produtos da PCR purificados, com intuito de conhecer a sequência de nucleotídeos dos DNA complementares (cs-DNA) amplificados e, indiretamente, inferir a composição de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes amplificados.

O sequenciamento foi resolvido no sequenciador automático *ABI-3100 (Applied Biosystems™)*. Para que as amostras fossem analisadas no sequenciador automático, foi necessário fazer a reação de sequenciamento e a purificação do DNA das amostras.

### 5.7.1. Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada seguindo o protocolo do *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™)*.

O *kit* apresentava um *Mix* pronto para uso, ao qual foram adicionados apenas a amostra e o *primer*.

Como controle, utilizou-se uma amostra de DNA de fita dupla, *pGEM®-3Zf(+)*, com seu respectivo *primer* senso -21M13.

Para cada amostra, foram realizadas duas reações, uma com o *primer* senso 21G e outra com o *primer* antissenso 304.

Preparou-se uma solução com o produto da purificação do DNA (de 12,5 a 60 ng de DNA, dependendo da quantificação na amostra), 4  $\mu\text{L}$  de *Mix*, 1  $\mu\text{L}$  de *primer* (senso ou antissenso a 3,2  $\mu\text{M}$ ) e água ultrapura q.s.p. 10  $\mu\text{L}$ .

A distribuição de reagentes, por volume de amostra, utilizados na reação de sequenciamento pode ser visualizada no Quadro 4.

Reagentes	Volume/Amostra ( $\mu\text{L}$ )
<i>BigDye</i>	4
<i>Primer</i> 3,2 $\mu\text{M}$	1
PCR	Definir
H <sub>2</sub> O <i>DNase</i> , <i>RNase free</i>	Definir
Total	10

**Quadro 4.** Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

Os reagentes foram levados ao termociclador *Mastercycler<sup>®</sup> Gradient* (*Eppendorf<sup>™</sup>*) e submetidos aos seguintes ciclos de temperatura: 1º ciclo – desnaturação a 96°C por 1 minuto; 2º ciclo – desnaturação a 96°C por 10 segundos; 3º ciclo – anelamento a 50°C por 5 segundos; 4º ciclo – extensão a 60°C por 4 minutos. Repetiu-se, do 2º ao 4º ciclo, 35 vezes e, finalizou-se com o 5º ciclo – manutenção a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Em todas as mudanças de ciclos, foi necessária uma “rampa” rápida de temperatura a 1°C/segundo.

O controle do sequenciamento se faz com a amostra *pGEM<sup>®</sup>*- parte do *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Amersham Biosciences<sup>™</sup>*).

A reação-controle do sequenciamento se faz como especificado no Quadro 5.

Reagente	Volume/Amostra ( $\mu\text{L}$ )
<i>BigDye</i>	4
<i>Primer</i> 0,8 $\mu\text{M}$	4
<i>pGEM</i> 200 ng/ $\mu\text{L}$	1
H <sub>2</sub> O <i>DNAse, RNAse free</i>	1
Total	10

**Quadro 5.** Reagentes utilizados na reação-controle do sequenciamento.

Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento devem estar a uma concentração de 3,2  $\mu\text{M}$ , diferente da concentração usada na RT-PCR (10  $\mu\text{L}$ ).

Toda a reação deve ser realizada na ausência de luz, já que os nucleotídeos são marcados com fluoresceína.

Assim que terminou o último ciclo de temperatura, a reação foi mantida a 4°C para a purificação da reação de sequenciamento.

### 5.7.2. Purificação da reação de sequenciamento por *Sephadex*

Essa etapa teve por objetivo retirar todas as sobras de reagentes de sequenciamento para posterior análise no sequenciador de DNA. Para essa etapa de purificação, foi utilizado *Sephadex*<sup>®</sup> G-50 (GE *Healthcare*<sup>™</sup>), seguindo as recomendações do fabricante.

Adicionou-se *Sephadex*<sup>®</sup> G-50 à placa *MultiScreen HV* (*Millipore*), com auxílio de medidor próprio. Adicionaram-se 300 µL de água ultrapura por orifício, incubando-se por 3 horas.

Uma placa coletora foi colocada embaixo da placa *MultiScreen HV* que foi submetida à centrifugação a 710 g por 10 minutos. A água da placa coletora foi descartada, e adicionaram-se 140 µL de água ultrapura em cada orifício.

Em seguida, centrifugou-se a 710 g por 10 minutos. Descartou-se a água da placa coletora e fez-se uma nova concentração por 10 minutos a 710 g. Trocou-se a placa coletora por outra placa de PCR, colocou-se o produto do sequenciamento em cima do *Sephadex*<sup>®</sup> G-50 e centrifugou-se a 710 g por 10 minutos. Transferiu-se o produto resultante da centrifugação em tubos de 0,2 mL, levando-se os tubos para o termociclador a 95°C, por 15 minutos, para evaporar todo o líquido.

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida *HiDi* (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>), homogeneizadas em vórtex, transferidas para a placa de sequenciamento e centrifugadas rapidamente (*spin*).

A placa era levada ao termociclador *Mastercycler*<sup>®</sup> *Gradient* (*Eppendorf*<sup>™</sup>), a 95°C por 5 minutos e, em seguida, colocada em gelo por mais 5 minutos.

Após, foi realizada nova centrifugação rápida, e a placa colocada no sequenciador automático *ABI-3100* (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>).

## 5.8. Análise filogenética

Analisou-se o fragmento de 1478-bp correspondente ao gene N, localizado entre os nucleotídeos 55 e 1533 do vírus fixo de referência *Pasteur virus* – PV (número de acesso no *GenBank* M13215).

O sequenciador automático *ABI-3100* (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>) exibiu o resultado no formato de um cromatograma. Os produtos do sequenciamento bruto foram editados, utilizando-se o software *Chromas* versão 2.24 (*Copyright*<sup>®</sup> 1998-2004 *Technelysium Pty Ltd*). Foram excluídas as regiões onde o cromatograma não apresentou boa definição do sequenciamento.

Para cada um dos 32 isolados do vírus rábico, do presente trabalho, foram produzidas duas sequências, uma senso e outra antissenso. A sequência completa foi obtida a partir dessas seqüências, senso e antissenso, com a função CAP (*Contig Assembly Program*) do *software BioEdit* versão 7.0.0 (HALL, 1999). As extremidades das sequências foram eliminadas de forma que todas ficassem do mesmo tamanho. O fragmento esperado, quando alinhado com a sequência completa de nucleotídeos do vírus fixo de referência PV (M13215), correspondeu à sequência total de nucleotídeos do genoma do vírus rábico. Após edição e análise, obteve-se a sequência final de nucleotídeos situada na região do gene N.

A sequência final de cada isolado do vírus rábico foi alinhada com sequências homólogas obtidas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), utilizando-se o método *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) do *software BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), e o resultado final foi submetido ao *BLASTn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para confirmar a homologia (ALTSCHUL et al., 1990).

Os alinhamentos foram então utilizados para construir as árvores filogenéticas, por meio do *software Mega 2.1* (KUMAR et al., 2001), com base no método algorítmico de distância *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987). A distância evolucionária foi computada, utilizando-se o modelo evolutivo *Kimura-2-parameter* (KIMURA, 1980).

A topologia da árvore filogenética foi avaliada pelo método de *bootstrap* com mil repetições (FELSENSTEIN, 1985) para apoio estatístico, maior confiabilidade, e definir relacionamentos entre as sequências isoladas, utilizando o *software Mega 2.1* (<http://www.megasoftware.net/>).

As identidades entre as sequências alinhadas foram calculadas e a análise filogenética foi realizada, mediante o *software BioEdit*.

A descrição completa das amostras disponíveis no *GenBank*, utilizadas na análise filogenética encontra-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Amostras de vírus rábico disponíveis no *GenBank* para a análise filogenética com número de acesso, localização, espécie e ano do isolamento

<b>Amostra (GenBank)</b>	<b>Município</b>	<b>Estado</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ano do Isolamento</b>
AB083810	Araquanã	TO	Bovino	1999
AB083809	Nova Olinda	TO	Bovino	1998
AB083814	Cáceres	MT	Bovino	1999
AB083798	Anápolis	GO	Cão	1999
AB083801	Goiânia	GO	Humano	1999
AB083813	Alto Taquari	MT	Bovino	1999
AB083818	Corumbaíba	GO	Bovino	1999
AB117972	São José do Rio Preto	SP	<i>Artibeus planirostris</i>	1998
AB117970	São José do Rio Preto	SP	<i>Artibeus lituratus</i>	1998
AB117969	Itapira	SP	<i>Artibeus lituratus</i>	1998
AB201804	Lindóia	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	2000
AB201803	Lindóia	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	2000
AB083806	Taubaté	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	-
AB083807	Pindamonhangaba	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	1998
EF428577	Quissamã	RJ	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
EF428580	Quissamã	RJ	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
EF428579	Quissamã	RJ	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
EF428581	Quissamã	RJ	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
EF428578	Quissamã	RJ	<i>Desmodus rotundus</i>	2006

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Imunofluorescência direta e isolamento viral

Foram analisadas 81 amostras de SNC de herbívoros domésticos positivas para raiva, pelas técnicas diagnósticas tradicionais, a imunofluorescência direta (DIF) e o isolamento viral em camundongo (MIT). Todas as amostras foram colhidas no Estado do Rio de Janeiro, em diversas regiões, entre os anos de 2001 e 2006. Quanto às espécies de herbívoros das 81 amostras positivas, 6 foram obtidas de ovinos, 15 de equinos e 60 de bovinos. Temporalmente, as amostras foram assim distribuídas: 6 de 2001, 20 de 2002, 14 de 2003, 21 de 2004 e 20 amostras de 2006. Algumas amostras de bovinos foram colhidas no ano de 2005, entretanto, por um acidente no freezer que as conservava, não fizeram parte do presente trabalho.

A Tabela 3 apresenta os resultados positivos das técnicas tradicionais.

**Tabela 3.** Número de amostras positivas, por ano, para o vírus rábico, pelas técnicas de imunofluorescência direta (DIF) e isolamento viral em camundongo (MIT)

Ano	Nº de Amostras DIF e MIT	Nº de Amostras Positivas DIF	Nº de Amostras Positivas MIT
2001	6	6	6
2002	20	16	20
2003	14	14	14
2004	21	20	21
2006	20	18	20
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>74</b>	<b>81</b>

O diagnóstico da raiva no Estado do Rio de Janeiro, primeiramente, foi feito pela DIF e depois pelo MIT. Dentre as 81 amostras do presente trabalho, na DIF, 74 foram positivas (91,3%) e 7 foram negativas. Dessas 7 amostras negativas, 3 foram oriundas de equinos e 4 de bovinos. Por outro lado, no MIT essas 7 amostras foram positivas. Logo, as 81 amostras foram positivas (100%) pelo MIT (Tabela 3).

## **6.2. Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase**

Todas as amostras positivas para o vírus rábico pelas técnicas diagnósticas tradicionais (DIF e MIT) foram submetidas à técnica molecular de RT-PCR, utilizando-se os *primers* 21G e 304 (Tabela 4). A total sequência de nucleotídeos do gene N foi obtida, para os 65 isolados positivos pela RT-PCR (21G/304), e resultou em um fragmento de 1.478-bp. Nenhuma amplificação pôde ser encontrada no controle negativo e nenhuma banda extra foi detectada na reação. Adicionalmente, as amostras que não amplificaram com os *primers* 21G e 304, foram novamente submetidas à RT-PCR, utilizando-se os *primers* 504 e 304 (Tabela 5) que amplificam uma região menor do genoma do vírus rábico, com tamanho do produto de 249-bp.

### **6.2.1. Primers 21G e 304**

Das 81 amostras testadas, 65 foram positivas, na RT-PCR, com os *primers* 21G e 304 (1478-bp). Os resultados demonstraram concordância em 80,2% entre as técnicas diagnósticas tradicionais (DIF e MIT) e a técnica de RT-PCR, utilizando-se os *primers* 21G e 304. Dos 16 isolados que foram negativos pela RT-PCR, utilizando-se os *primers* 21G e 304, 3 haviam apresentado resultado negativo pela DIF, os quais somente foram positivos após o MIT (Tabelas 4 e 5).

A Tabela 4 apresenta cada amostra, com a sua localização, a espécie de herbívoro, o ano de obtenção e os resultados das técnicas tradicionais e molecular.

**Tabela 4.** Amostras obtidas de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro entre 2001 e 2006 positivas para raiva pelas técnicas de DIF e MIT, e submetidas à técnica de RT-PCR com os *primers* 21G e 304

Nº	Amostra	Município	Espécie	Ano	DIF	MIT	RT-PCR
1	056/01	Rio de Janeiro	Equino	2001	+	+	-
2	067/01	Rio de Janeiro	Equino	2001	+	+	+ Fraca
3	0253/01	Itaperuna	Bovino	2001	+	+	+
4	0287/01	Itatiaia	Bovino	2001	+	+	+
5	0469/01	Rio das Flores	Bovino	2001	+	+	+
6	0594/01	Cantagalo	Bovino	2001	+	+	+ Fraca
7	0084/02	Cantagalo	Bovino	2002	+	+	-
8	0131/02	Sumidouro	Bovino	2002	+	+	+ Fraca
9	0133/02	Rio de Janeiro	Bovino	2002	+	+	-
10	0310/02	Teresópolis	Bovino	2002	+	+	-
11	0319/02	Sumidouro	Equino	2002	+	+	+
12	0365/02	Teresópolis	Bovino	2002	+	+	+ Fraca
13	0570/02	Valença	Bovino	2002	-	+	+ Fraca
14	0571/02	Valença	Bovino	2002	-	+	+ Fraca
15	0658/02	Sapucaia	Bovino	2002	-	+	+
16	0697/02	Vassouras	Ovino	2002	+	+	+
17	0726/02	Sumidouro	Bovino	2002	+	+	+

Tabela 4. Continuação

Nº	Amostra	Município	Espécie	Ano	DIF	MIT	RT-PCR
18	0727/02	Sumidouro	Bovino	2002	+	+	+ Fraca
19	0768/02	Resende	Bovino	2002	+	+	+
20	0771/02	Cantagalo	Bovino	2002	+	+	+
21	0810/02	Casimiro de Abreu	Bovino	2002	+	+	-
22	0812/02	Quatis	Equino	2002	+	+	+ Fraca
23	0852/02	Duas Barras	Bovino	2002	+	+	+
24	0931/02	Teresópolis	Equino	2002	+	+	+ Fraca
25	0945/02	Teresópolis	Equino	2002	-	+	+ Fraca
26	0953/02	Rio de Janeiro	Equino	2002	+	+	+ fraca
27	002/03	Teresópolis	Bovino	2003	+	+	+
28	020/03	Duas Barras	Bovino	2003	+	+	+ Fraca
29	021/03	Duas Barras	Bovino	2003	+	+	-
30	064/03	Teresópolis	Bovino	2003	+	+	+
31	065/03	Teresópolis	Bovino	2003	+	+	+
32	077/03	Teresópolis	Bovino	2003	+	+	+ Fraca
33	0154/03	Paraíba do Sul	Bovino	2003	+	+	+
34	0155/03	Paraíba do Sul	Bovino	2003	+	+	+ Fraca
35	0192/03	Teresópolis	Bovino	2003	+	+	+ Fraca
36	0208/03	Sapucaia	Bovino	2003	+	+	+
37	0229/03	Barra Mansa	Bovino	2003	+	+	+ Fraca
38	0232/03	Barra Mansa	Bovino	2003	+	+	+ Fraca
39	0235/03	Petrópolis	Bovino	2003	+	+	+ Fraca

Tabela 4. Continuação

Nº	Amostra	Município	Espécie	Ano	DIF	MIT	RT-PCR
40	0349/03	Teresópolis	Bovino	2003	+	+	+
41	004/04	Duas Barras	Equino	2004	+	+	+ Fraca
42	005/04	Duas Barras	Equino	2004	+	+	-
43	013/04	Petrópolis	Bovino	2004	+	+	+
44	084/04	Rio Claro	Bovino	2004	+	+	+
45	109/04	Rio Claro	Bovino	2004	+	+	+
46	133/04	Petrópolis	Bovino	2004	+	+	+
47	158/04	Petrópolis	Bovino	2004	+	+	+
48	206/04	Rio Claro	Bovino	2004	+	+	+
49	229/04	Resende	Bovino	2004	+	+	+
50	133/04	Petrópolis	Bovino	2004	+	+	+
51	246/04	Petrópolis	Bovino	2004	-	+	-
52	252/04	Resende	Bovino	2004	+	+	+
53	257/04	Petrópolis	Ovino	2004	+	+	+
54	258/04	Petrópolis	Ovino	2004	+	+	-
55	259/04	Petrópolis	Ovino	2004	+	+	+ fraca
56	260/04	Petrópolis	Bovino	2004	+	+	+
57	261/04	Rio das Ostras	Equino	2004	+	+	-
58	262/04	Barra Mansa	Bovino	2004	+	+	+
59	344/04	Nova Friburgo	Ovino	2004	+	+	+
60	444/04	Vassouras	Bovino	2004	+	+	-
61	490/04	Rio Claro	Bovino	2004	+	+	+

Tabela 4. Continuação

Nº	Amostra	Município	Espécie	Ano	DIF	MIT	RT-PCR
62	0195/06	Barra Mansa	Bovino	2006	+	+	+
63	0245/06	Campos dos Goy	Equino	2006	-	+	-
64	0252/06	Valença	Bovino	2006	+	+	-
65	0314/06	Campos dos Goy	bovino	2006	+	+	+
66	0322/06	Cantagalo	Equino	2006	-	+	-
67	0336/06	Campos dos Goy	Equino	2006	+	+	+
68	0337/06	Campos dos Goy	Equino	2006	+	+	+
69	0357/06	Campos dos Goy	Equino	2006	+	+	+
70	0358/06	Rio Claro	Bovino	2006	+	+	+
71	0373/06	Campos dos Goy	Bovino	2006	+	+	+
72	0422/06	Itaboraí	Bovino	2006	+	+	+
73	0423/06	Itaboraí	Bovino	2006	+	+	+
74	0424/06	Itaboraí	Bovino	2006	+	+	+
75	0426/06	Quissamã	Bovino	2006	+	+	+
76	0437/06	Campos dos Goy	Bovino	2006	+	+	+
77	0445/06	Desconhecido	Bovino	2006	+	+	-
78	0451/06	Quissamã	Bovino	2006	+	+	+
79	0452/06	Quissamã	Bovino	2006	+	+	+
80	0468/06	Italva	Ovino	2006	+	+	+
81	0471/06	Desconhecido	Bovino	2006	+	+	-

Das 81 amostras submetidas à RT-PCR com os *primers* 21G e 304, apresentaram resultados positivos: 5 isolados de 2001, 16 isolados de 2002, 13 isolados de 2003, 16 isolados de 2004 e 15 isolados de 2006. Dos 16 isolados que se apresentaram negativos por RT-PCR (*primers* 21G e 304), 1 isolado foi de ovino, 5 de equinos e 10 de bovinos.

A Tabela 5 apresenta os resultados da RT-PCR com os *primers* 21G e 304.

**Tabela 5.** Número de isolados positivos, por ano, e negativos para o vírus rábico, pela técnica de RT-PCR com os *primers* 21G e 304

Ano	Nº Testados RT-PCR ( <i>Primers</i> 21G e 304)	Nº Positivos RT-PCR ( <i>Primers</i> 21G e 304)	Nº Negativos RT-PCR ( <i>Primers</i> 21G e 304)
2001	6	5	1
2002	20	16	4
2003	14	13	1
2004	21	16	5
2006	20	15	5
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>65</b>	<b>16</b>

### 6.2.2. *Primers* 504 e 304

Os 16 isolados positivos para o vírus rábico, por DIF e MIT, e que se mostraram negativos por RT-PCR com os *primers* 21G e 304, foram submetidos à nova RT-PCR, utilizando-se os *primers* 504 e 304 (491-bp). Desses, 14 isolados demonstraram resultado positivo para o vírus rábico (Tabela 6).

Os 2 isolados negativos por RT-PCR, com os *primers* 504 e 304, foram de bovinos do ano de 2006, registrados como 0445/06 e 0471/06 pelo IJV-RJ, evidentemente, positivos pelas duas técnicas diagnósticas tradicionais (DIF e MIT).

A Tabela 6 apresenta os resultados positivos da RT-PCR com os os *primers* 504 e 304, comparados aos negativos com os *primers* 21G e 304.

**Tabela 6.** Número de isolados negativos, por ano, e positivos para o vírus rábico pela técnica de RT-PCR, respectivamente, com os *primers* 21G e 304, e com os *primers* 504 e 304

Ano	Nº Negativos RT-PCR ( <i>Primers</i> 21G e 304)	Nº Positivos RT-PCR ( <i>Primers</i> 504 e 304)
2001	1	1
2002	4	4
2003	1	1
2004	5	5
2006	5	3
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>14</b>

### 6.3. Quantificação do DNA

Os 65 isolados positivos para o vírus rábico por RT-PCR (*primers* 21G e 304) foram quantificados e, como resultado desta etapa, 8 foram excluídos do sequenciamento, por apresentarem quantidades de DNA abaixo de 2,5 ng. Temporalmente, os isolados foram assim distribuídas: 1 de 2001, 1 de 2002, 2 de 2003, 3 de 2004 e 1 de 2006. Dos 57 isolados com valores de DNA a partir de 2,5 ng, 49 foram selecionados para o sequenciamento, e somente 32 que apresentaram sequências viáveis foram utilizados para a análise filogenética.

A Tabela 7 mostra os 32 isolados do vírus rábico obtidos de herbívoros domésticos, provenientes do Estado do Rio de Janeiro, entre 2001 e 2006, os quais, após a etapa de sequenciamento apresentaram sequências viáveis para a análise filogenética.

**Tabela 7.** Isolados do vírus rábico de herbívoros do Estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2001 e 2006, sequenciados e analisados filogeneticamente

Nº	Isolado (Registro)	Município	Espécie	Ano do Isolamento
1	0287/01	Rio das Flores	Bovino	2001
2	0469/01	Itatiaia	Bovino	2001
3	0319/02	Sumidouro	Equino	2002
4	05070/02	Valença	Bovino	2002
5	0658/02	Sapucaia	Bovino	2002
6	0697/02	Vassouras	Ovino	2002
7	0726/02	Sumidouro	Bovino	2002
8	0768/02	Resende	Bovino	2002
9	0771/02	Cantagalo	Bovino	2002
10	0963/02	Rio de Janeiro	Equino	2002
11	002/03	Teresópolis	Bovino	2003
12	064/03	Teresópolis	Bovino	2003
13	065/03	Teresópolis	Bovino	2003
14	0154/03	Paraíba do Sul	Bovino	2003
15	004/04	Duas Barras	Equino	2004
16	109/04	Rio Claro	Bovino	2004

Tabela 7. Continuação

<b>Nº</b>	<b>Isolado (Registro)</b>	<b>Município</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ano do Isolamento</b>
17	243/04	Petrópolis	Bovino	2004
18	229/04	Resende	Bovino	2004
19	252/04	Resende	Bovino	2004
20	257/04	Petrópolis	Ovino	2004
21	260/04	Petrópolis	Bovino	2004
22	262/04	Barra Mansa	Bovino	2004
23	195/06	Barra Mansa	Bovino	2006
24	0337/06	Campos dos Goytacazes	Equino	2006
25	0358/06	Rio Claro	Bovino	2006
26	0422/06	Itaboraí	Bovino	2006
27	0423/06	Itaboraí	Bovino	2006
28	0424/06	Itaboraí	Bovino	2006
29	0426/06	Quissamã	Bovino	2006
30	0437/06	Campos dos Goytacazes	Bovino	2006
31	0451/06	Quissamã	Bovino	2006
32	0452/06	Quissamã	Bovino	2006

#### 6.4. Sequenciamento e análise filogenética

Após a quantificação do DNA dos 65 isolados positivos para o vírus rábico pela RT-PCR com os *primers* senso 21G e antissenso 304, 57 isolados apresentaram valores de DNA a partir de 2,5 ng e 49 foram selecionados para a etapa de sequenciamento, de acordo com os maiores valores e a distribuição regional para o estudo. O fragmento de DNA amplificado (1.478-bp) foi purificado por meio de um *kit* de purificação, visualmente quantificado com um *Ladder* e sequenciado, usando-se o *kit* de sequenciamento *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle* com os *primers* senso e antissenso. As reações foram resolvidas em um sequenciador automático *ABI-3130*. Para cada isolado viral, foram produzidas, no sequenciador automático, duas sequências, uma senso e outra antissenso. O resultado foi apresentado em formato de cromatograma. Entretanto, dos 49 isolados sequenciados, somente 32 apresentaram sequências viáveis para a análise filogenética.

Para cada um dos isolados do vírus da raiva dos herbívoros, a sequência total de 1.478 nucleotídeos do genoma, situada entre nucleótidos 55 e 1.533 foi analisada, utilizando-se o vírus fixo PV (M13215) como referência. Os 32 isolados do vírus rábico, utilizados para a análise filogenética apresentaram tamanhos de sequências variáveis de 1.301 a 1.366 nucleotídeos. Após a edição, a sequência final de 1.301 nucleotídeos foi obtida entre os nucleótidos 110 e 1.410, na região do gene N, para a análise filogenética, utilizando-se o vírus fixo PV como referência.

A topologia da primeira árvore filogenética (Figura 8), construída com os isolados do vírus rábico, obtidos a partir de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro, evidencia o agrupamento de acordo com a sua origem regional e, mostra quatro *clusters* distintos e um único isolado (0963-02) de equino da região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. O vírus fixo PV (M13215) está presente na árvore, como uma referência.

O *cluster* 1 – *subcluster* 1.1: reunindo 7 isolados da região Serrana (municípios de Teresópolis, Petrópolis, Cantagalo e Sapucaia) do Estado do Rio de Janeiro; *subcluster* 1.2: relacionando 2 isolados da região Metropolitana (município

de Itaboraí) do Estado do Rio de Janeiro e, fora de *subcluster*, segregando 2 isolados da região Serrana (municípios de Petrópolis e Sumidouro) do Estado do Rio de Janeiro.

Os *clusters* 2 – *subclusters*: 2.1, 2.2 e 2.3, e 3 – *subclusters*: 3.1 e 3.2, ambos os *clusters* reunindo isolados da região Sul (municípios de Rio das Flores, Vassouras, Itatiaia, Resende, Rio Claro, Barra Mansa e Valença) do Estado do Rio de Janeiro; o *cluster* 2 / *subcluster* 2.3: ainda apresentando 1 isolado da região Metropolitana (município de Itaboraí) do Estado do Rio de Janeiro, e o *cluster* 3 / fora de *subcluster* ainda apresentando 1 isolado da região Serrana (município de Paraíba do Sul) do Estado do Rio de Janeiro.

Entre os *clusters* 2 e 3: mostra-se segregando o único isolado (0963-02 equino) do município do Rio de Janeiro, localizado na região Metropolitana do Estado.

O *cluster* 4 – *subcluster* 4.1: reunindo 2 isolados da região Serrana (municípios de Duas Barras e Sumidouro) do Estado do Rio de Janeiro; e *subcluster* 4.2: reunindo 5 isolados da região Norte do Estado do Rio de Janeiro (municípios de Campos dos Goytacazes e Quissamã).

Na Figura 8 (a seguir), está representada essa primeira árvore filogenética, construída com os isolados do vírus rábico sequenciados, no presente trabalho.



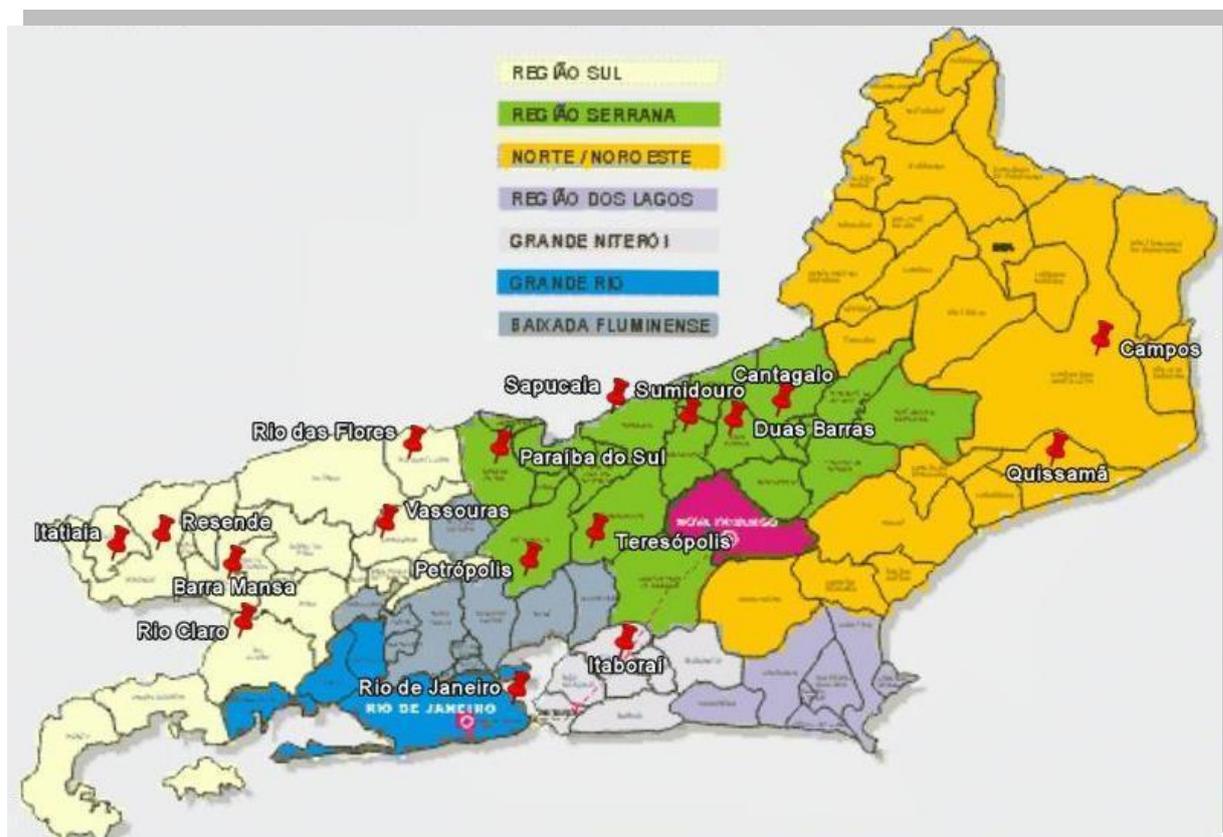
**Figura 8.** Árvore filogenética, para uma região de 1.301 nucleotídeos na posição 110-1.410 do gene N do vírus rábico, mostra 32 sequências isoladas e alinhadas, utilizando-se o método *ClustalW* e submetidas ao *BLASTn* para confirmação das sequências. O alinhamento foi utilizado para construir a árvore baseada na distância *Neighbor-Joining* (NJ) com o modelo evolutivo *kimura-2-parameters*, mediante o *software Mega 2.1*. A confiabilidade da árvore NJ foi avaliada com 1.000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* acima de 50% são mostrados acima dos nós, e a escala representa o número de substituição de nucleotídeos pelo número total no alinhamento. As identidades entre as sequências alinhadas foram calculadas, e a análise filogenética foi realizada, mediante o *software BioEdit*. Os isolados obtidos, a partir de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro, são identificados pelo registro, espécie, município e ano.

A identidade de nucleotídeos *intra* e *interclusters* dos isolados, presentes na primeira árvore filogenética (Figura 8), está resumida na Tabela 8.

**Tabela 8.** Matriz de identidade dos isolados dos *clusters* 1, 2, 3, 4, o isolado 0963-02 (de equino do município do Rio de Janeiro), e o *Pasteur virus* – PV (M13215), presentes na primeira árvore filogenética. As células em rosa representam as médias de identidade dos isolados *intraclusters* e, os cruzamentos entre linhas e colunas representam as médias de identidade *interclusters*

	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>	0963-02	<i>Cluster 3</i>	<i>Cluster 4</i>	PV(M13215)
<i>Cluster 1</i>	0,9977	0,9846	0,9832	0,9680	0,9741	0,8466
<i>Cluster 2</i>	0,9846	0,9939	0,9809	0,9676	0,9712	0,8445
0963-02	0,9832	0,9809	1,0000	0,9704	0,9750	0,8470
<i>Cluster 3</i>	0,9680	0,9676	0,9704	0,9953	0,9736	0,8404
<i>Cluster 4</i>	0,9741	0,9712	0,9750	0,9736	0,9974	0,8470
PV(M13215)	0,8466	0,8445	0,8470	0,8404	0,8470	1,000

Na Figura 9 (a seguir), o mapeamento das localidades no Estado do Rio de Janeiro, em que ocorreram os casos de raiva dos herbívoros, georreferencia a primeira árvore filogenética (Figura 8), construída no presente trabalho.



**Figura 9.** Georreferenciamento dos casos de raiva dos herbívoros que ocorreram em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2001 e 2006, representados neste Mapa pelos *plot pins* e, na Figura 8, pela árvore filogenética construída com os isolados do presente trabalho.

A topologia da segunda árvore filogenética (Figura 10), construída com os isolados do vírus rábico de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro, comparados com amostras do *GenBank* de várias regiões do Brasil, evidencia também o agrupamento regional e, mostra oito *clusters* distintos. O vírus fixo PV (M13215) está presente na árvore, como uma referência.

O *cluster* 1 – reunindo exclusivamente isolados estudados, 8 de bovinos e 1 de ovino da região Serrana do Estado do Rio de Janeiro (municípios de Sapucaia, Petrópolis, Teresópolis, Cantagalo e Sumidouro); e 2 isolados de bovinos da região Metropolitana (Itaboraí), formando o *subcluster*: 1.1, com os 2 isolados de Itaboraí.

O *cluster* 2 – também reunindo exclusivamente isolados estudados, 6 de bovinos e 1 de ovino da região Sul do Estado (Rio das Flores, Vassouras, Itatiaia, Resende, Rio Claro e Barra Mansa); e 1 isolado de bovino da região Metropolitana (Itaboraí), formando *subclusters*: 2.1, com 1 isolado de bovino de Rio das Flores e o de ovino de Vassouras; 2.2, com 2 isolados de bovinos de Itatiaia e Resende; e 2.3, com 4 isolados de bovinos, provenientes de Rio Claro, Barra Mansa e Itaboraí.

O *cluster* 3 – reunindo o isolado 0963-02 de equino da região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro (município do Rio de Janeiro), com amostras do *GenBank*, 3 de morcegos (*Artibeus spp.*) e 1 de bovino, provenientes dos Estados de São Paulo e Goiás, respectivamente, formando *subclusters*: 3.1, com 2 amostras do *GenBank*, de morcegos provenientes de São Paulo; e 3.2, com a amostra de bovino, proveniente de Goiás, e com a outra amostra de morcego, proveniente de São Paulo, e com o isolado de equino do município do Rio de Janeiro.

O *cluster* 4 – reunindo exclusivamente amostras do *GenBank*, 2 de bovinos, provenientes do Estado do Mato Grosso, não formando *subcluster*.

O *cluster* 5 – reunindo isolados estudados, 1 de bovino da região Serrana (Paraíba do Sul) e outros 4 de bovinos da região Sul (Valença, Barra Mansa e Resende) do Estado do Rio de Janeiro, com amostras do *GenBank*, 2 de *Desmodus rotundus* do Estado de São Paulo, formando *subclusters*: 5.1, com as 2 amostras de *D. rotundus* provenientes de São Paulo; 5.2, com 2 isolados de bovinos provenientes de Valença e de Barra Mansa; e 5.3, com 2 isolados de bovinos provenientes de Resende; fora de *subcluster*, o *cluster* 5 segregou o isolado de bovino proveniente de Paraíba do Sul, no Estado do Rio de Janeiro.

O *cluster* 6 – reunindo exclusivamente amostras do *GenBank*, 2 de bovinos, provenientes do Estado de Tocantins, e não formando *subcluster*.

O *cluster* 7 – reunindo amostras do *GenBank*, 2 de *D. rotundus* do Estado de São Paulo e 5 de *D. rotundus* do Estado do Rio de Janeiro, com isolados estudados, 2 de equinos da região Serrana (Duas Barras e Sumidouro), 4 de bovinos e 1 de equino da região Norte do Estado do Rio de Janeiro (Campos dos Goytacazes e Qissamã), formando *subclusters*: 7.1, com as 2 amostras de *D. rotundus* provenientes de São Paulo; 7.2, com os 2 isolados de equinos da região Serrana do Rio de Janeiro; 7.3, com os 4 isolados de bovinos e o isolado de equino da região Norte do Rio de Janeiro, e mais as 5 amostras de *D. rotundus* do Estado do Rio de Janeiro (isoladas na mesma região Norte e pela mesma equipe do presente trabalho).

O *cluster* 8 – reunindo exclusivamente amostras do *GenBank*, de humano e de cão (1 de cada), provenientes de Goiás, *cluster* relacionado com a raiva humana brasileira.

Na Figura 10 (a seguir), está representada essa segunda árvore filogenética, construída com os isolados do vírus rábico sequenciados, no presente trabalho, e alinhados com amostras do *GenBank*.



Figura 10. Cont.:

**Figura 10.** Árvore filogenética para uma região de 1.301 nucleotídeos, na posição 110-1.410 do gene N do vírus rábico, mostra 32 sequências isoladas e alinhadas com sequências homólogas disponíveis no *GenBank*, utilizando-se o método *ClustalW* do software *BioEdit*, e submetidas ao *BLASTn* para confirmação das sequências. O alinhamento foi utilizado para construir a árvore filogenética baseada na distância *Neighbor-Joining* (NJ), com o modelo evolutivo *kimura-2-parameters*, mediante o software *Mega 2.1*. A confiabilidade da árvore NJ foi avaliada com 1.000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* acima de 50% são mostrados acima dos nós, e a escala representa o número de substituição de nucleotídeos pelo número total no alinhamento. As identidades entre as sequências alinhadas foram calculadas, e a análise filogenética foi realizada com o software *BioEdit*. Amostras do *GenBank* e os isolados estudados, no presente trabalho, são identificados pelo número de acesso / registro, espécie animal, Estado / município e ano.

A identidade de nucleotídeos *intra* e *interclusters* dos isolados e amostras do *GenBank*, presentes na segunda árvore filogenética (Figura 10), está resumida na Tabela 9.

**Tabela 9.** Matriz de identidade dos isolados e amostras do *GenBank* dos *clusters* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, presentes na segunda árvore filogenética. As células em rosa representam as médias de identidade dos isolados *intraclusters* e, os cruzamentos entre linhas e colunas representam as médias de identidade *interclusters*

<i>Clusters</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,9977	0,9885	0,9861	0,9733	0,9682	0,9711	0,9746	0,8393
2	0,9885	0,9939	0,9834	0,9718	0,9673	0,9691	0,9715	0,8376
3	0,9861	0,9834	0,9920	0,9754	0,9727	0,9744	0,9780	0,8398
4	0,9733	0,9718	0,9754	0,9940	0,9717	0,9740	0,9716	0,8400
5	0,9682	0,9673	0,9727	0,9717	0,9939	0,9678	0,9730	0,8381
6	0,9711	0,9691	0,9744	0,9740	0,9678	1,0000	0,9754	0,8410
7	0,9746	0,9715	0,9780	0,9716	0,9730	0,9754	0,9972	0,8453
8	0,8393	0,8376	0,8398	0,8400	0,8381	0,8410	0,8453	0,9960

No presente trabalho, os isolados do vírus rábico sequenciados, foram submetidos ao *GenBank* (Bethesda, Maryland, USA). O *GenBank* concedeu os números de acesso para as sequências nucleotídicas, os quais se encontram publicados nesta base de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html>).

A Tabela 10 mostra os números de acesso do *GenBank* para o sequenciamento nucleotídico dos 32 isolados do vírus rábico, provenientes de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre 2002 e 2006 – *GenBank accession* HM585149-HM585180.

**Tabela 10.** Números de acesso do *GenBank* para os isolados do vírus rábico de herbívoros domésticos do Estado do Rio de Janeiro, entre 2002 e 2006 (*GenBank accession* HM585149-HM585180)

Nº	Isolado (Registro)	<i>GenBank</i> (Nº de Acesso)
1	065/03	HM585149
2	109/04	HM585150
3	0154/03	HM585151
4	195/06	HM585152
5	229/04	HM585153
6	243/04	HM585154
7	252/04	HM585155
8	0257/04	HM585156
9	260/04	HM585157
10	262/04	HM585158
11	0287/01	HM585159
12	0319/02	HM585160
13	0337/06	HM585161

**Tabela 10.** Continuação

<b>Nº</b>	<b>Isolado (Registro)</b>	<b>GenBank (Nº de Acesso)</b>
14	0358/06	HM585162
15	422/06	HM585163
16	0423/06	HM585164
17	0424/06	HM585165
18	0426/06	HM585166
19	0437/06	HM585167
20	0451/06	HM585168
21	452/06	HM585169
22	0469/01	HM585170
23	0658/02	HM585171
24	0697/02	HM585172
25	0726/02	HM585173
26	0768/02	HM585174
27	0771/02	HM585175
28	0963/02	HM585176
29	05070/02	HM585177
30	004/04	HM585178
31	002/03	HM585179
32	064/03	HM585180

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Imunofluorescência direta e isolamento viral

O diagnóstico laboratorial da raiva é realizado seguindo as recomendações da OMS (WHO, 1992), por meio da imunofluorescência direta (DEAN et al., 1996) e do isolamento viral em camundongo (KOPROWSKI, 1996) e/ou em cultura de células de neuroblastoma murino N2A (KING, 1996).

Na suspeita de infecção pelo vírus rábico, deve-se considerar a gravidade da doença, que leva à letalidade de aproximadamente 100%. Logo, deve-se buscar reduzir ao máximo a possibilidade de resultados falso-negativos e, para tanto, deve-se usar as duas técnicas diagnósticas tradicionais, a Imunofluorescência direta e o isolamento viral (ALBAS et al., 1999; SILVA et al., 1973; BEAUREGARD et al., 1965).

O fundamento da técnica de imunofluorescência direta (DIF) é baseado em uma prova imunológica para detectar a reação antígeno-anticorpo, em que um conjugado antirrábico específico é utilizado, e esse conjugado nada mais é que o anticorpo antirrábico unido a uma substância fluorescente, o isotiocianato de fluoresceína, que funciona como sistema revelador da reação. A DIF vem sendo realizada de acordo com o método adaptado por Dean et al. (1996).

O isolamento viral em camundongo (MIT) é baseado no aparecimento da doença e morte nos animais, experimentalmente infectados com amostras do vírus rábico. O MIT consiste em um teste de inoculação via intracerebral (IC) do material suspeito (0,03 mL da amostra preparada em suspensão) em camundongos. Os camundongos albinos suíços desmamados, com 21 dias de idade e peso entre 11 e 14 g, são os preferidos. O MIT vem sendo realizado, após a DIF, de acordo com o método preconizado por Koprowski (1996).

O MIT tem sido o procedimento complementar recomendado desde os primórdios do diagnóstico de raiva. Devido ao período de observação (até 30 dias) necessário para o MIT, o custo crescente desse teste e a necessidade de substituir o

uso de animais em laboratório, técnicas alternativas vêm sendo solicitadas. Recentes desenvolvimentos em técnicas de isolamento viral e cultura celular, levaram a examinar tais técnicas na tentativa de produzir um teste que possa substituir bem o MIT (WEBSTER, 1986).

O isolamento viral *in vitro* em cultura de células é baseado no efeito da replicação viral, o efeito citopático (CPE), nas células infectadas com amostras do vírus rábico. O CPE causado pelo vírus rábico *in vitro* não é de fácil detecção na maioria das linhagens celulares comumente utilizadas. Entretanto, em cultura de células de neuroblasoma murino (N2A), vem sendo realizado em adição ou em substituição ao MIT, de acordo com o método adaptado por King (1996). A linhagem celular de neuroblastoma murino foi estabelecida por Klebe e Ruddle (1969), a partir de um tumor espontâneo da linhagem “A” de camundongos albinos “C-1300” (DUNHAM e STEWART, 1953). A maior vantagem de se trabalhar com essa linhagem celular, para testes de isolamento viral, está na morfologia e fisiologia semelhantes às células nervosas, e ainda na capacidade de divisão pela sua origem tumoral (KING, 1996; RUDD e TRIMARCHI, 1989; WEBSTER, 1986; SMITH et al., 1978; KLEBE e RUDDLE, 1969)

A maioria dos espécimes que são negativos pela DIF e positivos pelo MIT tem quantidades muito pequenas de antígenos viáveis presentes, e o tempo de incubação em camundongos é estendido a períodos de 12-20 dias (WEBSTER, 1986). Os espécimes que permanecem negativos para a raiva, pelo MIT, não podem ser definidos até a conclusão do período de 30 dias do teste. O MIT tem sido considerado, no mínimo, tão sensível quanto a DIF, para a demonstração de antígenos do vírus rábico, dependendo de fatores como: a quantidade de vírus presente, a condição do tecido suspeito, a qualidade de reagentes e a especialização do pessoal de laboratório. A maioria dos estudos comparativos foram feitos, através da DIF, com espécimes negativos que, posteriormente, foram inoculados em camundongos (WHO, 2004; KING e TURNER, 1993; RUDD e TRIMARCHI, 1989; WEBSTER, 1986).

Rudd e Trimarchi (1989) estudaram diversos aspectos do isolamento de vírus de “rua”, em amostras de cérebro de animais domésticos com neuroblastoma murino C-1300, e constataram reais possibilidades do teste da infecção de cultura de

tecido à raiva (*rabies tissue culture infection test* – RTCIT), como alternativa ao MIT. A infecção nas células N2A pode ser demonstrada logo em 24 horas, quando o inóculo contém um teor elevado de vírus rábico. No entanto, tecidos que contêm pequenas quantidades de vírus, como seria esperado em espécimes falso-negativos na DIF, por vezes, não produzem infecção demonstrável até 3 a 4 dias pós-inoculação (p.i.). Após o exame das culturas replicadas e inoculadas com vírus rábico no período de pelo menos 4 dias p.i., determinou-se ser suficiente para diagnosticar a tal infecção (RUDD e TRIMARCHI, 1989; WEBSTER, 1986). Atualmente, a OMS considera a linhagem celular N2A tão eficaz no isolamento de vírus rábico de “rua” quanto o MIT, além de reduzir consideravelmente o tempo necessário para o diagnóstico da raiva (WHO, 2004).

O estudo de Rudd e Trimarchi (1989) relatou os resultados de 2 anos de triagem clínica com o RTCIT em paralelo com DIF e MIT, juntamente com a experiência de 30 meses de utilização do RTCIT, como o único procedimento complementar à DIF. O diagnóstico laboratorial não registrou resultados falso-negativos para DIF durante este período. Aos laboratórios que estão equipados para o trabalho de cultura de células, o RTCIT oferece uma alternativa rápida e sensível para o MIT. Perspectivas de melhorias futuras do RTCIT incluem etapas que reduzam o tempo necessário para um resultado final, sem a perda de sensibilidade da linhagem celular. Comparações preliminares com a linhagem celular N2A indicam que esta é a mais permissiva para crescimento viral (RUDD e TRIMARCHI, 1989).

Em 2000, pesquisadores brasileiros verificaram que a DIF, embora seja considerada a técnica “padrão ouro” para o diagnóstico da raiva, apresentava, em média, 20% de falso-negativos, quando realizada em amostras oriundas da espécie equina (PEIXOTO et al., 2000). Alguns aspectos do diagnóstico da raiva em equinos vêm sendo descritos, provavelmente, em razão das diferentes concentrações de vírus rábico nos diversos fragmentos do SNC. Mais recentemente, em 2006, os autores que estudaram peculiaridades da raiva em equinos relataram que as maiores concentrações de vírus foram identificadas na medula e no tronco encefálico, quando comparadas com as do córtex, do corno de Amon e do cerebelo. Da medula e do tronco encefálico são, portanto, colhidos os melhores fragmentos

para encaminhamento ao laboratório de diagnóstico quando há suspeita clínica de raiva equina (CARRIERI et al., 2006).

Na pesquisa realizada por Peixoto et al. (2000), em 111 amostras de SNC de equinos positivas para o vírus rábico, pelas técnicas diagnósticas tradicionais, evidenciou-se uma sensibilidade de 93,7% (104 positivas) no isolamento viral por MIT, enquanto, na DIF, a sensibilidade foi de 76,6% (85 positivas), verificando-se uma concordância de 70,2% entre essas técnicas para a espécie equina. Por outro lado, em 983 amostras de bovinos positivas para o vírus rábico, pelas técnicas diagnósticas tradicionais, evidenciou-se uma sensibilidade de 95,1% (935 positivas) no isolamento viral por MIT e, na DIF, a sensibilidade foi de 94,1% (925 positivas), verificando-se uma concordância de 89,4% entre essas técnicas para a espécie bovina. A análise dos resultados apresentados com a utilização da DIF revela que a sensibilidade foi menor para o diagnóstico da raiva equina (76,6%), quando comparada à raiva bovina (94,1%). A sensibilidade do MIT foi praticamente a mesma para as amostras de origem equina (93,7%) e bovina (95,1%), cuja diferença não foi significativa ( $Z\alpha = 0.619$  n.s.). Apesar da grande sensibilidade da DIF e sua recomendação pela OMS, pelos resultados obtidos, desde a década de 70, como a técnica de referência para o diagnóstico da raiva, está claro que, para os equinos, o diagnóstico deve sempre ser confirmado pelo isolamento do vírus por meio do MIT. Assim, demonstrou-se a necessidade do uso dessas duas técnicas como complementares obrigatórias (PEIXOTO, 2000).

No presente trabalho, os resultados obtidos revelam que a DIF foi capaz de evidenciar a presença do vírus rábico em 91,3% das amostras positivas, pelo diagnóstico tradicional. Visto que, das 81 amostras de SNC de diferentes espécies de herbívoros (6 de ovinos, 15 de equinos e 60 de bovinos) positivas para o vírus rábico, pelas técnicas diagnósticas tradicionais, em 74, foi possível confirmar a presença do vírus apenas com a DIF (91,3% de sensibilidade). Nas 7 amostras positivas restantes, somente foi possível confirmar a presença do vírus após o MIT (100% de sensibilidade). Das 7 amostras negativas pela DIF, 3 foram oriundas de equinos e 4 de bovinos. Portanto, os resultados mostram que o isolamento viral não deve ser dispensado, independentemente, da espécie animal de origem (herbívoro doméstico: equino, bovino, ovino), como prova complementar à imunofluorescência

direta, no diagnóstico de rotina da raiva rural. Ambas as técnicas diagnósticas tradicionais (imunofluorescência direta e isolamento viral) devem ser usadas, a fim de eliminar resultados falso-negativos pelo uso de uma única prova.

As técnicas de imunofluorescência direta e isolamento viral são as preconizadas pela OMS para a rotina do diagnóstico da raiva (WHO, 2004, 1992). No entanto, vários autores compararam os resultados da transcrição reversa, seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) com a DIF, em amostras já em decomposição. Os autores avaliaram, então, a queda da sensibilidade da DIF relacionada com o tempo de deterioração do tecido cerebral e evidenciaram a maior sensibilidade da RT-PCR (ARAÚJO et al., 2008; DAVID et al., 2002; HEATON et al., 1997; KAMOLVARIN et al., 1993).

## **7.2. Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase**

Sacramento et al. (1991) desenvolveram o primeiro protocolo de RT-PCR, para o vírus rábico. A partir daí, a evolução desta técnica tem sido marcante, além de representar um grande avanço no diagnóstico e na tipificação de amostras de *Lyssavirus*. Mais do que uma ferramenta de diagnóstico sensível e específica, a RT-PCR não exige isolamento viral e permite a caracterização genética do vírus, a qual é de grande importância para estudos epidemiológicos da raiva humana e/ou animal (SACRAMENTO, 1991).

Além disso, informações derivadas da RT-PCR podem identificar a origem do vírus, mesmo quando não há histórico de mordida conhecido, e direcionar as ações a serem tomadas nas fases de controle e vigilância da raiva, a fim de evitar a propagação viral. Logo, a utilização da RT-PCR permite a detecção específica e a caracterização dos vírus que causam surtos, linhagens ou variantes virais conhecidas e, até mesmo, novos genótipos ou variantes do vírus rábico. Isso porque que os ciclos epidemiológicos do vírus rábico são simultâneos no Brasil (ITO et al., 2001a, 2001b).

Kamolvarin et al. (1993) relataram algumas vantagens do uso da técnica de RT-PCR, para a detecção do genoma do vírus rábico, quando comparada às técnicas tradicionais, DIF e MIT. O seu uso em espécimes deteriorados e a sua rapidez em relação ao MIT que requer de 21 a 30 dias para um resultado conclusivo, constituem atrativos para o diagnóstico molecular (KAMOLVARIN et al., 1993). O diagnóstico molecular pela técnica de RT-PCR tem a sensibilidade mais alta, entretanto, requer padronização e controle de qualidade muito estrito para evitar falsos resultados (MACEDO et al., 2006; CREPIN et al., 1998).

O gene N tem sido escolhido, porque é o mais conservado do vírus rábico e a análise deste gene é a abordagem mais adequada para o diagnóstico molecular da raiva. Contudo, para evitar resultados falso-positivos, precauções devem ser adotadas ao realizar a RT-PCR (MACEDO et al., 2006; SMITH, 2002; WUNNER, 2002; KWOK e HIGUCHI, 1989). Para o diagnóstico laboratorial da raiva em amostras deterioradas, por meio da RT-PCR, não devem ser utilizados *primers* que resultem na amplificação de fragmentos amplos do DNA viral. No entanto, quando o intuito da pesquisa for o uso da RT-PCR, para o sequenciamento e a análise filogenética de isolados do vírus rábico, deve-se, preferencialmente, utilizar *primers* que amplifiquem fragmentos amplos do DNA viral (ARAÚJO et al., 2008; KIMURA et al., 2006).

Alguns laboratórios amplificam a porção inicial do gene da nucleoproteína (N) do vírus rábico, enquanto outros amplificam a porção terminal desse mesmo gene. Dessa forma, impossibilita-se o alinhamento das sequências para que se possa comparar isolados virais. Fato que ocorreu, quando se tentou alinhar as sequências oriundas de isolados de *Desmodus rotundus* do Pará (DA ROSA et al., 2006) com isolados de bovinos do Rio de Janeiro (KIMURA et al., 2006).

No estudo de Ito et al. (2001a), foi evidenciado que a RT-PCR, para ser adequadamente utilizada, seja para o diagnóstico de rotina em amostras deterioradas ou seja para o estudo filogenético em pesquisa científica, deve ser avaliada em seu objetivos, utilizando-se *primers* adequados a cada situação, evitando falsos resultados (ITO et al., 2001a).

Na pesquisa realizada por Soares et al. (2002), a RT-PCR comprovou ser capaz de amplificar a sequência gênica em amostras de tecido cerebral positivas para o vírus rábico, porém, expostas até 96 horas à TA (SOARES et al., 2002).

Considerados como métodos “padrão ouro” para o diagnóstico da raiva, a DIF (DEAN et al., 1996) e o MIT (KOPROWSKI, 1996) são demorados e apresentam variáveis especificidade e sensibilidade. Além disso, o MIT requer o uso de animais de experimentação. Neste contexto, a utilização da RT-PCR para detecção de vírus rábico foi proposta na pesquisa realizada por Bordignon et al. (2004), a qual provou ser uma técnica adequada para o diagnóstico da raiva, corroborada por várias outras pesquisas (DAVID et al., 2002; HEATON et al., 1997; KAMOLVARIN et al., 1993). Estudando 60 amostras anteriormente diagnosticadas por DIF e MIT como positivas para o vírus rábico, Heaton et al. (1997) observaram uma concordância de 93% da RT-PCR com essas técnicas de diagnóstico tradicionais (BORDIGNON et al., 2004; HEATON et al., 1997).

Tendo em conta a importância socioeconômica da infecção pelo vírus rábico em seres humanos e animais, o objetivo do estudo de Bordignon et al. (2004) foi padronizar um protocolo de RT-PCR para detecção do vírus, considerando a conservação do gene N, e avaliar comparativamente a técnica com DIF / MIT e isolamento viral em cultura de células. Os autores utilizaram um total de 75 amostras obtidas a partir de uma variedade de espécies animais no Estado de Santa Catarina (SC), e a RT-PCR revelou-se tão sensível quanto DIF e MIT, e bem menos demorada do que o MIT. O sequenciamento direto da porção 5' inicial do gene N permitiu o agrupamento destes isolados com amostras provenientes do ciclo da raiva rural, pela análise comparativa de sequências, caracterizando-as como vírus relacionados ao morcego vampiro.

Dantas Junior et al. (2004) desenvolveram um protocolo de RT-PCR para o gene N do vírus rábico, com o objetivo de utilizar essa metodologia em laboratórios onde são realizadas pesquisas para a detecção do vírus rábico. Os autores utilizaram 50 amostras de tecido encefálico de diferentes animais (44 bovinos, 5 equinos e 1 quiróptero), provenientes do Estado do Rio de Janeiro, positivos por DIF e/ou MIT, para o vírus rábico. As amostras foram analisadas por RT-PCR, de acordo com o protocolo descrito por Heaton et al. (1997), com algumas

modificações, utilizando um *cocktail* com 10 µM dos seguintes *primers*: JW12, JW6 (nt 660-641) (5'-CAATTCGCACACATTTTGTG-3' / 5'-CAGTTAGCGACATCTTATG-3' / 5'-CAG TTGGCACACATCTTGTG-3')<sup>2</sup>, correspondentes ao sequenciamento de *Duvenhage virus*, *European bat lyssavirus 1 e 2*, e *Mokola virus*, respectivamente (DANTAS JUNIOR et al., 2004; HEATON et al., 1997). Usando essa metodologia, os autores detectaram o vírus rábico em 100% de suas amostras e demonstraram ser este protocolo de RT-PCR sensível, específico, rápido e extremamente valioso, podendo ser utilizado como rotina em laboratórios que trabalham no diagnóstico de vírus rábico (DANTAS JUNIOR et al., 2004).

O diagnóstico molecular tem sido adotado para detectar ácido nucleico viral em espécimes *antemortem* ou *postmortem*, e a RT-PCR tem sido usada, nesses espécimes, com sucesso para detectar o ácido nucleico do vírus rábico. O RNA do vírus rábico pode ser detectado em vários fluidos biológicos e amostras (por exemplo: saliva, fluido cérebro-espinhal, lágrima, urina, biópsia de pele e amostras de cérebro) (MACEDO et al., 2006; WUNNER, 2002).

No estudo de Macedo et al. (2006), a RT-PCR foi realizada com *primers* voltados para a porção 3' terminal do gene N. Um protocolo de RT-PCR foi desenvolvido e aplicado para detectar um fragmento do nucleotídeo 249 do gene N, com o *primer* 504 senso (5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3') e o *primer* 304 antissenso (5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3') direcionados à região correspondente ao gene N, conforme descrito por Orciari et al., 2001 (MACEDO et al., 2006; ORCIARI et al., 2001). Usando esse método, os autores puderam detectar ácido nucleico viral em 70% das suas amostras, incluindo amostras obtidas durante exame *antemortem*. A adição de uma segunda amplificação, com os mesmos *primers* para a PCR, permitiu aumentar a concentração do DNA amplificado para garantir o sucesso do sequenciamento, constituindo uma nova abordagem para o diagnóstico da raiva. Os resultados da RT-PCR foram confirmados por sequenciamento e análise filogenética, em paralelo com DIF e MIT (MACEDO et al., 2006).

Araújo et al. (2008) avaliaram as técnicas moleculares de RT-PCR e *heminested* RT-PCR (hnRT-PCR), para detecção do vírus rábico em 151 amostras de cérebro, provenientes de diferentes espécies animais (herbívoros), suspeitos de

raiva, previamente diagnosticadas por DIF e MIT, conservadas a -20°C e descongeladas à TA por 72 horas para decomposição. Os autores aplicaram um protocolo de RT-PCR e hnRT-PCR, de acordo com Soares et al. (2002), utilizando os *primers* 510 senso (5'-ATAGAGCAGATTTTCGAGACAGC-3'), 784 antissenso (5'-CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA-3') e 942 antissenso (5'-CCCATATAACATCCAACA AAGTG-3'), projetados para amplificar segmentos localizados no meio do gene N. Os resultados de RT-PCR e hnRT-PCR foram comparados com resultados anteriores de DIF e MIT. Das 151 amostras analisadas, 50 amostras frescas foram anteriormente positivas, por DIF e MIT, provenientes de 18 equinos e 32 bovinos, dessas, 26 (52% de sensibilidade) foram positivas pela RT-PCR e 45 (90% de sensibilidade) pela hnRT-PCR. Tendo em conta as amostras descongeladas, de 48 amostras decompostas positivas, 17 (34,3% de sensibilidade) foram positivas pela RT-PCR, e 36 (75% de sensibilidade) pela hnRT-PCR. Todas as amostras anteriormente negativas (101 amostras), por DIF e MIT, foram negativas também por RT-PCR e hnRT-PCR (100% de especificidade). Não foram encontrados resultados falso-positivos nas amostras negativas pelas técnicas tradicionais, quando avaliadas pelas técnicas moleculares (ARAÚJO et al., 2008).

Os resultados obtidos por Araújo et al. (2008), evidenciaram que a hnRT-PCR foi mais sensível do que a RT-PCR, e ambas as técnicas apresentaram menor sensibilidade em amostras decompostas. A sensibilidade da RT-PCR em amostras descongeladas foi de 52%, enquanto, com a associação de hnRT-PCR, foi de 90%. Esses resultados corroboram estudos anteriores com a técnica *nested* para o diagnóstico da raiva. Kamolvarin et al. (1993) encontraram 38% de sensibilidade para RT-PCR e 100% ao considerar a etapa *nested*. A eficácia demonstrada pela hnRT-PCR, na detecção de vírus rábico em materiais decompostos e conservados (a -20°C), sugere a sua aplicação em estudos epidemiológicos retrospectivos da raiva (CARNIELI Jr. et al., 2009, ARAÚJO et al., 2008; KAMOLVARIN et al., 1993).

No presente trabalho, 81 amostras de SNC, provenientes de diferentes espécies de herbívoros, previamente diagnosticadas por DIF e MIT, positivas para a raiva e conservadas a -20°C, foram submetidas à RT-PCR para a amplificação de um segmento do gene codificador da nucleoproteína (N) do vírus. Para a reação de RT e para a PCR, foram utilizados os *primers* 21G senso (5'-ATGTAACACCTCTA

CAATG-3') na posição 55-73 do gene N e 304 antissenso (5'-TTGACGAAGATCTTG CTCAT-3') na posição 1.514-1.533 do gene N, conforme protocolo descrito por Orciari et al. (2001). Os isolados que apresentaram resultados negativos na PCR, utilizando os *primers* 21G e 304, foram submetidos à nova PCR com a substituição do *primer* 21G pelo *primer* 504 senso (5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGT CCACT-3') na posição 1.286-1.317 do gene N, com capacidade de amplificar segmento menor do gene N.

Todas as amostras positivas para o vírus rábico pelas técnicas laboratoriais tradicionais (DIF e MIT), foram avaliadas pela técnica de RT-PCR, com os *primers* 21G e 304, resultando em um fragmento de 1.478-pb. Das 81 amostras positivas pelas técnicas tradicionais, 16 apresentaram resultados negativos pela RT-PCR com os *primers* 21G e 304. Logo, demonstrou-se que houve 80,2% de concordância entre as técnicas tradicionais, e a técnica de RT-PCR utilizando os *primers* 21G e 304. Os 16 isolados negativos pela RT-PCR, com os *primers* 21G e 304, foram novamente avaliados com os *primers* 504 e 304, resultando em um fragmento de 249-pb. Com o uso desse novo par de *primers*, 14 dos 16 isolados apresentaram-se positivos para presença do vírus rábico. Logo, a técnica de RT-PCR, utilizando-se os *primers* 504 e 304, apresentou 93,7% de concordância com a mesma técnica, utilizando-se os *primers* 21G e 304.

Os resultados da RT-PCR, no presente trabalho, estão em acordo com os de pesquisas realizadas por Ito et al. (2001a), Soares et al. (2002); Bordignon et al. (2004), Dantas Junior et al. (2004), Da Rosa et al. (2006), Kimura et al. (2006), Macedo et al. (2006), Araújo et al. (2008) e Carnieli Jr. et al. (2009).

### **7.3. Sequenciamento e análise filogenética**

Na biologia molecular, os avanços registrados possibilitaram, no ano de 1981, relatar a primeira sequência dos genes do vírus rábico e estabelecer as bases para a classificação definitiva do vírus, mediante a análise antigênica comparativa (WUNNER et al., 1988). Do mesmo modo, foi possível identificar a estrutura

molecular e codificar o genoma viral, estabelecendo a correlação entre as sequências do ácido nucleico primário, os aminoácidos e, as propriedades biológicas e imunológicas do vírus rábico (NATARAJAN et al., 1992; WUNNER et al., 1988).

Também foi possível, utilizando os recursos da biologia molecular, determinar a extensão total do nucleotídeo dos genes estruturais, nucleoproteína (N), fosfoproteína (P ou NS), matriz proteica (M) e glicoproteína (G), e, em parte, da transcriptase (L), bem como: descrever suas estruturas e funções; mapear e definir os sítios antigênicos; reconhecer as exigências estruturais necessárias para a atividade imunogênica; constatar as diferenças de qualidade entre antígeno solúvel e a glicoproteína inteira; identificar as regiões imunogênicas essenciais para a indução de anticorpos neutralizantes; e comprovar que fragmentos de peptídeos podem ser utilizados como determinantes antigênicos para linfócitos B e T (FU et al., 1991; GERMANO et al., 1988; WUNNER et al., 1988; BOURHY et al., 1990).

Dessa forma, as pesquisas efetuadas, com base na biologia molecular, têm sido de relevante importância não só para complementar os conhecimentos sobre a patogênese da infecção rábica e a imunologia, como também para determinar a variabilidade genética do vírus rábico, inclusive entre cepas e isolados, e, para o esclarecimento dos mecanismos de replicação e transmissão viral (GERMANO et al., 1994; WUNNER et al., 1988).

A análise filogenética e geográfica do sequenciamento parcial da nucleoproteína (gene N), de isolados do vírus rábico, vem sendo realizada a partir de espécimes de herbívoros domésticos e morcegos hematófagos, provenientes de diferentes regiões do Brasil, nas quais a raiva rural é enzoótica (CARNIELI Jr. et al., 2009; MATTA, 2009; BARBOSA et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2008, 2006; VIEIRA, 2007; KIMURA, 2006).

A sequência de bases do DNA pôde ser decifrada no final da década de 1970, quando dois grupos de pesquisadores, um liderado por Sanger e outro por Gilbert, desenvolveram diferentes estratégias de sequenciamento (SANGER et al., 1977; MAXAM e GILBERT, 1977). Na década de 1990, esta técnica pôde ser automatizada, permitindo a leitura de milhares de bases por dia, o que possibilitou o sequenciamento completo de diversos organismos; em dezenas de projetos genoma; em todo o mundo. Nasce, a partir daí, uma nova ciência denominada

“Genômica” e junto com ela a “Bioinformática”, com diversos *softwares* para análise de sequências e bancos de dados de genes, em que sequências de DNA são depositadas e disponibilizadas aos cientistas na "Internet" (ALTSCHUL et al., 1990).

No presente trabalho, o fragmento de DNA amplificado foi purificado, visualmente quantificado e sequenciado; usando-se o *kit* de sequenciamento *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle*, com os *primers* senso e antissenso. As reações foram resolvidas em um sequenciador automático *ABI-3100 (Applied Biosystems<sup>™</sup>)*. Para cada isolado viral, foram produzidas duas sequências, uma senso e outra antissenso, no sequenciador automático. O resultado foi apresentado em formato de cromatograma.

Foram sequenciados 49 isolados do vírus da raiva dos herbívoros do Estado do Rio de Janeiro, mas somente 32 que apresentaram sequências viáveis foram analisados filogeneticamente. Uma sequência total de 1.478 nucleótidos do genoma do vírus rábico, localizada entre os nucleotídeos 55 e 1.533, foi analisada, utilizando-se o vírus fixo PV (número de acesso no *GenBank* M132151), como referência. A sequência completa foi obtida a partir das sequências senso e antissenso, produzidas para cada um dos isolados do vírus rábico do presente trabalho, por meio da função CAP (*Contig Assembly Program*) do *software BioEdit* versão 7.0.0 (HALL, 1999). Utilizando o *BioEdit* para a edição, a sequência final de 1.301 nucleótidos, situada entre os nucleótidos 110 e 1.410 na região do gene N, foi obtida e as identidades de nucleotídeos foram calculadas para análise filogenética.

As extremidades das sequências foram eliminadas de forma que todas ficassem do mesmo tamanho, o que resultou nas sequências homólogas de 1.301 nucleotídeos. Entre os nucleotídeos 101 e 1.460, encontra-se o menor fragmento alinhado com a sequência completa do PV e com o 11<sup>o</sup> aminoácido desse, incluindo o códon de parada do gene N, porém, sem alcançar a cauda poli (A), na 3' terminal. Foram excluídas as regiões onde o cromatograma, produzido no sequenciador automático, não apresentou boa definição do sequenciamento. A sequência final de cada isolado do vírus rábico foi alinhada com sequências homólogas obtidas no *GenBank*, utilizando-se o método *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) e foi submetida ao *BLASTn* para confirmar a homologia (ALTSCHUL et al., 1990).

O alinhamento permitiu construir a árvore filogenética de distância, baseada no método algorítmico *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU e NEI, 1987). Essa distância evolucionária foi computada, utilizando-se o modelo evolutivo *Kimura-2-parameter* (KIMURA, 1980), por meio do *software Mega 2.1* (KUMAR et al., 2001). *Bootstrap* com 1.000 repetições (FELSENSTEIN, 1985) oferece apoio estatístico e confiabilidade, definindo os relacionamentos entre as sequências na árvore NJ. Duas árvores filogenéticas foram construídas, sendo uma árvore realizada somente com os isolados estudados e a outra árvore realizada com os isolados comparados com amostras do *GenBank*. Nessas duas árvores filogenéticas, evidencia-se a formação de *clusters* e *subclusters*, de acordo com as áreas geográficas de origem, havendo influência da presença de montanhas.

Sabe-se que a incidência da raiva em herbívoros possui intrínseca ligação com a ocorrência de raiva em populações de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (GOMES et al., 2005; LORD, 1992), além de fatores relacionados a sua distribuição geográfica e sua ecologia (BARBOSA et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2006). Vale ressaltar que, um dos fatores que afeta a distribuição geográfica dos morcegos *D. rotundus* é a oferta de sangue relacionada à distribuição de animais de produção, principalmente os bovinos (GOMES, 2005; ARELLANO-SOTA, 1988).

O ciclo epidemiológico de transmissão da raiva relacionado aos morcegos hematófagos tem sido, geneticamente, caracterizado como variante espécie-específica (ITO et al., 2001b). As linhagens do vírus rábico transmitidas por *D. rotundus* têm sido identificadas de acordo com as variações geográficas e a ecologia dos morcegos dessa espécie (CARNIELI Jr. et al., 2009; MATTA, 2009; BARBOSA et al., 2008; VIEIRA, 2007; KOBAYASHI et al., 2006).

Há, na atualidade, conhecimento de que a raiva dos herbívoros possui influência geográfica que pode ser evidenciada, tanto em trabalhos com objetivos epidemiológicos (BARBOSA et al., 2007; GOMES et al., 2005, 2002; TADEI, 1991), quanto em trabalhos de interesse filogenético (CARNIELI Jr. et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2008, 2006). No entanto, em trabalhos que avaliaram isolados virais de diferentes ciclos epidemiológicos, pôde-se observar que a formação dos *clusters* possui comportamento diferente do que quando se trata de raiva relacionada ao morcego hematófago *D. rotundus*, espécie mais próxima entre si do

que entre outras de morcegos, e com o ciclo terrestre estabelecido (SATO et al., 2006; ITO et al., 2001b; NADIN-DAVIS et al., 2001).

Os dados do presente trabalho, corroboram dados evidenciados em duas importantes pesquisas realizada por Kobayashi et al. (2006, 2008).

Na pesquisa realizada por Kobayashi et al. (2006), sobre distribuição geográfica da raiva bovina relacionada ao morcego vampiro no Brasil, demonstrou-se uma acentuada diferença entre isolados de regiões de planícies em relação a isolados de regiões de altas altitudes. Os *subclusters* formados por isolados de regiões montanhosas correlacionaram-se com as altitudes das regiões de origem dos isolados. Tal pesquisa foi muito importante por indicar que a raiva dos herbívoros tem origem a partir de *clusters* distintos e geograficamente bem definidos. Isso porque os *D. rotundus* vivem em colônias com pequeno alcance de migração (KOBAYASHI et al., 2006).

Na pesquisa realizada por Kobayashi et al. (2008), sobre análises moleculares e geográficas da raiva bovina transmitida pelo morcego vampiro no Brasil, realizou-se uma análise filogenética e geográfica de 593 isolados positivos para o vírus rábico de herbívoros e morcegos hematófagos *D. rotundus*, entre os anos de 1987 a 2006, provenientes da região Central do Brasil. Nessa pesquisa, constatou-se que tais isolados representaram 24 linhagens virais. Realizando-se a análise dessas linhagens, verificou-se que ocorreram agrupamentos com a distribuição de várias linhagens delimitadas por regiões montanhosas, as quais serviram como barreira geográfica. Pôde-se constatar também que os isolados analisados foram provenientes de áreas adjacentes e ligadas por rios. Os resultados demonstraram ainda que a distribuição geográfica dos isolados de bovinos e morcegos hematófagos os relacionou a *clusters* genéticos idênticos. Os autores também investigaram a presença de amostras com 100% de similaridade genética em áreas adjacentes aos *clusters* formados (KOBAYASHI et al., 2008).

No presente trabalho, verificaram-se a identidade de nucleotídeos e a distância entre os locais de origem dos isolados, sugerindo os deslocamentos possíveis entre surtos da raiva dos herbívoros no Estado do Rio de Janeiro. Analisando-se a primeira árvore filogenética, construída com os 32 isolados no presente trabalho (Figura 8), referenciada no Mapa que divide o Estado do Rio de

Janeiro em regiões (Figura 9), onde os *clusters* se formam de acordo com cada região geográfica de origem, verifica-se como ocorreu essa a formação. Foram formados 4 *clusters* principais com 9 *subclusters* e um isolado da região Metropolitana do Rio de Janeiro. A formação dos *clusters* e *subclusters*, nessa primeira árvore filogenética, é discutida a seguir.

Constata-se o agrupamento de acordo com a região geográfica de origem. *Cluster* 1 com o *subcluster*: 1.1, reunindo isolados da região Serrana; e com o *subcluster* 1.2, reunindo isolados da região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Depois, os *clusters* 2 (*subclusters* 2.1, 2.2 e 2.3) e 3 (*subclusters* 3.1 e 3.2), reunindo isolados da região Sul do Estado do Rio de Janeiro. O *cluster* 2 apresentando também 1 isolado da região Metropolitana, no *subcluster* 2.3. O *cluster* 3 apresentando também 1 isolado da região Serrana, fora de *subcluster*. O único isolado (0963-02 equino) do município do Rio de Janeiro, na região Metropolitana do Estado, foi segregado entre os *clusters* 2 e 3. Por último, o *cluster* 4 com o *subcluster* 4.1, reunindo isolados provenientes da região Serrana; e com o *subcluster* 4.2, reunindo isolados provenientes da região Norte do Estado do Rio de Janeiro. O vírus fixo PV (M13215) está presente na árvore filogenética, como referência.

No *cluster* 1, análises detalhadas, nos *subclusters* 1.1 e 1.2, constata-se identidades de 100% de similaridades quanto aos nucleotídeos nos isolados de municípios com até 100 km de distância entre si e de anos diferentes. No *subcluster* 1.1, foram reunidos 7 isolados de herbívoros dos municípios de Teresópolis, Petrópolis, Cantagalo e Sapucaia, pertencentes à região Serrana do Estado do Rio de Janeiro. Os valores de identidade de nucleotídeos entre os isolados desse *subcluster* variaram de 99,5 a 100%. Dentre esses isolados, 5 apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos, 3 foram isolados de bovinos de Teresópolis de 2003, 1 de bovino de Cantagalo de 2002, e 1 de bovino de Petrópolis de 2004. Sabe-se que, entre Teresópolis e Cantagalo, a distância é de 76 km; entre Cantagalo e Petrópolis a distância é de 100 km; e, entre Teresópolis e Petrópolis, a distância é de 25 Km.

Vale ressaltar que, na identidade de nucleotídeos de 100% que foi apresentada por 5 isolados do *subcluster* 1.1, 3 isolados foram da mesma espécie

animal, da mesma localidade e do mesmo ano. Isolados esses, de bovinos provenientes de Teresópolis do ano de 2003. Provavelmente, esses 3 isolados de Teresópolis (de 2003) foram provenientes de um único surto de raiva. No entanto, no mesmo *subcluster* (1.1), também se reuniram e mostraram 100% de identidade isolados de 1 bovino de Cantagalo de 2002 e de 1 bovino de Petrópolis de 2004. Sabendo-se a distância entre esses dois municípios, pode-se sugerir, então, que ocorreu um deslocamento de 76 km do surto de raiva, iniciado em 2002, em Cantagalo, e terminado em 2003, em Teresópolis. No município de Teresópolis, esse surto deslocou-se 25 km até 2004, para Petrópolis. Portanto, houve um deslocamento médio de 50,5 km de distância do vírus rábico de 2002 a 2004, nesse *subcluster*, entre esses isolados com 100% de identidade de nucleotídeos.

Da mesma forma, no *subcluster* 1.2, foram reunidos 2 isolados de bovinos de Itaboraí, de 2006, que apresentaram 99,9% de identidade de nucleotídeos. Esses dois últimos isolados do *cluster* 1, os únicos do *subcluster* 1.2, apresentaram 99,6 % de identidade com 1 isolado de bovino de Sapucaia do ano de 2002, o último reunido no *subcluster* 1.1. Sabe-se que, entre os municípios de Sapucaia e Itaboraí, a distância é de 84 km. Fora de *subcluster*, foram reunidos 2 isolados de bovinos, de Petrópolis de 2004 e de Sumidouro de 2002, que apresentaram 99,5% de identidade de nucleotídeos.

Nos *clusters* 2 (*subclusters* 2.1, 2.2 e 2.3) e 3 (*subclusters* 3.1 e 3.2), os dados apresentados na árvore filogenética, construída com os isolados estudados, estão em concordância com os da pesquisa realizada por Kobayashi et al., em 2008. Visto que, também foram formados agrupamentos com similaridades e pertencentes a municípios adjacentes ou aos da mesma região do Estado, porém, com distâncias entre si de até 130 km (KOBAYASHI et al., 2008).

No *cluster* 2, *subcluster* 2.1, foram reunidos 1 isolado de bovino de Rio das Flores, de 2001, e 1 isolado de ovino de Vassouras, de 2002 (ambos na região Sul do Estado), que apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos, o que sugere ter havido um deslocamento de 28 km, de 2001 para 2002, ou seja, de Rio das Flores para Vassouras. No *subcluster* 2.2, foram reunidos 1 isolado de bovino de Itatiaia, de 2001, e 1 isolado de bovino de Resende, de 2002 (ambos na região Sul do Estado), que apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos, o que sugere

ter havido um deslocamento médio de 16 km do vírus rábico, de 2001 para 2002 nesse *subcluster*.

No entanto, no *cluster 2*, verifica-se ainda que, no *subcluster 2.3*, houve 100% de identidade de nucleotídeos entre as amostras, um isolado de bovino, proveniente de Rio Claro (na região Sul do Estado), de 2006, e um isolado de bovino, proveniente de Itaboraí (na região Metropolitana do Estado), também de 2006. Sabe-se que a distância entre esses dois municípios é de 130 km. Dessa forma, não haveria possibilidade do surto de raiva ter se deslocado da região Sul do Estado do Rio de Janeiro, para uma localidade distante 130 km, no mesmo ano, onde há a presença de montanhas que representam barreiras geográficas entre as duas localidades. Logo, pode-se concluir que parece “impossível” ter ocorrido deslocamento do vírus nesse caso. Portanto, deve-se considerar a hipótese de que esse dado possa estar relacionado ao deslocamento de animais de uma região para outra, por meio de compra e venda, ou seja, o animal de Itaboraí ter sido comprado em Rio Claro, já tendo saído, do município de origem, infectado pelo vírus rábico e desenvolvido os sintomas que o levou ao óbito na nova localidade (Itaboraí). Os demais isolados do *subcluster 2.3*, são de 2 bovinos provenientes de Rio Claro, de 2004, e de Barra Mansa, de 2006 (ambos da região Sul do Estado). Sabe-se que a distância entre esses dois municípios é de 20 km, facilitando o deslocamento do vírus e justificando a identidade de nucleotídeos, de 99,9% entre esses dois isolados.

De outra forma, o isolado de equino, de 2002, único proveniente do município do Rio de Janeiro, na região Metropolitana do Estado, quando apresentado na árvore filogenética com os *clusters* formados, no presente trabalho, não evidenciou grande proximidade com nenhum dos *clusters*. Portanto, esse isolado foi segregado fora de *cluster*, entre os *cluster 2* e *3*, na primeira árvore filogenética (Figura 8), construída somente com os isolados estudados.

No *cluster 3*, *subcluster 3.1*, foram reunidos 1 isolado de bovino de Valença, de 2002, e 1 isolado de bovino de Barra Mansa, de 2004 (ambos na região Sul do Estado), que apresentaram 99,8% de identidade de nucleotídeos. No *subcluster 3.2*, foram reunidos 2 isolado de bovino de Resende, de 2004 (ambos na região Sul do Estado), que também apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos. Ainda no

*cluster 3*, fora de *subcluster*, foi segregado 1 isolado de bovino de Paraíba do Sul (região Serrana do Estado), de 2003.

No *cluster 4*, os isolados foram reunidos com similaridades e pertencentes à mesma região do Estado ou à região adjacente. No *subcluster 4.1*, foram reunidos 2 isolados de equinos de Duas Barras e Sumidouro (região Serrana do Estado), de 2004 e 2002, respectivamente, que apresentaram 99,9% de identidade de nucleotídeos. Sabe-se que esses dois municípios são vizinhos. No *subcluster 4.2*, foram reunidos 5 isolados de herbívoros de Campos dos Goytacazes e Quissamã (região Norte do Estado), de 2006, 1 de equino de Campos dos Goytacazes, 3 de bovinos de Quissamã e 1 de bovino de Campos dos Goytacazes, que apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos. Sabe-se que esses também são municípios vizinhos.

Os 32 isolados do Estado do Rio de Janeiro, no presente trabalho, foram comparados com amostras do *GenBank* de diferentes regiões do Brasil. Analisando-se a segunda árvore filogenética, construída com os isolados estudados, e amostras do *GenBank* (Figura 10), pode-se constatar o mesmo padrão de agrupamento da primeira árvore, de acordo com a origem geográfica. Entretanto, verifica-se que foram formados 8 *clusters*, alguns desses sem *subclusters*, e 12 *subclusters* no total. A formação dos *clusters* e *subclusters*, nessa segunda árvore filogenética, é discutida a seguir.

No *Cluster 1*, foram reunidos exclusivamente isolados estudados, 8 de bovinos e 1 de ovino da região Serrana do Estado do Rio de Janeiro e 2 isolados de bovinos da região Metropolitana (Itaboraí), de 2006, formando o *subcluster 1.1* com esses isolados de Itaboraí, que apresentaram 99,9% de identidade de nucleotídeos. Esses dois primeiros isolados do *cluster 1*, os únicos do único *subcluster (1.1)*, apresentaram 99,6 % de identidade de nucleotídeos, com 1 isolado de bovino de Sapucaia, de 2002, o primeiro reunido fora do *subcluster 1.1*, sabendo-se que a distância entre Sapucaia e Itaboraí é de 84 km.

Fora do *subcluster*, no *Cluster 1*, os valores de identidade de nucleotídeos entre os isolados variaram de 99,4 a 100%, reunindo o isolado de bovino de Sapucaia, de 2002; 3 isolados de bovinos de Teresópolis, de 2003; 1 isolado de bovino de Cantagalo, de 2002; 1 isolado de bovino e 1 isolado de ovino de

Petrópolis, de 2004; e 1 isolado de bovino de Sumidouro, de 2002. Sugerindo, desse modo, um deslocamento de 76 km do surto de raiva, iniciado em 2002 (Cantagalo) até 2003 (Teresópolis). Em Teresópolis (2003), esse surto de raiva deslocou-se 25 km, até 2004, em Petrópolis, o que resultou em um deslocamento médio de 50,5 km de distância do vírus rábico de 2002 a 2004.

No *cluster 2*, também foram reunidos exclusivamente isolados estudados, 6 isolados de bovinos e 1 de ovino da região Sul, e 1 isolado de bovino da região Metropolitana do Rio de Janeiro, formando *subclusters* (2.1, 2.2 e 2.3). No *subcluster 2.1*, foram reunidos 1 isolado de bovino de Rio das Flores, de 2001, e 1 de ovino de Vassouras, de 2002, que apresentaram 99,8% de identidade de nucleotídeos. Tal resultado sugere um deslocamento de 28 km do surto de raiva iniciado em 2001 (Rio das Flores) até 2002 (Vassouras). No *subcluster 2.2*, foram reunidos 2 isolados de bovinos de Itatiaia, de 2001, e de Resende, de 2002, que também apresentaram identidade de 99,8% de nucleotídeos. Fato que sugere um deslocamento médio de 16 km do vírus rábico, de 2001 (Itatiaia) para 2002 (Resende). No *subcluster 2.3*, foram reunidos 4 isolados de bovinos, de Rio Claro, de 2004 e 2006, Barra Mansa, de 2006, e de Itaboraí, de 2006, com a identidade média de 99,9% de nucleotídeos.

Nesse último *subcluster* (2.3) do *cluster 2*, verificou-se que o isolado de bovino de Rio Claro (na região Sul do Estado), de 2006, e o isolado de bovino proveniente de Itaboraí (na região Metropolitana do Estado), de 2006, apresentaram identidade de nucleotídeos de 100%. Nesse caso, porém, sem possibilidade de deslocamento do surto de raiva, ocorrido em 2006 na região Sul do Estado do Rio de Janeiro, onde há barreiras geográficas, até o município de Itaboraí na região Metropolitana do Estado, a uma distância de 130 km. Cabe, nesse caso também, a hipótese de deslocamento de animais de uma região para outra, por meio de compra e venda. Especula-se que o bovino de Itaboraí pode ter sido comprado em Rio Claro, já infectado e depois, ter desenvolvido a raiva que o levou ao óbito em Itaboraí, no mesmo ano de 2006. Os outros isolados do *subcluster 2.3*, são 2 isolados de bovinos, provenientes de Rio Claro, de 2004, e de Barra Mansa, de 2006. Sabendo-se que a distância entre esses dois municípios é de 20 km, facilita o deslocamento do vírus e justifica a identidade de nucleotídeos de 99,9% entre esses isolados.

No *cluster* 3, foram reunidas amostras do *GenBank*, 3 de morcegos (*Artibeus spp.*) do Estado de São Paulo, e 1 de bovino de Goiás, com um único isolado de equino da região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro (0963-02 equino Rio de Janeiro), formando *subclusters* (3.1 e 3.2). No *subcluster* 3.1, foram reunidas 2 amostras de morcegos (*Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris*) do Estado de São Paulo, de 1998, com identidade de 99,6% de nucleotídeos. No *subcluster* 3.2, foram reunidas amostras com média de identidade de 99,5% de nucleotídeos, uma proveniente de bovino do Estado de Goiás, de 1999, a outra proveniente de morcego do Estado de São Paulo, de 1998, e o isolado 0963-02 de equino da região Metropolitana do Rio de Janeiro, de 2002.

Vale ressaltar que, as amostras do *GenBank* de morcegos não-hematófagos (frugívoros), do gênero *Artibeus spp.*, provenientes do Estado de São Paulo, agregadas no *subcluster* 3.1, corroboram dados do trabalho de Shouji et al. (2004), no qual se constatou a participação dos morcegos frugívoros *Artibeus spp* (*A. lituratus* e *A. planirostris*) no ciclo epidemiológico da raiva dos herbívoros, quando se demonstrou alto grau de identidade genética entre os isolados de *D. rotundus* e *Artibeus spp.*, variando de 97,6 a 99,4% (SHOUJI et al., 2004).

Nota-se que, à exceção do isolado de equino do município do Rio de Janeiro (região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro), agregado ao *subcluster* 3.2, amostras do *GenBank*, provenientes dos Estados de São Paulo e Goiás formam esse *subcluster* (3.2). Sugere-se que a exceção ocorreu devido ao desconhecimento do histórico desse equino, ou seja, se nasceu e foi criado na mesma propriedade onde chegou ao óbito, ou se foi adquirido de algum outro lugar e desenvolveu a doença na propriedade onde veio a óbito. Especula-se que esse isolado pode ter sido originado do surto de raiva ocorrido em 2002, no mesmo ano em que o equino da região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro morreu, nas regiões Serrana e Sul do Estado, as quais possuem maior proximidade com o Estado de São Paulo.

No *cluster* 4, foram reunidas somente amostras do *GenBank*, 2 de bovinos, provenientes do Estado do Mato Grosso, de 1999, com 100% de identidade de nucleotídeos.

No *cluster* 5, foram reunidas amostras do *GenBank* com isolados estudados, formando *subclusters* (5.1, 5.2 e 5.3). O *cluster* 5 agregou 1 isolado de bovino da

região Serrana, 4 da região Sul do Estado do Rio de Janeiro, e 2 amostras do *GenBank* de *D. rotundus* do Estado de São Paulo, de 2000. No *subcluster* 5.1, foram reunidas 2 amostras de *D. rotundus* de São Paulo, de 2000, com 100% de identidade de nucleotídeos. No *subcluster* 5.2, foram reunidos 1 isolado de bovino de Valença, de 2002, e 1 de Barra Mansa, de 2004 (região Sul do Estado do Rio de Janeiro), que apresentaram identidade de nucleotídeos de 99,8%. O que sugere ter ocorrido um deslocamento médio de 29 km do vírus rábico ao ano, sabendo-se que a distância entre esses dois municípios é de 58 km. No *subcluster* 5.3, foram reunidos 2 isolados de bovinos de Resende (região Sul do Estado do Rio de Janeiro), de 2004, que apresentaram identidade de nucleotídeos de 100%. Fora de *subcluster*, o *cluster* 5 segregou ainda o isolado de bovino, proveniente de Paraíba do Sul (região Serrana do Estado do Rio), de 2003.

No *cluster* 6, foram reunidas exclusivamente amostras do *GenBank*, 2 de bovinos, provenientes do Estado de Tocantins, de 1999, que apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos.

No *cluster* 7, foram reunidos amostras do *GenBank* com isolados estudados, formando *subclusters* (7.1, 7.2 e 7.3). O *cluster* 7 agregou 7 amostras do *GenBank*, 2 de *D. rotundus* do Estado de São Paulo e 5 de *D. rotundus* do Estado do Rio de Janeiro; e ainda neste *cluster*, 7 isolados, do presente estudo, 2 de equinos da região Serrana, 4 de bovinos e 1 de equino da região Norte do Estado do Rio de Janeiro. No *subcluster* 7.1, foram reunidas 2 amostras de *D. rotundus* do Estado de São Paulo (1 de 1998 e outra de ano desconhecido), com identidade de 99,8% de nucleotídeos. No *subcluster* 7.2, foram reunidos os 2 isolados de equinos de Duas Barras, de 2004, e de Sumidouro, de 2002 (região Serrana do Estado do Rio de Janeiro), que apresentaram identidade de nucleotídeos de 99,8%, sabendo-se que a distância entre esses dois municípios é de 15 km. No *subcluster* 7.3, foram reunidos 4 isolados de bovinos e 1 isolado de equino da região Norte do Estado do Rio de Janeiro (Campos do Goytacazes e Quissamã), 1 isolado de bovino de Campos dos Goytacazes, 3 de bovinos de Quissamã, e 1 de equino de Campos dos Goytacazes, com as 5 amostras do *GenBank* isoladas de *D. rotundus* da região Norte do Estado do Rio. A média de identidade de nucleotídeos deste *subcluster* foi de 99,9%.

Ressalta-se que, na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, as amostras isoladas de *D. rotundus* que já estão no *GenBank*, foram obtidas e estudadas por Vieira (2007), pesquisador da mesma equipe que obteve os isolados de herbívoros (bovinos, equinos e ovinos), estudados no presente trabalho. Pode-se constatar que dos 5 isolados oriundos de bovinos provenientes da região Norte do Estado, do presente trabalho, 4 apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos em relação às amostras de morcegos isoladas por Vieira (2007), na mesma região Norte do Estado do Rio de Janeiro.

Por fim, no *cluster* 8, foram reunidas exclusivamente amostras do *GenBank*, 1 de humano e 1 de cão, provenientes do Estado de Goiás, de 1999, com 99,6% de identidade de nucleotídeos. *Cluster* relacionado com a raiva humana brasileira.

Diferenças genéticas descobertas em isolados do vírus rábico são produtos de mutações que ocorrem de forma randômica em diferentes regiões geográficas, ao mesmo tempo. No entanto, o estudo de isolados do vírus rábico em épocas diferentes, sendo originados ou não da mesma região geográfica, pode ser indicativo de variação genética do vírus. Estabelecendo-se associação entre sequências nucleotídicas e aminoácidos de diferentes regiões geográficas, a origem da variante do vírus e a sua dinâmica no ecossistema, pode ser determinada. Dessa forma, podem-se construir a evolução molecular e a diversificação no meio ambiente (SMITH, 2002).

A similaridade genética de linhagens do vírus rábico oriundas de morcegos hematófagos *D. rotundus*, isoladas de áreas com distâncias superiores a 40 km entre si, porém, com distribuição temporal diferente, pode ser explicada pela capacidade de deslocamento desse morcego e sua relação com a propagação da raiva (MCKOLL et al., 2000; TADDEI, 1991; LORD, 1992; ARELLANO-SOTA, 1988).

Sabe-se que populações de morcegos hematófagos em uma colônia, possuem estabilidade relativa, com visitas regulares em abrigos vizinhos, possuindo capacidade de deslocamento de 10 a 20 km<sup>2</sup> (LORD, 1992; ARELLANO-SOTA, 1988). Esse aspecto da ecologia do morcego, o contato de indivíduos infectados com o vírus rábico de uma colônia com os indivíduos sadios e susceptíveis de outra colônia, provoca a disseminação da raiva entre morcegos hematófagos *D. rotundus* (MCKOLL et al., 2000).

O *D. rotundus* é uma espécie de quiróptero colonial não migratória que habita tanto em abrigos naturais, quanto em abrigos artificiais próximos a habitações humanas (ARELLANO-SOTA, 1988). Uma vez que os morcegos hematófagos alimentam-se de sangue de mamíferos, a distribuição de suas populações é afetada pela disponibilidade de comida e pela distribuição de herbívoros domésticos, em especial os bovinos (ARELLANO-SOTA, 1988; MCKOLL et al., 2000). Conseqüentemente, a ocorrência de raiva na população de morcegos hematófagos está intimamente relacionada à incidência da raiva em herbívoros (FORNES et al., 1974; LORD, 1992; CONSTANTINE, 1988).

Os dados analisados, no presente trabalho, demonstram concordância também com pesquisas realizadas por Tadei (1991), Vieira (2007) e Carnieli Jr. et al. (2009).

Segundo evidências demonstradas por dados analisados na pesquisa realizada por Tadei (1991), no Estado de São Paulo, constatou-se que a expansão média da epizootia da raiva bovina foi de 16 a 21 km ao mês, resultando em média de 200 km por ano. Esse deslocamento pode ocorrer mesmo se sabendo que o surto de raiva possui caráter autolimitante, determinado pela redução, em número e em tamanho, das colônias de morcegos que morrem pela raiva (TADEI, 1991).

Na pesquisa realizada por Vieira (2007), os isolados de morcegos hematófagos *D. rotundus*, provenientes de Quissamã, na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, foram comparados com os de Porciúncula e Miracema, isolados por Kimura (2006), na mesma região. Constatou-se que a identidade de nucleotídeos entre os isolados de Quissamã e Porciúncula foi de 100% e que, entre os isolados de Miracema e Quissamã, foi de 99,3%. Sabe-se que a distância entre Quissamã e os municípios de Miracema e Porciúncula é de 90 e 130 km, respectivamente.

Na recente pesquisa realizada por Carnieli Jr. et al., em 2009, os autores tiveram por objetivo caracterizar geneticamente isolados do vírus rábico de herbívoros do Estado de São Paulo, de 1997 a 2002. Separou-se o Estado de São Paulo em 3 regiões, RD1, RD2 e RD3, e estudaram-se, geneticamente, os gene N e G do vírus. As regiões foram separadas de acordo com as localidades onde diferentes surtos de raiva haviam ocorrido. A região RD1 representou a localidade onde ocorreu o início o surto, com o registro do primeiro caso; e as regiões RD2 e

RD3 representadas como regiões adjacentes. Observou-se que a epizootia originada na região RD1 era diferente da epizootia ocorrida na RD2, e que a epizootia ocorrida na RD3 foi resultado da expansão da epizootia da RD2. Demonstrou-se, portanto, que, por meio da manutenção de alto grau de identidade dos genes N e G no decorrer do tempo, as linhagens do vírus rábico de *D. rotundus*, na América do Sul, são altamente conservadas.

Dessa forma, dados da pesquisa realizada por Carnieli Jr. et al. (2009) mostram-se em concordância com dados do presente trabalho e com outros trabalhos moleculares de avaliação de isolados do vírus rábico de herbívoros, quanto ao comportamento de agrupamentos filogenéticos, de acordo com regiões geográficas, e quanto à possibilidade de expansão temporal e geográfica da mesma origem genética da linhagem viral.

No presente trabalho, a análise filogenética revelou diferentes variantes do vírus da raiva dos herbívoros circulando no Estado do Rio de Janeiro. Embora, em algumas regiões, possa circular mais de uma variante viral ao mesmo tempo, nesse estudo, observou-se que isolados agrupados no mesmo *cluster* estão relacionados com a mesma região geográfica ou adjacente. Observou-se ainda que a distribuição das diversas variantes virais é delimitada por montanhas no Estado do Rio de Janeiro. Na região Serrana (montanhosa) do Estado do Rio de Janeiro, duas variantes virais foram isoladas de herbívoros domésticos. Na região Sul do Estado, três variantes foram isoladas. E, na região Norte do Estado, uma variante viral foi isolada. Esse estudo filogeográfico dos isolados do vírus rábico, provenientes do Estado do Rio de Janeiro, teve como objetivo maior definir características epidemiológicas moleculares da raiva dos herbívoros, para auxiliar na prevenção e controle da importante virose.

## 8. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, pode-se concluir que:

Por meio da análise filogenética realizada para a raiva dos herbívoros no Estado do Rio de Janeiro, tornam-se evidentes os agrupamentos filogenéticos formados de acordo com a origem geográfica dos isolados.

A raiva dos herbívoros no Estado do Rio de Janeiro é derivada de diferentes variantes regionalmente definidas, e a sua distribuição geográfica está relacionada às populações de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*.

A escolha dos *primers* a serem utilizados em um experimento é muito importante e deve ser de acordo com os objetivos do estudo. Com o intuito de caracterização filogenética, devem ser utilizados *primers* que amplifiquem amplos segmentos do DNA de interesse. Ao passo que, se o intuito é o diagnóstico, devem ser selecionados *primers* que amplifiquem segmentos menores do DNA de interesse.

Falhas no diagnóstico molecular podem ocorrer, dependendo dos *primers* utilizados, quando não se dispõe de amostras frescas, mas sim, de amostras conservadas a -20°C, comprovadamente positivas pelas técnicas tradicionais, a imunofluorescência direta e o isolamento viral, como no presente estudo.

O conhecimento geral adquirido mediante o presente trabalho, poderá servir como suporte técnico aos profissionais atuantes na Defesa Sanitária Animal e poderá contribuir para o esclarecimento das comunidades rurais, no que concerne à prevenção e controle da raiva dos herbívoros no Estado do Rio de Janeiro.

## 9. RECOMENDAÇÕES

Sugere-se a interação das informações obtidas nos Centros de Pesquisa e nos órgãos responsáveis pelo controle da raiva, visto que a prevenção e o controle eficazes dessa doença dependem do conhecimento da sua epidemiologia e da caracterização dos isolados do vírus circulante.

Continuados estudos filogenéticos e epidemiológicos sobre a raiva dos herbívoros, bem como investigações sobre a propagação da virose, são altamente recomendados. Isto porque a raiva dos herbívoros está relacionada a fatores ambientais, geográficos e até socioeconômicos, os quais são determinantes de sua ocorrência, manutenção e evolução.

A implantação de laboratórios de diagnóstico de raiva descentralizados no Estado do Rio de Janeiro se faz necessária, tanto para pesquisas em Universidades, quanto para facilitar o acesso de produtores rurais e de Médicos Veterinários. Com isso, aumentará o envio de amostras suspeitas para o diagnóstico e reduzirá o risco de deterioração das mesmas, além de propiciar resultado rápido e preciso.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003, 544 p.

ACHA, P.N. Epidemiologia de la rabia bovina paralítica transmitida por 109 quirópteros. **Revista Veterinaria Venezoelana**, v. 24, p. 287-317, 1968.

ACHA, P.N.; SZYFRES, J.B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington/DC: Organización Panamericana de la Salud – OPAS (Public. Científ. n. 503), 1986, p. 502-526.

ALBAS, A.; FERRARI, C.I.L.; QUEIRÓZ DA SILVA, L.H.; BERNARDI, F.; ITO, F.H. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 19-22, 1999.

ALENCAR, O.A. **Aspectos biológicos e ecológicos do *Desmodus rotundus*, Chiroptera (E. Geoffroy, 1810) no Nordeste do Brasil**. 1977. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANJARA, J.M.; JHALA, C.I. Imunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies **International Journal of Zoonoses**, v. 12, p. 267-275, 1985.

ALMEIDA, M.F.; AGUIAR, E.A.C; MARTORELLI, L.F.A.; SILVA, M.M.S. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, p. 341-344, 1994.

ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M.Z. **Introdução à epidemiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2002, 293 p.

ARAÚJO, D.B.; LANGONI, H.; ALMEIDA, M.F.; MEGID, J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. **BMC Research Notes**, v. 1, p. 1- 6, 2008.

ARELLANO-SOTA, C. Vampire bat-transmitted rabies in cattle. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, p. 707-709, 1988.

ARSLAN, A.; SAGLAM Y.S.; TEMUR A. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immuno-peroxidase technique. **Veterinary Record**, v. 155, p. 550-552, 2004.

ASSIS, R.V.C.; ROSEMBERG, S. Raiva Humana. Estudo neuropatológico de trinta casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 26, p. 346-352, 1984.

ATANASIU, P. Animal inoculation and the Negri body. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. New York: Academic Press, 1975, p. 373-399.

BAER, G.M. Vampire bat and bovine paralytic rabies. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of rabies**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 389-403,

BAER, G.M.; LENTZ, T.L. Rabies pathogenesis to the central nervous system. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2 .ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p.105-132.

BARBOSA, T.S.F; MEDEIROS, D.B.A.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; CASSEB, L.M.N.; MEDEIROS, R.; PEREIRA, A. de S.; VALLINOTO, A.C.R.; VALLINOTO, M.; BEGOT, A.L, LIMA, R.J.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; NUNES, M.R.T. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. **Virology**, v. 370, p. 228-236, 2008.

BARROS, C.S.L. **Comunicação pessoal** (Universidade Federal de Santa Maria, RS). 2003.

BARROS, C.S.L.; MARQUES, G.H.F. **Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília/DF: MAPA/SDA/DDA, 2003, 50 p.

BARATA, R.C.B. A historicidade do conceito de causa. In: CARVALHEIRO, J.R. (Ed) **Textos de Apoio. Epidemiologia 1**. Rio de Janeiro: Programa de Ensino Continuada/Escola Nacional de Saúde Pública/Abrasco, 1985, p. 13-25.

BEAUREGARD, M.; BOULANGER, P.; WEBSTER, W.A. The use of fluorescent antibody staining in the diagnosis of rabies. **Canadian journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 29, p. 141-147, 1965.

BEDFORD, P.G.C. Diagnosis of rabies in animals. **Veterinary Record**, v. 99, p. 160-162, 1976.

BIJLENGA, G.; HEANEY, T. Pos-exposure local treatment of mice infected with rabies with two axonal flow inhibitors, colchicine and vinblastine. **Journal of General Virology**, v. 39, p. 381-385, 1978.

BLACK, E.M.; LOWINGS, J.P.; SMITH, J.; HEATON, P.R.; MCELHINNEY, L.M. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. **Journal of Virological Methods**, v. 105, p. 25-35, 2002.

BORDIGNON, J. **Análise filogenética e genotipagem de amostras de vírus rábico através da técnica de sequenciamento automatizado de produtos de RT-PCR**. 2003. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

BORDIGNON, J.; BRASIL-DOS-ANJOS, G.; BUENO, C.R.; SALVATIERA-OPORTO, J.; DÁVILA, A.M.R.; GRISARD, E.C.; ZANETTI, C.R. Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Archives of Virology**, v. 150, p. 694-708, 2004.

BORGES, L.C; FERREIRA, D.F. Comparação de duas aproximações do teste *t* com variâncias heterogêneas através de simulação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, p. 390-403, 1999.

BOURGAN, A.R.; CHARLTON, K.M. The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using the peroxidase antiperoxidase method: a comparative study. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 117-20, 1987.

BOURHY, H.; PERRIN, P. Rapid rabies enzyme immunodiagnosics or rabies antigen detection. MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.) **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p. 105-113.

BOURHY H.; SUREAU P. **Laboratory methods for rabies diagnosis**. Paris: Institute Pasteur, 1990.

BRADANE, H.; TORDO, N. Host switching in *Lyssavirus* history from the Chiroptera to the Carnivora Orders. **Journal of Virology**, v. 75, p. 8096-8104, 2001.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO **Controle da raiva dos Herbívoros – Manual Técnico**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2005, 104 p.

BREDT, A.; ARAUJO, F.A.A.; CAETANO-JR, J.; RODRIGUES, M.G.R.; YOSHIKAWA, M.; SILVA, M.M.S. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle**. 2. ed. Brasília/DF: Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, 1998, 117 p.

CANN, A. **Rhabdoviruses** 1999. Disponível em: <<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Rhabdoviruses.html>>. Acesso em: 08 abr. 2005 (página mantida pela American Society for Microbiology).

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

CARNIELI Jr., P.; BRANDÃO, P.E.; CASTILHO, J.G.; BUENO, C.R.; CARRIERI, M.L.; MACEDO, C.I.; OLIVEIRA, R.N.; ZANETTI, C.R.; KOTAIT, I. Phylogeny of a rabies virus identified in a cat closely related to vampire-bat rabies based on the nucleoprotein gene. **Virus Reviews and Research**, v. 10, p. 38-44, 2005.

CARNIELI Jr., P.; VENTURA, A.M.; DURIGON, E.L. Digoxigenin-labeled probe for rabies virus nucleoprotein gene detection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 159-162, 2006.

CARNIELI Jr., P.; CASTILHO, J.G.; FAHL, W.O.; VÉRAS, N.M.C.; TIMENETSKY, M.C.S.T. Genetic characterization of rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in state of São Paulo, Brazil. **Virus Research**, v. 144, p. 215-224, 2009.

CARRIERI, M.L.; PEIXOTO, Z.M.P.; PACIENCIA, M.L.B.; KOTAIT, I.; GERMANO, P.M.L. Laboratory diagnosis of equine rabies and implications for human postexposure prophylaxis. **Journal of Virological Methods**, v. 138, p. 1-9, 2006.

CASTILHO, J.G.; CANELLO, F.M.; SCHEFFER, K.C.; ACHKAR, S.M.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Antigenic and genetic characterization of the first rabies virus isolated from the bat *Eumops perotis* in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 95-99, 2008.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Rabies** 2005. Disponível em: <<http://www.vaccineinformation.org/photos/rabicdc010.jpg>>. Acesso em: 08 set. 2006.

CELER, V.; BELAY, G.; CELER Jr., V. Kinetics of rabies virus replication in cell cultures. **Acta Veterinaria Brno**, v. 60, p. 161-164, 1991.

CHALMERS, A.W.; SCOTT, G.R. Ecology of rabies. **Tropical Animal Health and Production**, v. 1, p. 33-55, 1969.

CHARLTON, K.M. The pathogenesis of rabies. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. (Eds.) **Rabies**. Boston: Kluwer Academic, 1988, p. 101-150.

CHARLTON, K.M.; CASEY, G. A. Experimental rabies in shunks. Immunofluorescence light and electron microscopic studies. **Laboratory Investigation**, v. 41, p. 36-44, 1979.

CHAVES, L.B.; SILVA, A.C.R.; CAPORALE, G.M.M.; SCHEFFER, K.C.; WAQUIM NETO, S.J.; CARRIERI, M.L.; et al. Diagnóstico *antemortem* da raiva humana: anticorpos neutralizantes em soro e líquido cefaloraquidiano. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 41, p. 8-12, 2007.

CHICARINO, C.N.; MELO, V.C.; BATISTA, E.G. Prevalência da raiva bovina e equina no município de Campos dos Goytacazes/RJ nos anos de 1999 a 2000. Foz do Iguaçu: **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Resumos**, 2001.

CHICARINO, C.N.; MELO, V.C.; JOVIANO NETO, R.; BATISTA, E.G.; MANSUR, P.U. Subnotificação da raiva rural no município de Campos dos Goytacazes, RJ. Florianópolis: **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Resumos**, 2003.

CHOPRA, J.S.; BANERJEE, A.K.; MURPHY, J.M.; PAL, S.R. Paralytic rabies: a clinic-pathological study. **Brain**, v. 103, p. 789-802, 1980.

CLARK, D.R. JR.; MARTIN, D.M.; SWINEFORD, O. Organochlorine insecticide residues in the free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) at Bracken Cave, Texas. **Journal of Mammalogy**, v. 56, p. 429-443, 1975.

CLARK, H.F. Systems for assay and growth of Rhabdoviruses. In: BISHOP, D.H.L. (Ed.) **Rhabdoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1979, p. 23-41.

CRMV-RJ – CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Encontro nacional padronizou as ações para combater a Raiva dos Herbívoros. **Jornal do CRMV-RJ**. Jan. 2005.

CONSTANTINE, D.G. An updated list of rabies-infected bats in North America. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 15, p. 347-349, 1979.

CONTI, C.; SUPERTI, F.; TSIANG, H. Membrane carbohydrate requirement for rabies virus binding to chicken embryo related cells. **Intervirology**, v. 26, p. 164-168, 1986.

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y.; GACOIN, A.; CAROFF, C.; BOURHY, H. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1117-1121, 1998.

CUNHA, R. **Viroses Neurotrópicas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968, 37 p.

DA ROSA, E.S.T.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T.F.S.; CARRIER, M.L.; BRANDÃO, P.E.; PINHEIRO, A. S. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Viruses in Human Populations**, v. 12, p. 1197-1202, 2006.

DANTAS JUNIOR, J.V.; KIMURA, L.M.S.; FERREIRA, M.S.R.; FIALHO, A.M.; ALMEIDA, M.M.S.; GRÉGIO, C.R.V.; ROMIJN, P.C.; LEITE, J.P.G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 398-400, 2004.

DAVID, D.; YAKOBSON, B.; ROTENBERG, D.; DVERES, N.; DAVIDSON, I.; STRAM, Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 111-118, 2002.

DAVIS, D.R.; METZGER, H. Structural basis of antibody function. **Annual Review of Immunology**, v. 1, p. 87, 1983.

DEAN, D.J. Local wound treatment. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 1. ed. New York: Academic Press, 1975, p. 305-317.

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

DELPIETRO, H.A.; LARGHI, O.P.; RUSSO, R.G. Virus isolation from saliva and salivary glands of cattle naturally infected with paralytic rabies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 48, p. 223-228, 2001.

DE MATTOS, C.C.; DE MATTOS, C.A.; LOZA-RUBIO, E.; AGUILAR-SETIÉN, A.; ORCIARI, L.A.; SMITH, J.S. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: Implications for transmission dynamics and human risk. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 587-597, 1999.

DE MATTOS, C.A., DE MATTOS, C.C., RUPPRECHT, C.E. *Rhabdoviruses*. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFIN, D.E., MARTIN, M.A., LAMB, R.A., ROIZMAN, B., STRAUS, S.E. (Eds.) **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 1137-1159.

DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Protocolo para tratamento de raiva humana no Brasil. Brasília/DF: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, p. 385-394, 2009.

DE SÁ, J.E.U.; DOS SANTOS, R.F. Avaliação dos resultados laboratoriais de 547 amostras para o diagnóstico de raiva de morcegos, eqüinos, asininos, caprinos, ovinos, suínos, muare e raposas enviadas ao laboratório de raiva do LACEN-Bahia entre os anos de 1991 a 2001. Florianópolis: **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Resumos**, 2003.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 151-178, 1997.

DULBECCO, R.; GINSBERG, H.S. **Microbiologia de Davis. Virologia**. 2. ed. São Paulo: Harper & Row do Brasil, v. 4, 1980, 530 p.

DUNHAM, L.C.; STEWART, H.L. A survey of transplantable and transmissible animal tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 13: 1299-1377, 1953.

EDWARDS, M.C.; GIBBS, R.A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. **PCR methods and applications**. v. 3, p. S65-S75, 1994.

ELNIFRO, E.M.; ASHSHI, A.M.; COOPER, R.J.; KLAPPER, P.E. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 559-570, 2000.

ERMINE, A.D.; LARZUL, P.E.; CECCALDI, J.L.; GUESDON, J.L.; TSIANG, H. Polymerase chain reaction amplification of rabies virus nucleic acids from total mouse brain RNA. **Molecular and Cellular Probes**, v. 4, p. 189-191, 1990.

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

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FOOKS, A.R. The challenge of new and emerging lyssaviruses. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, p. 333-336, 2004.

FORNES, A; LORD, D.L.; KUNS, M.L.; LARGHI, O.P.; FUENZALIDA, E.; LAZARA, L. Control of bovine rabies through vampire bat control. **Journal of Wildlife Disease**, v. 10, p. 310-316, 1974.

FRONTINI, M. G.; FISHBEIN, D. B.; GARZA R. J.; FLORES, C. E.; BALDERAS, T. J. C. M. A field evaluation in Mexico of four bats for oral rabies vaccination of dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 310-316, 1992.

FU, Z.F.; DIETZSCHOLD, B.; SCHUMACHER, C.L.; WUNNER, W.H.; ERTL, H.C.; KOPROWSKI, H. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 2001-2005, 1991.

FUNASA **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 1998, 26 p.

FUNASA **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2002, 126 p.

FUNASA **Manual dos centros de referência de imunobiológicos especiais**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2001, 142 p.

GAUDIN, Y.; TUFFEREAU, C.; SEGRETAIN, D.; KNSSOW, M.; FLAMAND, A. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 65, p. 4853-4859, 1991.

GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 86-91, 1994.

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M.M.; SILVA, E.V. Avaliação de três cepas de vírus rábico antígenicamente distintas, em camundongos: II — Estudo da disseminação viral por diferentes órgãos. **Revista de Saúde Pública**. v. 22, p. 473-478, 1988.

GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V.; MIGUEL, O.; SUREAU, P. Variantes antigênicas de la virus de rabia aisladas en el Nordeste y Sudeste del Brasil: estudio preliminar. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 108, p. 39-45, 1990.

GOLDWASSER, R.A.; KISSLING, R.E.; CARSKI, T.R.; HOSTY, T.S. Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 20, p. 579-588, 1959.

GOMES, A.A.B. **Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil**. 2004. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GOMES, M.N.; CHAIM, M.J.; LUCAS, A.K.; PERES, N.F.; GONÇALVES, C.A.; NOGUEIRA, V. S. Distribuição espacial dos abrigos de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* de acordo com a distância aos principais rios e propriedades da região do Escritório de Defesa Agropecuária de Piracicaba, SP. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 29, Gramado, Anais**, Brasília: SBMV (CD-ROOM), 2002.

GOMES, M.N.; MONTEIRO, A.M.; FILHO, V.S. N.; GONÇALVES, C.A. O uso do sensoriamento remoto e de sistemas de informação geográfica na análise de área de risco ao ataque de morcegos hematófagos em bovinos de quatro Municípios da região de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo. **Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Goiânia, Brasil, p. 2733-2740, 2005.

GONÇALVES-PEREIRA, S.R.F. “Protocolo de Milwaukee”, de autoria do Médico Rodney Willoughby, de Atlanta (EUA) – O Protocolo Norte-Americano que conseguiu a primeira cura de raiva humana no mundo. **RIT DA: Setor de Virologia e Víruses – SVV UENF Campos-RJ** 2009. Disponível em: <[http://inovadefesa.ning.com/group/ritda\\_svvuenf\\_camposrj/forum/topics/protocolo-de-milwaukee-de](http://inovadefesa.ning.com/group/ritda_svvuenf_camposrj/forum/topics/protocolo-de-milwaukee-de)>. Acesso em: 12 nov. 2009 (página mantida pela Rede de Inovação Tecnológica para Defesa Agropecuária – RIT DA).

GOSZTONYI, G.; DIETZSCHOLD, B.; KAO, M.; RUPPRECHT, C.E.; LUDWIG, H.; KOPROWSKI, H. Rabies and Borna disease. A comparative study of two neurovirulent agents. **Laboratory Investigation**, v. 68, p. 285-295, 1993.

GOSZTONYI, G. Reproduction of Lyssaviruses: Ultrastructural composition of Lyssavirus and functional aspects of pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 187, p. 43-68, 1994.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMIR, A.N.; MOSER, G. Immunoperoxidase test for rabies: utility as a diagnostic test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 148-152, 1994.

HARRISON, A.K.; MURPHY, F.A. Lyssavirus infection of muscle spindles and motor endplates in striated muscle of hamster. **Archives of Virology**, v. 57, p. 167-175, 1978.

HAUPT, H.; REHAAG, H. Raiva epizootica nos rebanhos de Santa Catarina, sul do Brasil, transmitida por morcegos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 2, p. 17-47, 1925.

HEATON, P.R.; JOHNSTONE, P.; MCELHINNEY, L.L.; COWLEY, R.; O’SULLIVAN, E.; WHITBY, J.E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2762-2766, 1997.

HEINEMANN, F.M.; FERNANDES-MATIOLI, F.M.C.; CORTEZ, A.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; BERNARDI, F.; ITO, F.H.; MADEIRA, A.M.B.N.; RICHTZENHAIN, L.J. Genealogical analysis of rabies virus strain from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiology and Infection**, v. 128, p. 503-511, 2002.

HELD, J.R.; ESCALANTE, J.A.; WINKLER, W.G. The international management of rabies. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, v. 1, p. 505-513.

HEMACHUDHA, T. In: McKENDALL, R.R. (Ed.) **Handbook of clinical neurology**. Amsterdam: Elsevier, 1989. v. 12, p. 383-404.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques**, v. 23, p. 504-511, 1997.

HUNT, R. **Rabies** 2005. Disponível em: <<http://www.med.sc.edu/micro/virol/rabies.htm>>. Acesso em: 12 set. 2006 (página mantida pela Universidade da Carolina do Sul).

HUMMELER, K.; KOPROWSKI, H. Investigating the rabies virus. **Nature**, v. 221, p. 418-421, 1969.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy** 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 01 mar. 2009.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Raiva bovina parálitica** 2005. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acesso em: 20 abr. 2005 (página mantida pela SUPERINTENDÊNCIA EM PRODUÇÃO ANIMAL do IMA).

INSTITUTO PASTEUR. **Raiva dos herbívoros** 2002a. Disponível em: <[http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informações/informações\\_03.htm](http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informações/informações_03.htm)>. Acesso em: 20 set. 2006 (página mantida pelo Instituto Pasteur de São Paulo).

INSTITUTO PASTEUR. **Raiva dos quirópteros** 2002b. Disponível em: <[http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informações/informações\\_02.htm](http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informações/informações_02.htm)>. Acesso em: 20 set. 2006 (página mantida pelo Instituto Pasteur de São Paulo).

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

ITO, M.; ARAI, Y.T.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F.H.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: Identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v. 284, p. 214-222, 2001b.

IWASAKI, Y. Spread of virus within the central nervous system. In: BAER, G.M. (Ed.) **The Natural History of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 121-132.

IWASAKI, Y.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Early events of rabies virus replication in tissue cultures: An electron microscopic study. **Laboratory Investigation**, v. 28, p. 142-148, 1973.

JACKSON, A.C.; REIMER, D.L.; WUNNER, W.H. Detection of rabies virus RNA in the central nervous system of experimentally infected mice using in situ hybridization with RNA probes. **Journal of Virological Methods**, v. 25, p. 1-11, 1989.

JACKSON, A.C. Update on rabies. **Current Opinion in Neurology**, v. 15, p. 327-331, 2002.

JOGAI, S.; RADOTRA, B.D.; BANERJEE, A.K. Immunohistochemical study of human rabies. **Neuropathology**, v. 20, p. 197-203, 2000.

KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMORE, R.; TIRAWATNPONG, G.; PANPANICH, T.; HEMACHUDIHA, T. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 207-210, 1993.

KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H.; MESLIN, F.X. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996, 476 p.

KASEMPIMOLPORN, S.; SAENGSEESOM, W.; LUMLERTDACHA, B.; STIPRIJA, V. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3098-3099, 2000.

KIMURA, L.M.S. **Epidemiologia molecular do vírus da raiva detectados em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil**. 2006. 94 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

KIMURA, L.M.S.; DANTAS JUNIOR, V.D.; MOURA, W.C.; KOTAIT, I.; MARINS, V.A.; BRANDÃO, P.E. Reação em cadeia da polimerase como recurso ao diagnóstico da raiva. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 28, p. 104-109, 2006.

KING, A.A. Cell culture of rabies virus. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.) **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p. 114-130.

KING, A.A.; TURNER, G.S. Rabies: A review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, p. 1-39, 1993.

KISSI, B.; BADRANE, H.; AUDRY, L.; LAVENU, A.; TORDO, N.; BRAHIMI, M.; BOURHY, H. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2041-2050, 1999.

KISSLING, R.E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 98, p. 223-225, 1958.

KLEBE, R.J.; RUDDLE, F.H. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. **Journal of Cell Biology**, v. 43: 69A, 1969.

KOBAYASHI, Y.; OGAWA, A.; SATO, G.T.; ITOU, T.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Geographical distribution of vampire bats-related cattle rabies in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, p. 1097-1100, 2006.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; MOCHIZUKI, N.; HIRANO, S.; ITOU, T.; CARVALHO, A.A.B.; ALBAS, A.; SANTOS, H.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 1-9, 2008.

KONEMAM, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. **Diagnóstico. Microbiológico**. 5. ed. São Paulo: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001, 1466 p.

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

KOTAIT, I.; GONÇALVES, C.A.; PERES, N.F.; SOUZA, M.C.A.; TARGUETA, M.C. **Controle da raiva dos herbívoros (Manual Técnico do Instituto Pasteur N°1)**. Instituto Pasteur - São Paulo. 1998, 15 p.

KOTWAL, S.; NARAYAN, K.G. Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies – an alternative to fluorescent antibody test. **International Journal of Zoonoses**, v. 12, p. 80-85, 1985.

KUCERA, L.S.; MYRVIK, Q.N. **Fundamentals of medical virology**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985, 404 p.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, p. 1244-1245, 2001.

KUZMIN, I.V.; HUGHES, G.J.; BOTVINKIN, A.D.; ORCIARI, L.A.; RUPPRECHT, C.E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the *Lyssavirus* genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. **Virus Research**, v. 111, p. 28-43, 2005.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 339, p. 237-238, 1989.

LANGOHR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, v. 33, p. 125-133, 2003.

LARGUI, O.P.; NEBEL, A.E.; LAZARO, L.; SAW, V.L. Sensitivity of BHK 21 cells supplemented with diethylaminoethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, p. 243-245, 1975.

LEMOS, H.N.; SOUZA, M.M.; CAMPOS, H.H.V.; ABREU, V.L.V.; SOARES, I.C.G.; REIS, W. Effect of one booster dose in antirabies vaccination. **Biologicals**, v. 20, p. 171-175, 1992.

LEMOS R.A.A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil**. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

LENTZ, T.L., BURRAGE, T.G., SMITH, A.L., CRICK, J.; TIGNOR, G.H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, p. 182-184, 1982.

LIEBERMANN, H. Infecções por rhabdovírus. In: Beer, J. (Ed.) **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988, p. 167-182.

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

LODMELL, D.L.; ESPOSITOJ, J.J.; EWAL, T.L.C. Rabies virus antinucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro. **Journal of Virology**, v. 67, p. 6080-6086, 1993.

LOPEZ, R.A.; MIRANDA, P.P.; TEJADA, V.E.; FISHBEIN, D.B. Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle. **Lancet**, v. 339, p. 408-411, 1992.

LORD, R.D. Seasonal reproduction of vampire bats and its relation to seasonality of bovine rabies. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, p. 292-294, 1992.

LYCKE, E.; KRISTENSSON, K.; SVENNERHOLM, B.; VAHLNE, A.; ZIEGLER, R. Uptake and transport of herpes simplex virus in neuritis of rat dorsal root ganglia cells in culture. **Journal of General Virology**, v. 65, p. 55-64, 1984.

LYCKE, E.; TSIANG, H. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. **Journal of General Virology**, v. 61, p. 2733-2741, 1987.

MACEDO, C.I.; CARNIELI Jr., P.; BRANDÃO, P.E.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; OLIVEIRA, R.N.; CASTILHO, J.G.; MEDEIROS, R.; MACHADO, R.R.; OLIVEIRA, R.C.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Diagnosis of Human Rabies Cases by Polymerase Chain Reaction of Neck-Skin Samples. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 341-345, 2006.

MACHADO, G.F.; SILVA, L.H.Q.; NUNES, C.M. Detecção de antígenos do vírus da raiva em encéfalo de cão mantido em formol durante longo período. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, p. 89-92, 2004.

MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry into animal cells. **Advances in Virus Research**, v. 36, p. 107-51, 1989.

MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBEIT, R.D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 1543-1564, 1993.

MATTA, G.C.A. **Caracterização epidemiológica e molecular da raiva bovina de 1996 a 2007 no estado de Mato Grosso, Brasil**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

MATSUMOTO, S. Rabies virus. **Advances in Virus Research**, v. 16, p. 257-301, 1970.

MATSUMOTO, S. Electron microscopy of central nervous system infection. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 1. ed. New York: Academic Press, 1975, p. 217-233.

MAXAM, A.M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of National Academy of the Science**, v.74, p.560-564, 1977.

MCKOLL, K. A.; TORDO, N.; AGUILAR, S.A.A. Bat lyssavirus infections. **Journal of Vacuum Science and Technology A**, v. 19, p. 177-196, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Epidemiológico do SUS**. Ano 4. Brasília/DF: CENEPI - Fundação Nacional de Saúde/MS, 1995, 147 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Norma técnica de tratamento profilático anti-rábico humano**. Brasília/DF: Fundação Nacional de Saúde/MS, 2002, 38 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Raiva humana transmitida por morcegos nos Estados do Pará e do Maranhão** 2005. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_raiva.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_raiva.pdf)>. Acesso em: 15 dez. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim eletrônico da Secretaria de Vigilância em Saúde. Ano 5 – Especial raiva** 2009. Disponível em: <[http://dtr2001.saude.gov.br/ascom/svs\\_informa/index\\_esp\\_raiva.html](http://dtr2001.saude.gov.br/ascom/svs_informa/index_esp_raiva.html)>. Acesso em: 10 agost. 2009.

MORIMOTO, K.; SCHNELL, M.J.; PULMANAUSAHAKUL, R.; MCGETTIGAN, J.P.; FOLEY, H.D.; FABER, M.; HOOPER, D.C.; DIETZSCHOLD, B. High level expression of a human rabies virus-neutralizing monoclonal antibody by a rhabdovirus vector. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, p. 199-206, 2001.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D.C.; CARBAUGH, H.; FU, Z.F.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD B. Rabies virus quasispecies: Implications for pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 3152-3156, 1998.

MOHANTY, S.B.; DUTTA, S.K. **Veterinary Virology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981, 372 p.

MULLIS, K.B. 1991. The polymerase chain reaction in an anemic mode: How to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. **PCR Methods and Applications**, v. 1, p. 1-4.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999, 629 p.

MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; WIN, W.C.; BAUER, S.P. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Infection of the central nervous system and centrifuged spread of virus to peripheral tissues. **Laboratory Investigation**, v. 29, p. 1-16, 1973.

MURPHY, F.A.; BAUER, S.P. Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. **Intervirology**, v. 3, 256-268, 1974.

MURPHY, F.A. The pathogenesis of rabies virus infection. In: PLOTKIN, S.A.; KOPROWSKI, H. (Eds.) **World's debt to Pasteur**. New York: Alan Liss, 1985, p.153-169.

NADIN-DAVIS, S.A.; CASEY, G.A.; WANDELER, A.L. Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 829-837, 1993.

NADIN-DAVIS, S.A. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. **Journal of Virological Methods**, v. 75, p. 1-8, 1998.

NATARAJAN, M.; MUKUNDAN, P.; JOHN, T.J. Immune response to purified chick embryo cell culture rabies vaccine manufactured in India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 95, p. 51-53, 1992.

NATHANSON, N.; GONZALEZ-SCARANO, F. Immune response to rabies virus. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 145-161.

NOGUEIRA, Y.L; AMARAL, C.F.C. Rabies virus in McCoy cell line. Part II - Titration. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 52, p. 17-21, 1992.

NUANTHIP, K.; THAWEESEK, T.; RATREE, R.; SURANAN, T.; TAWEEPORN, P.; THIRAVAT, H. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 207-210, 1993.

OPAS – ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Vigilancia epidemiológica de la rabia en las Americas. **Boletín Vigilancia Epidemiológica de La Rabia en Las Américas**, 1995, v. 27, p. 1-27.

ORCIARI, L.A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C.A.; SHADDOCK, J.H.; SANDERLIN, J.H.; YAGER, P.A.; RUPPRECHT, C.E. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v. 19, p. 4511-4518, 2001.

PAWAN, J. L. The transmission of paralytic rabies Trinidad by the vampire bats. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 30, p. 101-30, 1936.

PEARCE, J.M.S. Historical Note. Louis Pasteur and Rabies: a brief note. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 73, p. 82, 2002.

PERL, D.P.; GOOD, P.F. The pathology of rabies in the central nervous system. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 163-190.

PEIXOTO, P.V. Raiva bovina e linhas de conduta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p. 45-46, 1998.

PEIXOTO, Z.M.P.; CUNHA, E.M.S.; SACRAMENTO, D.R.V.; SOUZA, C.A.M.; QUEIROZ DA SILVA, L.H.; GERMANO, P.L.; KROEFF, S.S.; KOTAIT, I. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 72-75, 2000.

PEREIRA, S.R.F.G. Vírus associado à infecção do sistema nervoso central – Vírus da raiva. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V. (Eds.) **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: UFRJ Divisão Gráfica, 1997, p. 111-123.

PERRIN, P.; ROLLIN, P.E.; SUREAU, P. A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. **Journal of Biological Standardization**, v. 14, p. 217-222, 1986.

PERRY, L.; HEARD, P.; KANE, M.; KIM, H.; SAVIKHIN, S.; DOMÍNGUEZ, W.; APPLGATE, B. Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 15, p. 176-198, 2007.

POZZETI, P.S. **Estudo epidemiológico da raiva em animais herbívoros no Estado de São Paulo nos anos de 1996-1999**. 2001. 181 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Saúde Animal) Universidade de São Paulo, 2001.

RAVISSE, P.; BLANCOU, J. Etude histopathologique de lesions oculares chez le renard enrage. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 4, p. 101-105, 1981.

RAY, N.B.; POWER, C.; LYNCH, W.P.; EWALT, L.C.; LODMELL, D.L. Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. **Archives of Virology**, v. 142, p. 1011-1019, 1997.

RIET-CORREA, F.; FERREIRA, J.L.M.; SCHILD, A.L. Relatório das atividades e doenças da área de influência no período de 1978-1982. **Laboratório Regional de Diagnóstico**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 1999, 43 p.

RIFKY, M.E. Production in Vero cells of an inactivated rabies vaccine from strain FRV/K for animal and human use. **Acta Virologica**, v. 31, p. 321-328, 1987.

RODRIGUES DA SILVA, A.D.C.; CAPORALE, G.M.M.; GONÇALVES, C.A.; TARGUETA, M.C.; COMIN, F.; ZANETTI C.R.; KOTAIT I. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 95-98, 2000.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEZUTKA, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNÁNDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 306-319, 2007.

ROMIJN, P.C.; VAN DER HEID, R.; CATTANEO, C.A.M.; SILVA, R.C.; VAN DER POEL, W.H.M. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 81-86, 2003.

ROSE J.K., WHITT M.A. *Rhabdoviridae: the viruses and their replication*. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; MARTIN, M.A.; LAMB, R.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (Eds.) **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 2849-2883.

ROUMIANTZEFF, M.; AJJAN, N.; BRANCHE, R.; FOURNIER, P.; MONTAGNON, B.; TROTEMANN, P.; VINCENT-FALQUET, J.-C. Rabies vaccine produced in cell culture: production and control and clinical results. In: KURSTAK, E. (Ed.) **Applied Virology**, Florida: Academic Press, 1984, p. 241-296.

RUDD, R.J.; TRIMARCHI, C.V. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street rabies virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1456-1458, 1987

RUDD, R.J.; TRIMARCHI, C.V.; ABELSETH, M.K. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 12, p. 590-593, 1980.

RUPPRECHT, E.C. **Rhabdoviruses: Rabies Virus** 2009. Disponível em: <<http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch061.htm>>. Acesso em: 08 fev. 2009 (página mantida pela Universidade da Carolina do Sul).

RUSSEL, P.H.; EDINGTON, N. **Veterinary viruses**. Foxton, Cambridge: The Burlington Press (Cambridge), 1985, 338 p.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, p. 229-240, 1991.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-25, 1987.

SALES, L.G. **Raiva em bovinos: epidemiologia e diagnóstico diferencial nas regiões Norte e Noroeste Fluminense**. 1997. 74 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 1997.

SANCHES A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS C.S.L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 113-118, 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings National Academy of the Science**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SANTOS, H.P.; BRITO, C. J. C.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão a surrounding states in the Northeastern region of Brazil. **Archives of Virology**, v. 151, p. 2243-2251, 2006.

SATO, G.; TANABE, H.; SHOJI, Y.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SATO, T.; SAKAI, T. Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, p. 267-73, 2005.

SAXENA, S.N.; MADHUSUDANA, S.N.; TRIPATHI, K.K.; GUPTA, P.; AHUJA, S. Evaluation of the new rapid rabies immunodiagnosis technique. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 89, p. 445-8, 1989.

SCHMIDT, N.J. Cell culture techniques for diagnostic virology. In: LENNETTE, E.H.; SCHMIDT, N.J. (Eds.) **Diagnostic procedures for: viral, rickettsial and chlamydial infections**. 5. ed. Washington/DC: American Public Health Association, Inc., 1979, p. 65-139.

SCHNEIDER, L.G. Spread of virus from the central nervous system. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p.133-144.

SCHNEIDER, L.G.; DIRINGER, H. Structure and molecular biology of rabies virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 75, p.153-180, 1976.

SCHNEIDER, M.C. Epidemiological situation of human rabies transmission by bats in Brazil. In: **Expert consultation on the Attention of persons Exposed to Rabies by Vampire Bats**. Washington/DC: PAHO/WHO, 1991, p.1-8.

SCHNEIDER, M.C.; ALMEIDA, G.A.; SOUZA L.M.; MORALES, N.B.; DIAZ, R.C. Controle da raiva no Brasil de1980 a 1990. **Revista de Saúde Pública**, v. 30; p. 196-203, 1996.

SCHÖGEL, F. Breve histórico da raiva. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 28, p. 277-295, 1985.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; CUNHA, E.M.S.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; KURANE, I.; SAKAI, T. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus spp.*) in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, p. 1271-1273, 2004.

SIEGEL, R. **The Rabies Virus** 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/rabies/virus.html>> Acesso em: 22 jun. 2008. (página mantida pelo *Center for Disease Control and Prevention* – CDC).

SILVA, N.N.; MARKUS, H.L.; PADILHA, A.A. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 39, p. 223-226, 1967.

SILVA, R.A. da; SILVA, N.M. da; GUIMARÃES, R.S. A utilização do método de imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímico e biológico no diagnóstico da raiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 8, p. 1-4, 1973.

SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; MODENA, C.M.; TUBALDINI, M.A.S. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976 a 1997. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 263-272, 2001.

SMITH, J.S. Rabies serology. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 235-252.

SMITH, J.S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 9, p. 166-176, 1996.

SMITH, J. S. Molecular epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Eds.) **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002, p. 79-111.

SMITH, A.L.; TIGNOR, G.H.; EMMONS R.H.; WOODIE, J.D. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. **Intervirology**, v. 9, p. 359-361, 1978.

SOARES, R. M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S.M. A heminested polymerase chain reaction for detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 109-111, 2002.

SOUZA, M.M. Profilaxia no controle da raiva. **Folha Médica**, v. 101, p. 15-18, 1990.

STEELE, J.H.; FERNANDEZ, P.J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 1-24.

STOBER, M. Differential symptomatology of some diseases of the central nervous system of cattle. **Veterinary Medical Review**, v. 2, p. 99-121, 1984.

SUPERTI, F.; SEGANTI, L.; TSIANG, H.; ORSI, N. Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cells. **Archives of Virology**, v. 81, p. 321-328, 1984.

SUPERTI, F.; HAUTTECOEUR, B.; MORELEC, M.; GOLDONI, P.; BIZZINI, B.; TSIANG, H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 47-56, 1986.

SUREAU, P.; RAVISSE, P.; ROLLIN, P.E. Rabies diagnosis by animal inoculation, identification of Negri bodies, or ELISA. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 203-217.

SURVIVE OUTDOORS INC. **Rabies Virus, Symptoms, Vaccine, and Treatment** 2008. Disponível em: <<http://www.surviveoutdoors.com/reference/rabies.asp#symptoms>>. Acesso em: 10 set. 2008.

SVS / Secretaria de Estado de Saúde – Governo do Estado do Rio de Janeiro. **Manual para manejo de morcegos e controle da raiva**, 2008. Disponível em <<http://portal.saude.rj.gov.br/Docs/cvas/MANUAL%20DE%20MORCEGO%20ATUALIZADO.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2009.

SWANEPOEL, R. Rabies. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, F.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock, with special reference to Southern Africa**. Cape Town: Oxford University Press, 1994, v. 1, cap. 48. p. 493-552.

TADEI, V.A.; GONÇALVES, C.A.; PEDRO, W.A.; TADEI, W.J.; KOTAIT, I.; ARIETA, C. **Distribuição do morcego vampiro *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos**. Campinas: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – SP (Impresso Especial CATI), 1991, 107 p.

TAKAOKA, N.Y. **Raiva – Controle e profilaxia humana**. São Paulo: Instituto Pasteur – SP, 2003, 28 p.

TANG, Y.W.; PERSING, D.H. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (Eds.) **Manual of clinical microbiology**. 7 ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999, cap. 13, p. 215-244.

THORNTON, H. An ingenious method of destroying the vampire bats which transmit rabies to cattle. **Central African Journal of Medicine**, v. 26, p. 207-209, 1980.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORDO, N.; POCH, O. Structure of rabies virus. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. (Eds.) **Rabies**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988, p. 25-45.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 3914-3918, 1986.

TRIMARCHI, C.V.; DEBBIE, J.G. Naturally occurring rabies virus and neutralizing antibody in two species of insectivorous bats of New York State. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 13, p. 366-369, 1977.

TSIANG, H. Pathophysiology of rabies virus infection of nervous system. **Advances in Virus Research**, v.42, p. 375-412, 1993.

TSIANG, H. An in vitro study of rabies pathogenesis. **Bulletin de L 'Institut Pasteur**, v. 83, p. 41-56, 1985.

TSIANG, H.; CECCALDI, P.H.; LYCKE, E. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. **Journal of General Virology.**, v. 72, p. 1191-1194, 1991.

TSIANG, H. Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. **Advances in Virus Research**, v. 42, p. 375-412, 1993.

UIEDA, W. Morcegos hematófagos e a raiva dos herbívoros no Brasil. **Anais do Seminário de Ciências da Fiube, Uberaba**, v. 1, p. 13-29, 1987.

VIEIRA, L.F.P. **Caracterização Molecular de Vírus da Raiva (*Lyssavirus – Rhabdoviridae*) isolados de espécimes clínicos de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* no Norte e Noroeste Fluminense**. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2007.

VODOPIJA, I.; CLARK, H. F. Human vaccination against rabies. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 571-595.

WADA, M.Y.; BEGOT, A.L.; NORONHA, S.L.B.; ALMEIDA, I.F.; LIMA, R.J.S.; SANTOS, L.B.C.; MONTEIRO A.; CRUZ, R.S.; SILVA, I.N.O.; SOARES, D.S.; PINHEIRO, A.S.; MORAES, J.R.F.; TENÓRIO, A.S.; PEREIRA, A.G.G.; PENHA, T.C.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; BARROS, V.L.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; BARBOSA, T.F.S.B.; KOTAIT, I.; SOUZA, J.C.P.; GITTI, C.B.; UIEDA, W.; CARMO, E.H.; OLIVEIRA, R.C.; HATCH, D.L.; SILVA, E.D.; MUNHOZ, E. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no Município de Portel-Pará, março/abril de 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 4, p. 1-5, 2004. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 15 set. 2008.

WADSWORTH CENTER – NEW YORK STATE – DEPARTMENT OF HEALTH. **Disease Carriers – Viruses: Rabies** 1997. Disponível em: <<http://www.wadsworth.org/databank/rabies.htm>>. Acesso em: 08 set. 2006 (página mantida pelo Departamento de Saúde do Estado de Nova York).

WAGNER, R.R.; ROSE, J.K. Rabdoviridae: The virus and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; et. al. (Eds.) **Fundamental Virology**, 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p. 561-575.

WAKELEY, P.R.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L.M.; MARSTON, D.; SAWYER, J.; FOOKS, A.R. Development of a Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for detection and differentiation of *Lyssavirus* genotypes 1, 5 and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2786-2792, 2005.

WANDERLEY, R.P.B. **Isolamento e titulação do vírus rábico no SNC e nas glândulas salivares de bovinos naturalmente infectados**. 2005. 43 f. Monografia (Conclusão de Estágio no Instituto Jorge Vaitsman) Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

WARNER, C.K.; WHITFIELD, S.G.; FEKADU, M.; HO, H. Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genomic in situ in formalin-fixed tissues. **Journal of Virological Methods**, v. 67, p.5-12, 1997.

WARRELL, M.J.; WARRELL, D.A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v. 363, p. 959-969, 2004.

WATSON, H.D.; TIGNOR, G.H.; SMITH, A.L. Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. **Journal of General Virology**, v. 56, p. 371-382, 1981.

WEBSTER, W.A. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 367-369, 1986.

WEBSTER, W.A.; CASEY G.A.; CHARLTON, K.M. The mouse inoculation test in rabies diagnosis: early diagnosis in mice during the incubation period. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 40, p. 322-325, 1976.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WHITBY, J.E.; JOHNSTONE, P.; SILLERO-ZUBIRI, C. Rabies virus in decomposed brain of an Ethiopian wolf detected by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, p. 912-915, 1997a.

WHITBY, J.E.; HEATON, P.R.; WHITBY, H.E.; O'SULLIVAN, E.; JOHNSTONE, P. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods**, v. 69, p. 63-72, 1997b.

WHO – World Health Organization. **Expert Committee on Rabies: Eighth Report (WHO Technical Report Series)**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1992, n. 824, 90 p.

WHO – World Health Organization. **Expert Consultation on Rabies: First Report (WHO Technical Report Series)**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004, n. 931, 121 p.

WIKTOR, T.J. Métodos de cultivo tisular. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.) **La Rabia**. Técnicas de laboratorio. 3. ed. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1976, p.105-129.

WIKTOR, T.J.; CLARK, H.F. Growth of rabies virus in cell culture. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 1. ed. New York: Academic Press, 1975, p. 155-179.

WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, p. 3938-3942, 1978.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBLEIK, A.R.K.; LIVAK, J.L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILLOUGHBY R.E.; TIEVES, K.S.; HOFFMAN, G.M.; GHANAYEM, N.S.; AMLIE-LEFOND, C.M.; SCHWABE, M.J.; CHUSID, M.J.; RUPPRECHT, C.E. Brief Report: Survival after treatment of rabies with induction of coma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 2508-2514, 2005.

WHITFIELD, S.G.; FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; NIEZGODA, M.; WARNER, C.K.; MESSENGER, S.L. A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 95, p. 145-51, 2001.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 35, p. 49-63, 2005.

WUNNER W.H. Rabies virus. In: JACKSON A.C.; WUNNER W.H. (Eds.) **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002, p. 23-77.

WUNNER, W.H. The chemical composition and structure of rabies viruses. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 31-67.

WUNNER, W.H.; LARSON, J.K.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C.L. The molecular biology of rabies viruses. **Review of infectious Diseases**, v. 10, p. 771-784, 1988.

YUNG, V.; FAVI, M.; FERNÁNDEZ, J. Genetic and antigenic typing of rabies virus in Chile. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2197-2205, 2002.

ZIMMER, K.; WIEGAND, D.; MANZ, D.; FROST, J.W.; REINACHER, M.; FRESE, K. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin B**, v. 37, p. 392-400, 1990.

## 11. APÉNDICE

**PREFEITURA DO RIO**  
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE  
Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária.  
Instituto Municipal de Medicina Veterinária "Jorge Vaitsman".  
Seção de Diagnóstico de Raiva

**MODELO**  
(Para uso do IJV)

REG:

**FICHA DE REMESSA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO DE RAIVA**  
(PREENCHER COM LETRAS DE FORMA)

Tipo Material  Tipo Exame

Data Remessa  Data Recepção   
(Quando o animal for de rua ou silvestre especificar no campo proprietário e colocar o endereço em que foi capturado.)

Proprietário

Endereço

Bairro  Cidade  UF

Fone

Solicitante

Endereço/Fone

Instituição

Assinatura

**DADOS DO ANIMAL**

Espécie  Raça  Sexo

Pelagem  Porte  Idade

Nome  Vacina anti-rábica?  Data

Sacrificado?  Data da morte  Animal agressor?

Nome da Vítima	Endereço/Fone
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Assinatura Funcionário Recepção

OBS: USAR O VERSO DA FOLHA, SE FOR NECESSÁRIO.

**Figura 1A.** Ficha de Remessa de Material para Diagnóstico de Raiva (Modelo). Modelo da ficha para uso do Instituto Municipal de Medicina Veterinária "Jorge Vaitsman", na Seção de Diagnóstico da Raiva. A ficha deve ser preenchida, com todos os dados requeridos e assinada pelo solicitante, que deve pôr seu endereço, telefone e instituição à qual pertence, inclusive para a facilitação de quaisquer contatos sobre o material suspeito de raiva enviado ao Laboratório credenciado pelo MAPA.