

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE VÍRUS DA RAIVA EM MAMÍFEROS
DOMÉSTICOS E SILVESTRES DO BRASIL**

LEDA MARIA SILVA KIMURA

**Programa de Pós - Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo cruz**

ORIENTADORES

**Dr. VICTOR AUGUSTUS MARIN
Dr. PAULO EDUARDO BRANDÃO**

**Rio de Janeiro
2006**

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Epidemiologia molecular de vírus da raiva detectados em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil.

NOME DO AUTOR: Leda Maria Silva Kimura

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado:

Prof. _____ (Titulação)

Prof. _____ (Titulação)

Prof. _____ (Titulação)

Rio de Janeiro

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Kimura, Leda Maria Silva

Epidemiologia molecular de vírus da raiva em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil./ Leda Maria Silva Kimura. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006.

xiv, 79 p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/INCQS, 2006. Orientadores: Victor Augustus Marin, Paulo Eduardo Brandão.

1 - Raiva. 2 - RT-PCR. 3 -diagnóstico. 4 - epidemiologia molecular

I.Título

A DEUS, PELA OPORTUNIDADE DE MERECER A BENÇÃO DE PODER TENTAR
CONTRIBUIR NA INVESTIGAÇÃO DOS MISTÉRIOS DE SUA CRIAÇÃO. AINDA
QUE EM DOSE INFINITAMENTE PEQUENA.

“CIÊNCIA É O AMOR QUE INVESTIGA, TRABALHO É O AMOR QUE SE
CONSTRÓI.”

CHICO XAVIER

AGRADECIMENTOS

A Maíra, Bruno e Mauro, meus filhos e meu marido, por respeitarem a minha vontade de crescer.

A minha mãe, Leda Rocha de Silva, pela revisão do português e, principalmente por ser o exemplo de que força e doçura podem coabitar um mesmo coração.

Ao Dr. Cláudio de Moraes Andrade por abrir portas para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Pasteur de São Paulo pelo apoio técnico-científico.

A Dra Ivanete Kotait que com profissionalismo e carinho viabilizou o apoio recebido do Instituto Pasteur.

Ao meu orientador Paulo Eduardo Brandão, misto de extrema inteligência, humildade, ética, integridade, profissionalismo e dedicação. A oportunidade de conviver e compartilhar de todos esses atributos, me tornou, com certeza, não só uma profissional, como também uma pessoa melhor.

Ao meu orientador Victor Augustus Marin pela confiança em mim depositada.

Aos amigos do Instituto Pasteur pela colaboração: Dr. Pedro Carnieli Junior, Dra Juliana Castilho, Dr. Rafael de Oliveira.

A todos os amigos da antiga área de Virologia do LBA: Dra. Phyllis Catharina Romijn, Dra. Rita de Cássia Figueira Silva, Dr. Aldair Lopes, Dra. Livia Moderno e Nilza Pinto Mamede, pela colaboração no desenvolvimento do projeto e pelo apoio e carinho sempre presente.

Ao amigo Newton Moreno Vidal pela paciência e confecção dos slides e gravuras.

Aos amigos do LBA: Ângela Maria Corrêa e Silva, Dra. Jane Garcia Pinheiro, Dra. Leila Carvalho da Silva, Dra. Lilian Carvalho, Lindolfo Antunes, Joel Duque de Matos , Rosemary Pinto, Antonio Carlos Sampaio, pelo constante carinho, incentivo e amizade.

A amiga Dra Márcia Cristina Ribeiro Andrade do CECAL – FIOCRUZ, pelo estímulo e amizade.

Ao sanitarista Paulo Roberto Barbosa pela amizade, apoio e presteza na informação de dados.

Aos amigos e colegas das Áreas de Imunologia e de Serviço de Animais de Laboratório do INCQS: Dr. Wlamir Correa, Dra. Lúcia Werneck e Dr. Reginaldo Miller, pela concessão não somente de materiais, animais e insumos, como também pela concessão da amizade.

Aos diretores, conselheiros e funcionários da gestão 2003/2005 do CRMV-RJ, na pessoa do Dr. Sergio Bogado, todos incentivadores e amigos.

Aos Médicos Veterinários: Enock Vieira da Silva, Marlon Vicente da Silva, Maria Aparecida de Carvalho Patrício, Francisco Airton Nogueira, Nélio Batista e Lia Márcia de Paula Bruno pelo envio de amostras trabalhadas no presente estudo.

A colega e amiga Laura Iglesias de Oliveira por me apoiar sempre, mesmo quando eu não mereço.

A Delma Paula Vidal, por ser meu anjo da guarda.

Agradecimento especial ao **Dr. Geraldo Manhães Carneiro**, pois a Médica Veterinária de 49 anos não estaria galgando hoje este degrau, se ele não tivesse confiado na estudante de 17.

“Agradeço a todas as dificuldades que encontrei, se não fosse por elas eu não teria saído do lugar.”

(Chico Xavier)

Leda Kimura

RESUMO

A raiva é uma das doenças mais temidas entre as diferentes zoonoses que ameaçam o Homem, pois evolui sempre para o êxito letal, sendo, na prática, sua morbidade igual à mortalidade. Acrescem-se ainda os prejuízos econômicos, causados ao rebanho bovino nos focos de raiva epizootica, seu impacto geral na economia pecuária, reduzindo a produção de leite e carne, e suas implicações na área de Saúde Pública. Através da utilização de técnicas clássicas e moleculares, o presente estudo, visou estudar a diversidade molecular das amostras de vírus da raiva provenientes de animais domésticos e silvestres que atualmente são identificadas nas diferentes regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste), comparando-as entre si e entre amostras originárias de um município do Estado do Rio de Janeiro (Porciúncula), com base em seqüenciamento do gene codificador da nucleoproteína. A técnica de RT-PCR foi aplicada em 32 amostras de tecido nervoso oriundo de animais suspeitos de estarem acometidos pela raiva, demonstrando 100% de concordância com os resultados apresentados pelas provas clássicas, permitindo diagnóstico positivo inclusive em amostras que se apresentam em estado de putrefação. Treze das amostras de vírus isoladas foram parcialmente seqüenciadas, tendo sido encontrado formação dos principais grupos esperados de amostras de vírus da raiva, ou seja, variante antigênica 2,3, amostras fixas e variante de vírus de raiva de sagüi. Foi evidenciado, ainda, um padrão regional de distribuição de vírus da raiva associado à variante antigênica 3. A obtenção de dados derivados do seqüenciamento vem a permitir um melhor entendimento da diversidade molecular das amostras de vírus da raiva circulantes nas regiões em estudo, representando um passo fundamental para a geração de informações a serem utilizadas na epidemiologia molecular da raiva, determinando fontes de infecção, origens de surtos e relações genéticas geográficas entre os vírus da raiva detectados a partir de diferentes espécies animais.

PALAVRAS-CHAVE - Raiva, RT-PCR, diagnóstico, epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Rabies is one of the most feared zoonosis, once it always results in the death of the affected patient, what makes rabies morbidity equal to its mortality. Furthermore, economic losses due to rabies epidemics in cattle, the economic impact in agrobusiness derived from decreased milk and meat production and implications in public health must also to be taken into account. Using classic and traditional techniques, the present research aimed to study the molecular diversity of rabies virus strains from domestic and wild animals that circulate in different Brazilian regions (North, Northeastern, Southeastern, South and Center-Western) comparing the strains amongst them and with strains from a municipality from Rio de Janeiro State (Porciúncula) based on the gene coding for the nucleoprotein. The RT-PCR was applied to 32 samples of central nervous system tissue of rabies-suspected animals, showing an agreement of 100% with the classic tests, allowing a positive diagnosis even in decomposed samples. Thirteen out of these 32 samples were submitted to partial sequencing resulting in the expected groups of rabies virus variants, i. e., antigenic variants 2, 3, fixed strains and marmoset strains. A regional pattern was found regarding the variant 3 of rabies virus. Data obtained from DNA sequencing allow a better understanding of the molecular diversity of the rabies virus strains circulating in the regions under study, a fundamental step for the generation of information to be used in the molecular epidemiology of rabies, as the determination of sources of infection, origins of outbreaks and phylogeographic relationships among rabies virus strains from different species.

KEY WORDS - Rabies, RT-PCR, diagnosis, molecular epidemiology

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%- por cento

µg - micrograma

µL - microlitro

BHK-21 - Baby hamster kidney

°C - Graus Celsius

cDNA - DNA complementar

CN - cérebro normal de camundongo

CVS 31.2 - Challenge Virus Standard

Da - Dalton

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DTT - Dithiothreitol

FIOCRUZ - Fundação Instituto Oswaldo Cruz

g - Força da gravidade

G - Glicoproteína do vírus da raiva

GT - genótipo

GTs - Genotipos

IFD - Prova de Imunofluorescência Direta

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

L - RNA polimerase do vírus da raiva

LBA - Laboratório de Biologia Animal

M - Proteína matriz do vírus da raiva

mg - miligrama

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

Min. - minutos

mM – milimolar

ml – mililitro

M-MLV - Moloney murine leukemia vírus

N - Nucleoproteína do vírus da raiva

nm - nanômetros

NS - Fosfoproteína do vírus da raiva

Nt - nucleotídeos

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - Pares de base

PB - Prova biológica (Inoculação Intracerebral em camundongos)

PCR - reação em cadeia pela polimerase

PBS - Solução salina tamponada fosfatada

PESAGRO-RIO - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

pH - Potencial hidrogeniônico

PM - Peso Molecular

pmol - picomoles

P NS - Fosfoproteína do vírus da raiva

PV - Pasteur Vírus, vírus da raiva fixo

RNA - Ácido Ribonucléico

RNA_m - Ácido ribonucléico mensageiro

RNP - Ribonucleoproteína do vírus da raiva

RT-PCR - Reação de transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase

SAD - Street Alabama Dufferin

Seg. - segundos

SNC – Sistema Nervoso Central

Taq - *Thermus aquaticus*

U - Unidades

X - vezes

Obs. - Algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia em inglês, devido ao seu uso consagrado na literatura técnica.

LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS

QUADRO 1- Amostras de SNC analisadas no presente estudo, com suas respectivas passagens em camundongos, hospedeiros de origem, ano de coleta e origem geográfica -20

QUADRO 2 - Seqüência dos “primers” utilizados para amplificação de um segmento de 248 pb do gene N do vírus da raiva.-----25

QUADRO 3 - Resultados das provas de Imunofluorescência direta, Prova biológica, Reação em cadeia pela polimerase, e Sequenciamento-----32

QUADRO 4 - Amostras seqüenciadas, por hospedeiro de origem, ano de isolamento, origem geográfica e número de acesso no GenBank.----- 36

FIGURA 1 - Mapas do Brasil e do Estado do Rio de Janeiro, indicando os estados e municípios de origem das amostras.----- 21

FIGURA 2 - Esquema do genoma do vírus da raiva com a localização dos sítios de ligação dos iniciadores e o respectivo tamanho dos produtos da RT-PCR.----- 25

FIGURA 3 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, revelando os produtos de amplificação do fragmento de 248 pb referente à região que contem a nucleoproteína viral-----28

FIGURA 4- Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, revelando os produtos de RT-PCR após a purificação.----- 31

FIGURA 5 — Árvore filogenética de distância para uma região de alinhamento de 157 nucleotídeos da porção 3’terminal do gene N do vírus da raiva. -----33

TABELA 1 – Identidade de nucleotídeos para as seqüências apresentadas ----- 35

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS	xiii
1- INTRODUÇÃO	01
2- OBJETIVOS	18
3- MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1-Vírus de referência	19
3.2-Amostras de campo	19
3.3-Prova de Imunofluorescência direta	22
3.4-Prova Biológica	23
3.5-Reação em cadeia pela polimerase para o gene N	24
3.6-Sequenciamento de DNA e análise filogenética	26
4-RESULTADOS	27
4.1- Prova de Imunofluorescência direta, Prova Biológica, RT-PCR	27
4.2-Sequenciamento e análise filogenética	29
5-DISCUSSÃO	37
6-CONCLUSÕES	44
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8-ANEXO-trabalho publicado	62

1-INTRODUÇÃO

A raiva é considerada uma das mais importantes zoonoses entre as numerosas conhecidas devido ao seu desenlace geralmente fatal. A doença tem um longo histórico e é conhecida desde a Antigüidade, supondo-se ser de Hipócrates a primeira descrição sobre a sintomatologia da raiva humana, afirmando que: “Pessoas loucas bebem muito pouco, são perturbadas e assustadas” (BAER, 1991).

Atribui-se ao filósofo grego Demócrito (460–370 a.C.), a primeira descrição registrada de raiva canina (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Aristóteles descrevia-a como uma enfermidade contagiosa, causada pela mordedura de cães com raiva (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Na Grécia, a deusa Artemisa era a responsável pela cura da Raiva, e o deus Artiste, filho de Apolo, combatia os efeitos da doença (SCHNEIDER; SANTOS-BURGOA, 1994) que era chamada de *lyssa* ou *litta*, que significa loucura (STEELE, 1975).

Homero, em sua obra “A Ilíada”, relacionava a ocorrência de eventos maléficis à saúde dos homens e dos cães com o aparecimento no firmamento da estrela Sirius, a estrela do Cão da constelação de Orion. Ainda hoje persiste a crença popular, amplamente difundida, que refere o mês de agosto como o “mês do cachorro louco” (SCHNEIDER; SANTOS-BURGOA, 1994).

Importante se torna ressaltar que, 23 séculos antes de Cristo, o Código de Hammurabi, da antiga Babilônia, contemplava a doença, estipulando pagamento às famílias das vítimas a ser feito pelos donos de cães loucos (CORRÊA, 1975).

Gardano, um escritor romano, descreveu a infecciosidade da saliva dos cães raivosos. Os escritores romanos descreveram o material infeccioso como um veneno, para o qual a palavra latina era “vírus”. Outra causa da raiva que é primeiramente mencionada por Plínio e Ovídio é o chamado verme da língua do cão. Para evitar a raiva nos tempos médicos antigos, se cortava o freio da língua (uma membrana mucosa) e se extirpava a prega na qual se pensava que estava o verme. Essa idéia persistiu até o século XIX quando Pasteur e outros colaboradores comprovaram que os centros nervosos constituíam o principal sítio de replicação dos vírus (STEELE, 1975).

Zinke em 1804 citado por Steele (1975) conseguiu transmitir raiva para animais sadios a partir da saliva de animais raivosos, sendo esta a primeira abordagem científica para o estudo da doença. Galtier, em 1881 também citado por Steele (1975), através de

estudos sobre a indução de proteção em animais de laboratório, influenciou Louis Pasteur nas pesquisas que o mesmo vinha realizando com o agente da raiva desde 1880.

O tratamento preventivo humano da raiva constitui um dos primeiros processos de imunização registrada na história da medicina, tendo sido empregado pela primeira vez por Louis Pasteur, em 1885 ao atender o pequeno Joseph Meister, um alsaciano de 9 anos de idade, agredido por um cão raivoso apresentando lesões múltiplas e profundas nas mãos, pernas e coxas, caso considerado de extrema gravidade (AZEVEDO, 1981). Foi-lhe administrada uma vacina preparada empregando medula dessecada de coelhos adultos infectados (LEMOS; SOUZA, 1990). Esta primitiva e histórica vacina de Pasteur teve êxito e a criança sobreviveu, sendo considerado que a vacina havia induzido a produção dos anticorpos necessários para neutralizar os vírus antes que chegassem ao sistema nervoso (CARBALLAL; OUBINA, 1998).

Em 1886, Pasteur registrou os resultados do atendimento vacinal de mais 350 casos, conseguindo estabelecer a profilaxia da raiva, faltando apenas um centro para a vacinação contra a doença. A Academia de Ciências de Paris propõe então, uma comissão para executar a proposta de Pasteur e assim, na França, foi criado o primeiro Instituto Pasteur. Dez anos depois, vários Institutos se distribuíaam por todo o mundo responsabilizando-se pela pesquisa, estudo e tratamento da raiva. No final de 1886, mais de 2000 pessoas haviam sido atendidas e o índice de mortalidade da doença reduzido significativamente (WILKINSON, 2002).

A partir de então vários pesquisadores desenvolveram tipos diferentes de vacinas anti-rábicas de uso humano, empregando vírus inativados e vírus apenas modificados replicados em diversos tipos de sistemas celulares, tais como: sistema nervoso central (SNC) de mamíferos adultos, embriões de galinha e de pata, sistema nervoso de mamíferos recém-nascidos (camundongos, coelhos e ratos) e cultivo de células de embriões de galinha e ainda de órgãos (rins) de criceto, porco e cão. Posteriormente foram estabelecidas vacinas a partir de células diplóides humanas e de rim de macaco verde (células Vero) (LEMOS; SOUZA, 1990).

No início do século XX o papel dos morcegos na epidemiologia da raiva foi plenamente evidenciado. Desde então, a incidência da Raiva transmitida por morcegos foi demonstrada em várias regiões dos neotrópicos, desde a Argentina até o México. Antes da colonização européia as espécies de morcegos hematófagos ocorriam em populações relativamente pequenas que exploravam mamíferos e aves silvestres

(FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1998). Existe atualmente um grande número de presas (gado) para estes animais, onde antes não existia. Deve-se notar também um aumento da disponibilidade de locais artificiais utilizados como refúgios, tais como minas, túneis, poços de água e galpões. Por estas razões os morcegos hematófagos são mais abundantes, e sua distribuição é mais ampla, favorecendo a dispersão da enfermidade (LORD, 1998).

Os morcegos não hematófagos somente passaram a merecer importância na Saúde Pública, quando, em 1953, no estado da Flórida, EUA, um garoto foi mordido por um morcego insetívoro *Dasypterus floridanus*, atualmente denominado *Lasiurus intermedius*. O proprietário do sítio onde aconteceu o incidente sabia da existência da raiva em morcegos “vampiros” no México e encaminhou o morcego agressor ao Laboratório de Raiva, onde foi diagnosticado positivo. O garoto recebeu tratamento anti-rábico com vacina e não chegou desenvolver a doença (BRASIL, 2005b).

Analisando a origem do vírus da raiva, Badrane e Tordo (2001) consideram que possivelmente os quirópteros se apresentam como hospedeiros primários de *Lyssavirus*. De acordo com os estudos moleculares realizados pelos mesmos autores, a emergência da raiva em carnívoros deve ter se originado de quirópteros, no mínimo, há 800 anos atrás.

A família *Rhabdoviridae* é composta de 3 gêneros/grupos, denominados *Lyssavirus*, *Vesiculovirus* e *Rhabdovirus* (MURPHY, 1996).

A morfologia do virion da raiva é semelhante a projétil de arma de fogo e as referidas partículas possuem 70-85 nm de diâmetro e 130-180 nm de comprimento, são envelopadas contendo lipídeos e RNA de fita simples com polaridade negativa (3´-5´), o que as impossibilitam de serem traduzidas diretamente em proteínas. (ALMEIDA et al., 1962)

Os vírus da raiva possuem um genoma não-segmentado tendo tamanho de 12 a 16 kb. O envelope possui grandes peplômeros que chegam a medir de 8 a 10 nm de comprimento e 3 nm de diâmetro sendo constituídos de trímeros de glicoproteínas virais. Dentro do envelope encontra-se um nucleocapsídeo cilíndrico, helicoidal (MURPHY, 1996).

O RNA genômico da partícula infecciosa contém cinco genes e cada qual codifica uma proteína estrutural do virion. Assim, cinco proteínas distintas compõem a partícula viral: N, NS, L, M e G. A proteína N (nucleoproteína), a proteína NS (“não-

estrutural”) que associada à transcriptase L e ao RNA formam um complexo ribonucleocapsídeo (RNP); a proteína M (matriz) e a proteína G (glicoproteína) juntamente com as duas membranas lipídicas formam o envelope viral (FRANCKI et al., 1991; BOURHY; SUREAU, 1991)

A proteína M localiza-se na face interna do envelope lipídico e mantém a ligação entre o envelope e o complexo RNP (DELAGNEAU; PERRIN; ATANASIU, 1981; TORDO et al., 1986). É formada por 202 aminoácidos e possui PM de 23.000 Da sendo importante na regulação da replicação viral (SOKOL; STANCEK; KOPROWSKI, 1971; TORDO et al. 1986).

A glicoproteína G é uma proteína transmembranária que forma as espículas que se projetam na superfície viral. É responsável pela ligação do vírus à superfície celular do hospedeiro definindo desta forma o neurotropismo do vírus (WUNNER, 2002). É considerada a única proteína capaz de induzir a formação e reagir com os anticorpos neutralizantes (KAPLAN; TURNER; WARREL, 1986). Esta proteína tem 524 aminoácidos e peso molecular de 58.500 Da. O domínio extracitoplasmático da proteína é o mais imunogênico. Variações na sequência de aminoácidos, em algumas regiões da proteína G podem alterar as propriedades patogênicas e imunológicas do vírus (BUNSCHOTEN et al., 1989). Verificou-se que a presença do aminoácido arginina na posição 333 é uma determinante para a infecção de determinadas células nervosas e conseqüente patogenia (WUNNER, 1991; KAWAI; MORIMOTO, 1994).

A proteína P(NS) é constituída de 297 aminoácidos, possui PM de 33.000 Da e é fortemente fosforilada (TORDO et al., 1986). É uma proteína interna, não estrutural (NS) e possui papel importante na replicação viral, já que esta é inibida por anticorpos monoclonais específicos para essa proteína (DELAGNEAU; PERRIN; ATANASIU, 1981).

A proteína L (RNA polimerase) é a maior proteína da partícula viral, com 2.114 aminoácidos e peso molecular de 244,2 kDa. É responsável pelas atividades enzimáticas necessárias à transcrição e replicação do RNA viral (TORDO et al., 1988).

A proteína N é um polipeptídeo longo com 450 aminoácidos, peso molecular de 50.500 Da, fosforilada no resíduo de serina na posição 389 e situa-se no interior do cilindro helicoidal do nucleocapsídeo. Tem importância estrutural na capsidização do RNA genômico, além de estar envolvido 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 (TORDO, 1996). A nucleoproteína é considerada uma região gênica muito conservada (CREPIN; AUDRY; ROTIVEL, 1998; KISSI; TORDO; BOURHY, 1995), facilitando o desenho de iniciadores hábeis na amplificação de inúmeras variantes virais.

O gene N é um alvo adequado para a comparação de amostras por períodos de evolução relativamente longos, sendo que estudos baseados nos mesmos demonstraram a adaptabilidade da técnica de PCR tanto para diagnóstico, como para tipagens precisas pela determinação de sua seqüência de nucleotídeos. Comparações entre seqüências de genomas inteiros ou partes foram realizadas, visando estudar patogenicidades distintas, quer seja com o objetivo de estudos epidemiológicos (SMITH et al., 1992, NADIN-DAVIS; HUANG; WANDELER, 1996; BADRANE; TORDO, 2001), quer seja para estudos de produção de vacinas (ITO et al., 2001a).

Atualmente a caracterização molecular do gene N identifica sete genotipos (GTs), compreendendo os vírus da raiva clássico (GT1) e os raiva relacionados Lagos bat vírus (GT2), Mokola vírus (GT3), Duvenhage vírus (GT4), European bat Lyssavirus EBL1 (GT5) e EBL2 (GT6), e o Australian bat Lyssavirus ABL (GT7) (BOURHY et al., 1992, 1993a; AMENGUAL et al., 1997; GOULD et al., 1998). Para complementar o conhecimento sobre variações antigênicas dentro da diversidade genética do vírus da raiva, estudos enfocaram o(s) gene(s) N e/ou G (SMITH, 1989; SACRAMENTO; BOURHY; TORDO, 1992; TORDO et al., 1993b; NADIN-DAVIS et al., 1993, 1994; KISSI et al., 1995; RAVKOV; SMITH; NICHOL, 1995; BOURHY et al., 1999; NADIN-DAVIS et al., 2001).

Os vírus da raiva (sorotipo 1) têm uma prevalência praticamente mundial. Os chamados vírus raiva-relacionados (sorotipos 2, 3, 4 e EBLs) têm ampla distribuição geográfica na África e na Europa (TORDO et al., 1998).

Na maioria dos países do mundo, a epidemiologia da raiva humana é considerada em paralelo com a epizootia da doença nos animais domésticos e silvestres (KING; TURNER, 1993). A raiva causada pelos vírus do gênero *Lyssavirus*, genotipo I, está presente em todos os continentes, com exceção da Oceania. Alguns países das Américas (Uruguai, Barbados, Jamaica e Ilhas do Caribe), da Europa (Portugal, Espanha, Irlanda, Grã-Bretanha, Países Baixos e Bulgária) e da Ásia (Japão) encontram-se livres da doença. Entretanto, determinados países da Europa (França, Inglaterra) e da América do Norte (EUA e Canadá) enfrentam ainda problemas quanto ao ciclo silvestre da doença.

Os dados sobre a morbidade e mortalidade constituem uma única informação, uma vez que a doença apresenta 100% de letalidade nas diferentes espécies animais (BRASIL, 2005b).

Com exceção aos vírus Lagos bat, os quais não têm sido isolados de seres humanos, todos os vírus da raiva e raiva-relacionados são patogênicos para mamíferos incluindo o Homem e podem levar à encefalite (BLANCOU; MESLIN, 2000).

Quando um virion da família Rhabdoviridae encontra uma célula hospedeira susceptível, uma série de eventos é desencadeada, podendo-se classificá-los como: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem e brotamento. Tais eventos resultam na liberação da progênie viral (WAGNER; ROSE, 1996). Após a ligação do virion à célula hospedeira, este é engolfado pela célula por endocitose ou “coated pits”, o genoma viral sendo liberado no citoplasma por fusão mediada pela glicoproteína dependente de pH (6,3), o que implica em pequenas mudanças conformacionais na glicoproteína (GAUDIN et al., 1993).

O primeiro evento após a entrada na célula é a transcrição dos seus genes produzindo cinco mRNA monocistrônicos, seguido da síntese de seu genoma complementar, fita positiva (5`-3`). O genoma completo possui 11.932 nucleotídeos(nt), o qual contém os genes que codificam para as cinco proteínas estruturais, N(1350 nt), NS(891nt), M(606 nt), G(1572 nt) e L(6424 nt). Estes genes apresentam-se separados por pequenas regiões intergênicas de 2, 2, 5 e 24 nucleotídeos, respectivamente (MURPHY,1996).

O RNAm que codifica a proteína N é o mais abundante no SNC e nos cultivos celulares infectados. Esse RNA é, portanto o alvo principal dos estudos da infecção por hibridização molecular. Os RNAm são então traduzidos em proteínas virais pela maquinária celular (BOURHY; SUREAU, 1991).

O rendimento da replicação viral é muito baixo. Na verdade, poucos virions brotam em relação à abundante produção de nucleocapsídeos virais. Portanto estes ficam acumulados no citoplasma das células infectadas em forma de inclusões que podem ser detectados por histopatologia, imunofluorescência, imunoenzimologia e microscopia eletrônica (BOURHY; SUREAU, 1991).

Os vírus da raiva são sensíveis aos solventes de lipídios (sabão, éter, clorofórmio e acetona), ao etanol a 45-70%, aos preparados iodados e aos compostos de amônio quaternário. Outras relevantes propriedades são as resistências à dessecação, assim como

a congelamentos e descongelamentos sucessivos, relativa estabilidade a um pH entre 5-10 e a sensibilidade às temperaturas de pasteurização e à luz ultravioleta (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKI, 1996). A infecciosidade é bem estável em extratos de tecidos congelados ou liofilizados (DULBECCO; GINSBERG, 1980).

Os vírus selecionados modificados (fixos) e os tipos selvagens (de rua), preparados pelos muitos métodos diferentes e propagados em diversos tecidos, também são imunologicamente semelhantes. Quando recém isoladas no laboratório, a fresco, as amostras são denominadas “vírus de rua”. Essas amostras apresentam períodos de incubação longos e variáveis (em geral 21 a 60 dias em cães) e produzem, com regularidade, corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos. Os animais inoculados podem apresentar longos períodos de excitação e perturbação. As partículas de vírus podem ser replicadas pelas células de glândulas salivares, bem como do SNC (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1989). Após várias passagens em um determinado sistema celular, ocorre uma seleção de determinada subpopulação de vírus adaptada a este e, conseqüentemente período de incubação dessas amostras de “rua” torna-se mais curto e de duração “fixa” (KING; TURNER, 1993).

Todos os mamíferos são sensíveis aos “vírus de rua”, ainda que essa sensibilidade varie de acordo com a espécie. Contudo, aparentemente não há diferença de sensibilidade entre sexos e a idade pode ter relativa importância quanto à infecção, à qual os jovens são mais susceptíveis (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

A patogenia é um processo multifásico e o desenvolvimento de enfermidade é influenciado pelo ambiente intracelular, por funções celulares induzidas como a capacidade da resposta imune do hospedeiro, pela velocidade de replicação das partículas, pela citopatogenicidade e pela difusão dos vírus, dentro e entre órgãos (MARSCH; BRON, 1997).

Um ferimento ou uma abrasão na pele, geralmente produzidos por um animal raivoso, são as principais portas de entrada dos vírus, presentes na saliva do animal, no organismo humano (DULBECCO; GINSBERG, 1980; HAGAN; BRUNER, 1952; LARGHI; OUBINA, 1998). Os vírus também podem atravessar as membranas mucosas íntegras ou do trato digestivo, porém não há relatos de que ultrapassem a pele íntegra (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKI, 1996; AZEVEDO, 1981). Uma densa população de morcegos infectados pode também criar aerossóis de secreções contendo vírus, e, sob esta forma, penetrar no trato respiratório do homem ou de animais. Em humanos é

reportada a infecção por transplante de córnea (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1986; CDC, 1999) e em receptores de diferentes órgãos transplantados (CDC 2004a; CDC 2004b).

Os vírus da raiva ao serem inoculados por via subcutânea ou intramuscular, como ocorre naturalmente por uma mordedura, são replicados localmente e eventualmente propagam-se do local de inoculação ao SNC pelo axoplasma dos nervos periféricos (ACHA e SZYFRES, 1986). O genoma viral move-se centripetamente no citoplasma dos axônios do sistema nervoso periférico até alcançar o SNC, geralmente pela medula (FENNER et al., 1993).

Inicialmente os vírus são replicados nas células musculares ou nas células do tecido subepitelial até que atinjam concentrações suficientes para difundirem-se a terminais nervosos, motores ou sensitivos no músculo ou na pele, onde se ligam especificamente ao receptor da acetilcolina ou outros receptores entrando nas terminações nervosas. Isso inicia a segunda fase da infecção na qual a infecção neuronal e o movimento passivo centrípeto dentro do axônio levam ao envolvimento do SNC (DULBECCO; GINSBERG, 1980; LENTZ et al., 1982; FENNER et al., 1993). Segundo Larghi e Oubina (1998) os vírus podem ingressar diretamente nas terminações nervosas ou replicarem-se no tecido muscular, onde podem permanecer por tempo suficiente para permitir a ação do sistema imune ativado pela vacinação.

Quando a infecção não é interrompida nesta fase, os vírus penetram no sistema nervoso periférico pelos fusos neuromusculares, para chegarem de forma centrípeta ao SNC, onde são replicados e se dirigem centrifugamente para todo o organismo incluindo, especialmente, as glândulas salivares. Por meio da saliva, os vírus podem ser transmitidos a outros indivíduos e desta forma a virose ser perpetuada (LARGHI; OUBINA, 1998).

O tempo entre a mordedura infectiva e o desenvolvimento de sinais envolvendo o SNC é geralmente de 14 e 90 dias, podendo variar de 6 dias a 1 ano e em casos excepcionais o período de incubação, pode ser de até 4 anos, possivelmente porque os vírus permanecem seqüestrados nas células do músculo estriado antes de entrar nas terminações nervosas e ascender ao cérebro (DULBECCO; GINSBERG, 1980; FENNER et al., 1993).

Os vírus, para iniciarem uma infecção, devem, essencialmente, promover a interação vírus célula. Por outro lado, a fusão vírus célula não é suficiente para permitir

uma infecção produtiva da célula, existindo outros fatores de restrição pré e pós-penetração (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1989). O período de incubação depende, principalmente, do volume do inóculo viral e da distância do trajeto que vai do ferimento ao cérebro. Sua extensão está assim relacionada com a gravidade e o tamanho da ferida causada pelo animal raivoso e é menor em mordidas na face e na cabeça; nestas circunstâncias os ferimentos também são freqüentemente graves (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Na raiva humana consideram-se cinco estágios: período de incubação, período prodrômico, período neurológico, coma e morte. Embora apresente um quadro clínico clássico, é uma doença de difícil diagnóstico e reconhecimento. Geralmente, no início dos sintomas, a doença é confundida com outras patologias, o que leva a diagnósticos tardios ou até mesmo após a morte do paciente (HEMACHUDHA; LAOTHAMATAS; RUPPRECHET, 2002).

Em bovinos, segundo Reis et al. (2003), a forma clínica mais freqüente é a paralítica, apresentando sinais típicos tais como: ranger dos dentes, sialorréia, apetite e deglutição ausentes ou diminuídos, retenção de fezes e urina, diminuição dos reflexos centrais e periféricos, assim como da sensibilidade cutânea, andar cambaleante evoluindo para decúbito e posterior morte, de seis a oito dias após o início do quadro.

Em sagüis inoculados experimentalmente com amostra CVS, os sinais incluem: sialorréia, anorexia, hiperexcitabilidade, incoordenação motora, opistótomo, paralisia dos membros posteriores e da cauda, culminando com respiração marcadamente abdominal até o óbito, que ocorre de 3 a 6 dias após o aparecimento dos sintomas (ANDRADE et al., 1999).

Com base na tipificação genotípica dos Rhabdovírus, espécies do gênero Lyssavirus foram identificadas em todos os continentes, exceto nos pólos, em quirópteros de hábitos alimentares os mais diversos (TORDO; CHARLTON; WANDERLER, 1998).

A sintomatologia da raiva em morcegos hematófagos, especificamente em *Desmodus rotundus* é relativamente bem conhecida. O comportamento e os sintomas mais freqüentes são: atividade alimentar diurna, hiperexcitabilidade à luz e aos sons agudos, agressividade, tremores, falta de coordenação dos movimentos, contrações musculares e paralisia. A morte dos quirópteros acometidos de raiva pode ocorrer cerca de 48 horas após o aparecimento dos primeiros sinais (FUNDAÇÃO NACIONAL DE

SAÚDE, 1998). Uieda; Harmani e Silva (1995), sugerem que se deva suspeitar de raiva sempre que forem encontrados morcegos com comportamento anormal em plena luz do dia e fora do ambiente natural, sejam eles, hematófagos ou insetívoros.

O controle da raiva baseia-se no controle populacional de seus transmissores e na imunização (seja humana ou de animais).

A vacinação anti-rábica desencadeia uma série de mecanismos de defesa no organismo, tais como: produção de interferons e de anticorpos específicos e sensibilização de linfócitos T. As células T, além de auxiliarem na indução da resposta das células B, agem como células efetoras para a imunidade celular (NATHANSON; GONZALEZ-SCARANO, 1991).

A recomendação no que se refere à vacinação de bezerros é a aplicação da vacina a partir de 6 meses de idade, e que logo se incorporem ao calendário de vacinação anual. Em algumas zonas onde a raiva é enzoótica, recomenda-se a vacinação a partir de 3 meses de idade, revacinação aos 6 meses e finalmente incorporação destes animais ao calendário anual (IÑIGO et al., 1998). No entanto, a vacinação de animais jovens requer cuidado especial, pois anticorpos maternos podem ser encontrados nos soros destes animais inibindo a resposta imunológica frente a uma vacinação (LARSON; WUNNER; ERTL, 1992).

Os vírus da raiva são estudados por meio de três formas distintas de manifestação epidemiológica: urbana, rural e silvestre. A raiva urbana é caracterizada pela presença do vírus em animais domésticos de estimação (cães e gatos), ocasionada, geralmente, por uma população de uma variante de vírus encontrada apenas nestas espécies (BRASIL, 2005b). Já a raiva rural é caracterizada principalmente pela presença dos vírus em populações de morcegos hematófagos que os transmitem para os animais de produção.

No Brasil, a caracterização antigênica e genética de amostras de vírus da raiva tem possibilitado a diferenciação em pelo menos duas variantes: variante canina e variante de morcego hematófago *Desmodus rotundus* (BRASIL, 2005b), que podem ser subdivididas de acordo com a região em que foram isoladas (ITO et al. 2001a, 2001b, 2003; TORDO et al. 1993b; KISSI, et al. 1995)

Considerando a circulação do vírus da raiva entre as populações de quirópteros (ciclo aéreo da raiva), e a importância do morcego hematófago na epidemiologia desta

doença nos herbívoros, medidas criteriosas e efetivas de controle devem ser seguidas (KOTAIT et al., 1998).

No Brasil o controle populacional de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* é feito principalmente através do método químico. Esse método utiliza uma substância anticoagulante, a Warfarina, que quando ingerida pelos morcegos provoca morte por hemorragia. O método pode ser dividido em dois grupos: um que exige contato direto com os morcegos e outro que não necessita deste contato, sendo por isso de menor risco (PICCININI, 1982).

O primeiro grupo, requer capturas noturnas de morcegos hematófagos com redes armadas ao redor de currais ou áreas de repouso do gado. Nos morcegos hematófagos capturados vivos é aplicada uma pasta vampiricida de uso tópico nos pêlos do dorso do animal, o qual é solto e retorna ao seu abrigo. *Desmodus rotundus* tem um comportamento gregário e mantém um contato corporal durante o período de repouso nos abrigos. Além disso, como higiene corporal, possuem o hábito de lamberem seus pêlos e de seus companheiros. Um morcego no qual foi aplicada a pasta tóxica é capaz de disseminá-la para uma média de 20 outros indivíduos. O efeito desse método aparece em menos de 1 semana com alto índice de morte dos morcegos hematófagos nos abrigos (PICCININI, 1982) e diminuição do coeficiente de mordedura nos rebanhos (KOTAIT et al., 1998).

O segundo método de controle químico não exige um contato direto com os hematófagos, incluindo a aplicação da pasta vampiricida sobre mordeduras frescas nos animais domésticos. Esse método depende do comportamento exibido por *Desmodus rotundus* ao alimentarem-se de sangue de mamíferos: o de utilizar mordeduras feitas em noites anteriores e o de mais de um indivíduo usar uma mesma mordedura numa mesma noite (PICCININI, 1982; FLORES-CRESPO, 1998). A vantagem deste método é a possibilidade de aplicação da pasta vampiricida pelo próprio criador, visto que não há contato direto com o *Desmodus rotundus*. Para maximizar a eficácia do controle populacional, os dois métodos devem ser associados (KOTAIT et al., 1998).

Tanto a vacinação do gado bovino quanto a aplicação de técnicas para o controle de morcegos hematófagos são medidas complementares, nunca uma só delas resolverá o problema em sua totalidade. Por haver vacinado não se deve deixar de controlar os hematófagos, nem por haver aplicado medidas de controle de hematófagos, se deve deixar de vacinar (IÑIGO et al.,1998).

A importância econômica da raiva está relacionada à sua ocorrência em animais produtores de alimentos. A raiva de herbívoros, principalmente em bovinos, transmitida por morcegos hematófagos, representa uma importante limitação ao desenvolvimento da pecuária.

Na América Latina estima-se que as perdas sejam da ordem de 100 milhões de dólares por ano. Associado a isso, há os prejuízos indiretos que estão estimados em 32,5 milhões de dólares correspondentes à espoliação sanguínea, perda de peso, depreciação do couro, bezerros não produzidos, e outros (BELLOTO, 2001). No período de 1996-2004 foram notificados 29.969 mil casos de raiva em diferentes espécies animais no Brasil (BRASIL, 2005b).

A raiva está presente em todo o território nacional sendo confirmada, laboratorialmente, através da detecção do vírus em herbívoros e outros mamíferos infectados, podendo ser considerada endêmica em grau diferenciado de acordo com a região geopolítica (MARQUES; KOTAIT, 2001).

Com referência à raiva humana, apesar dos reconhecidos êxitos alcançados nas últimas décadas no controle da raiva em muitos países, a maioria da população mundial continua exposta ao risco de infecção rábica. Calcula-se que anualmente entre 60.000 e 70.000 pessoas venham a óbito em decorrência da doença raiva no mundo, a grande maioria no continente asiático. Estimativas indicam que, a cada 10 a 15 minutos uma pessoa morre de raiva e a cada hora, 1000 pessoas recebem tratamento pós-exposição. (BELLOTO, 2000).

Na América Latina as medidas de controle implementadas pelos países permitiram a redução da incidência da raiva no Homem para menos de 100 casos por ano (BELLOTO, 2000). Foi observado que no Brasil, no período de 1996 a 1999, a frequência de casos humanos se manteve numa média de 26 casos/ano. No ano de 2000 foram notificados 26 óbitos, 21 em 2001 e 7 em 2002. Em 2003, foram descritos 17 óbitos humanos, sendo o cão o animal agressor de maior destaque, contrastando com o ano 2004, no qual o morcego hematófago foi o responsável por 24 dos 30 casos em humanos (CASOS..., 2006).

Embora a raiva no Brasil tenha declinado em incidência na última década no que concerne ao seu ciclo urbano/canino, em virtude da implantação, em 1973, no Ministério da Saúde, do Plano Nacional de Profilaxia da Raiva (BELLOTO, 1985), o mesmo não acontece com a raiva dos herbívoros. Segundo Marques e Kotait (2001), o

número de casos de raiva em herbívoros diagnosticados laboratorialmente no Brasil, tem aumentado nos últimos anos.

No período de 1994 a 2004, no Estado do Rio de Janeiro foram detectados focos em 78 municípios dos 92 que constituem o Estado, sendo positivas 40% das amostras enviadas para análise de laboratório (KIMURA et al., 2005).

No Estado do Rio de Janeiro, há uma tendência crescente de casos da doença em herbívoros. Órgãos oficiais de pesquisa e diagnóstico do Estado também têm detectado o vírus da raiva em quirópteros, transmitindo a enfermidade para animais domésticos e silvestres (KIMURA; LIMA; SILVA, 1988; OLIVEIRA et al., 1994, ROMIJN et al., 1995; ROMIJN; KIMURA, 1996; SILVA et al., 1998; KIMURA et al., 1998; KIMURA, 2000). Na última década, a tipificação antigênica pela técnica de imunofluorescência indireta, utilizando o painel de anticorpos monoclonais, realizada no Instituto Pasteur de São Paulo em amostras isoladas, em animais de estimação do Estado do Rio de Janeiro, também identificou a variante 3, característica de *Desmodus rotundus*. (KIMURA et al., 2005).

Ainda no Estado do Rio de Janeiro, amostras de partes do SNC de bovinos com sintomatologia nervosa têm sido encaminhadas ao Laboratório de Biologia Animal (LBA) da PESAGRO-RIO para diagnóstico da raiva, apesar de histórico de vacinação contra esta virose. Parte significativa dessas amostras apresentou resultados positivos (KIMURA et al., 1998; KIMURA; LIMA; SILVA, 1988) levando a considerações sobre rompimento na cadeia de frio no transporte e acondicionamento das vacinas utilizadas. No entanto, autores como Zanetti et al. (1998); Ito et al. (2001a) e Heinemann et al. (2002), alertam para o fato de que as vacinas utilizadas no Brasil podem não estar induzindo proteção contra todas as amostras de vírus selvagens existentes.

Em São Paulo, Kotait et al. (1998) e Heinemann et al. (2002), também alertam sobre o aumento da ocorrência de casos de raiva em bovinos e em morcegos hematófagos a partir de 1980.

No Nordeste do Brasil, tem-se relato de colônias de primatas não humanos (*Callithrix jacchus*) infectados e mantendo um ciclo independente de uma variante do vírus da raiva exclusivo (FAVORETTO et al., 2001).

Segundo Bordignon et al. (2004), embora a situação da raiva humana esteja controlada na região Sul do país há muito tempo, deve-se ressaltar que, pelo fato da doença apresentar um ciclo silvestre, sua erradicação torna-se praticamente impossível e

medidas de controle devem ser constantes de modo a evitar a re-introdução do ciclo urbano da doença em áreas indenes. O mesmo autor cita como exemplo a ocorrência, após 11 anos do último caso registrado, de um novo caso de raiva felina no Estado do Rio Grande do Sul. A tipificação da amostra provou ser um caso de raiva de origem silvestre, oriundo de morcegos hematófagos (SCHAEFER et al., 2002).

Segundo Favi et al. (2002) nos últimos anos, *Desmodus rotundus* têm sido um dos principais transmissores de raiva humana nas Américas, com números de casos inferiores apenas aos causados por cães.

Convém ressaltar que assim como na região Sul do País, o Estado do Rio de Janeiro, encontra-se numa situação de raiva humana controlada, não ocorrendo óbitos humanos por essa virose desde 1985 (KIMURA et al., 2005).

Avaliações do grau de proteção conferido por vacinas contra raiva de vírus atenuado (CIUCHINI et al., 1981; OLIVEIRA et al., 2000;) e das mesmas, frente a variantes antigênicas do vírus da raiva, foram realizadas no Brasil por Cordeiro et al. (1990), Erbolato et al. (1989) e Hayashi et al. (1984). A preconização atual do uso de vacinas inativadas para bovinos sugere a avaliação destas.

Entender a evolução dos vírus da raiva é fundamental para se determinar as bases da variabilidade fenotípica e genotípica das populações virais. O aparecimento de variantes de vírus em novo hospedeiro e a aptidão para modificações têm importância quando se pesquisa a utilização de vacinas. Pois, segundo Poch et al. (1990); Tordo et al. (1993 b) e Ito et al. (2001), pequenas mutações, por vezes de um único aminoácido, em determinadas regiões, alteram a patogenicidade e a virulência.

Assim, casos como os ocorridos no Pará em 2004, com dezenas de óbitos humanos pela doença raiva, tendo como animal agressor o morcego hematófago, o ataque de raposas infectadas por vírus da raiva à população de Teresina no Piauí (ProMED , 2005a) e o óbito do adolescente em Socorro no Sergipe, vitimado pela raiva, não tendo acesso à vacinação por ter omitido dos pais que havia sido agredido por um cão (ProMED , 2005b) reforçam a premissa de que a caracterização de áreas de risco em qualquer unidade política considerada, depende fundamentalmente da capacidade de coordenação entre as diversas organizações e indivíduos dos setores públicos, privados e da comunidade em geral para estabelecer e operacionalizar um sistema capaz de detectar precocemente a ocorrência da enfermidade (BELLOTO, 2000).

Devido à gravidade da doença, evoluindo sempre para o êxito letal, a

possibilidade de um diagnóstico falso-negativo deve ser reduzida tanto quanto possível. Para isso, a maioria dos laboratórios utiliza as provas clássicas: a imunofluorescência direta (IFD) como teste principal e a inoculação intracerebral em camundongos (PB) como teste complementar (ACHA; SZYFRES, 1986).

A técnica mais amplamente utilizada para o diagnóstico da raiva é a IFD, recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). A prova de IFD apresenta resultados confiáveis em poucas horas, quando realizados em materiais frescos, em 95-99% dos casos (BRASIL, 2005a). Segundo Silva; Silva e Guimarães (1973), a técnica de imunofluorescência reúne indiscutivelmente as vantagens de rapidez e especificidade, quando se tem em foco o diagnóstico.

A PB detecta a infecciosidade da amostra, com inoculação da suspensão em sistemas biológicos permitindo o isolamento do agente. É utilizada concomitantemente com a prova de IFD (KOPROWSKI, 1996).

Genericamente falando, o diagnóstico de doenças teve um grande avanço nos últimos anos com a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). A reação de PCR permite que uma dada seqüência de ácido nucléico (DNA ou então um RNA que deve ser previamente copiado numa molécula de DNA, pela técnica de RT-PCR) seja amplificada milhares de vezes mediante o uso de reagentes adequados; pequenas seqüências de DNA (oligonucleotídeos) complementares ao DNA-alvo que se quer amplificar, uma vez hibridadas com a seqüência alvo através da complementaridade do pareamento de bases do DNA são copiadas milhares de vezes com a enzima DNA polimerase. Após a execução de vários ciclos de amplificação a elevadas temperaturas, o produto final obtido é a molécula-alvo amplificada milhares de vezes, permitindo sua detecção e caracterização (GOLDENBERG, 2002). Não é necessário amplificar o genoma inteiro, bastando conhecer uma parte da seqüência de nucleotídeos, de forma a permitir sintetizar dois “primers” (iniciadores) representando as extremidades da região a ser amplificada (FENNER et al., 1993).

Em relação à raiva, esses avanços tecnológicos das ciências biológicas, notadamente a biologia molecular e a imunologia, permitiram aprofundar os conhecimentos sobre o vírus, a patogenia e a imunoprofilaxia da infecção, assim como o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos (GERMANO, 1994).

Apesar da técnica de PCR requerer implantação e manutenção mais caras do que as técnicas clássicas e de propiciar risco de contaminação cruzada por outros ácidos nucléicos virais diferentes do que se quer pesquisar, devido a excessiva manipulação dos tubos (REUBEL; STUDDERT,1998), as pesquisas efetuadas com base na biologia molecular têm sido de relevante importância, não só para complementar os conhecimentos sobre a patogênese da infecção da raiva e a imunologia, como também, para a determinação da variabilidade genética do vírus da raiva, entre amostras, e para o esclarecimento dos mecanismos de replicação e transmissão viral (GERMANO, 1994).

A PCR associada à transcrição reversa (RT-PCR), representou um grande avanço no diagnóstico e na tipificação de amostras de Lyssavirus (SACRAMENTO; BOURHY; TORDO,1991; BOURHY et al., 1993a; GOULD et al., 1998). Sacramento, Bourhy e Tordo (1991), desenvolveram o primeiro protocolo de RT-PCR para o vírus da raiva e, a partir daí, a evolução desta técnica tem sido marcante.

O desenvolvimento e utilização de técnicas de biologia molecular aplicadas à Vigilância Epidemiológica abrem um novo capítulo no conhecimento da história natural da raiva, por permitir a associação das variantes circulantes de vírus da raiva com as espécies transmissoras, facilitando sobremaneira a análise epidemiológica e a tomada de decisão sobre medidas de prevenção e controle (BELLOTO, 2000).

Considerando-se a importância da vacinação dos animais domésticos, como medida preventiva das mais relevantes para o controle da raiva urbana e rural (KOTAIT et al., 1998; KAPLAN; TURNER; WARREL, 1986), aliada aos conhecimentos atuais da ocorrência de variantes antigênicas dos vírus da raiva na natureza (GERMANO et al., 1982; SACRAMENTO; BOURHY; TORDO, 1991; MORIMOTO et al., 1998; KISSI et al., 1999; FAVORETO et al., 2001 e ITO et al., 2001a, 2001b), pesquisas nessa área poderão levar, possivelmente, a melhores estratégias de controle e erradicação dessa importante zoonose.

Assim sendo, a comparação entre as técnicas clássicas para o diagnóstico da raiva (imunofluorescência direta e prova biológica) com técnicas baseadas em biologia molecular de ácidos nucléicos (por exemplo, RT-PCR), sobretudo em amostras em autólise e decomposição, um achado comum na situação das redes de laboratórios no Brasil em função das distâncias entre o local de colheita e de análise das amostras sem, muitas vezes, a conservação adequada das mesmas, permitirá que se avalie a aplicabilidade das últimas para o diagnóstico da raiva.

Além disso, a geração de dados moleculares derivados de sequenciamento de DNA a partir de amostras de vírus da raiva detectadas em animais domésticos e silvestres em áreas para as quais tais dados são ainda escassos, como é o caso da área do Estado do Rio de Janeiro em estudo, permitirá um melhor entendimento da epidemiologia da raiva não apenas nesta região, mas também no território nacional, um passo fundamental para o delineamento de medidas de controle da doença sobre as populações animais e, sobretudo, para a Saúde Pública.

2-OBJETIVOS:

1) Comparar as técnicas clássicas de IFD e PB com RT-PCR para o gene N do vírus da raiva com finalidade de aplicação no diagnóstico de casos de raiva.

2) Estudar a diversidade molecular das amostras de vírus da raiva provenientes de animais domésticos e silvestres atualmente presentes nas diferentes regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste), comparando-as entre si, com amostras de referência e fixas e entre amostras originárias de um município do Estado do Rio de Janeiro (Porciúncula), com base em sequenciamento parcial do gene codificador da nucleoproteína.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Vírus de referência

As amostras virais utilizadas no presente estudo foram: Challenge Standard Virus (CVS 31.2), mantida por passagens em cérebros de camundongos, e Pasteur Vírus (PV), mantida por sucessivas passagens em cultura de células BHK-21.

3.2- Amostras de campo

Foram utilizadas 32 amostras de partes do SNC de mamíferos domésticos apresentando quadro neurológico sugestivo da raiva, encaminhadas para diagnóstico desta virose entre os anos 1985 e 2004, oriundas de diferentes municípios do Brasil (**Quadro 1, Figura 1**).

A procedência das amostras estudadas inclui: o Laboratório de Biologia Animal da PESAGRO-RIO, o Instituto Parreiras Horta de Aracajú - Sergipe, o Laboratório de Apoio Animal – LAPA / Belém – Pará, o Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman - Estado do Rio de Janeiro, o Centro de Diagnóstico “Marcos Enriette” - Paraná e o Laboratório da Secretaria de Saúde do Ceará.

A maioria das amostras (19) foram oriundas do LBA da PESAGRO-RIO onde foram processados os diagnósticos pelas provas clássicas. As amostras enviadas pelos demais laboratórios vieram com diagnósticos positivos para raiva atestados. As amostras 24, 27 e 28 que chegaram em estado de putrefação foram retestadas, no Laboratório de Imunologia do INCQS.

QUADRO 1- Amostras de partes do SNC analisadas no presente estudo, com suas respectivas passagens em camundongos, hospedeiros de origem, ano de coleta e origem geográfica.

N ^o de registro	Hospedeiro de origem	Passagem	Ano	Origem geográfica
03	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
75	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
132	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
141	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
214	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
224	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
7	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
8	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
9	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
10	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
11	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
12	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
13	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
14	Bovino	original	2003	Porciúncula-RJ
38	Bovino	original	2002	Miracema-RJ
16	Canino	original	1985	N.Iguaçu-RJ
1266	Bovino	3#	2003	Arapoti-PR
1318	Bovino	3#	2003	Dr.Ulisses-PR
1226	Bovino	3#	2003	Cerro Azul-PR
3399	Quiróptero	3#	2002	Jaquariaíva-PR
1238	Bovino	3#	2003	Camapuã-MS
583	Sagüi	3#	2003	Ceará
92	Humano	desconhecida	1992	Goiânia-GO
24*	Raposa	original	2004	Sossego-PB
01	Bovino	original	2003	Palma -TO
02	Bovino	original	2003	Palma-TO
27*	Canino	original	2003	São Cristóvão-SE
28*	Canino	original	2002	N.S. das Dores-SE
29	Bovino	original	2002	Miracema-RJ
30	Bovino	original	2003	Valença-RJ
31	Bovino	original	2003	Valença-RJ
32	Bovino	original	2003	Valença-RJ

* Materiais em putrefação.

Passagens em camundongos desmamados

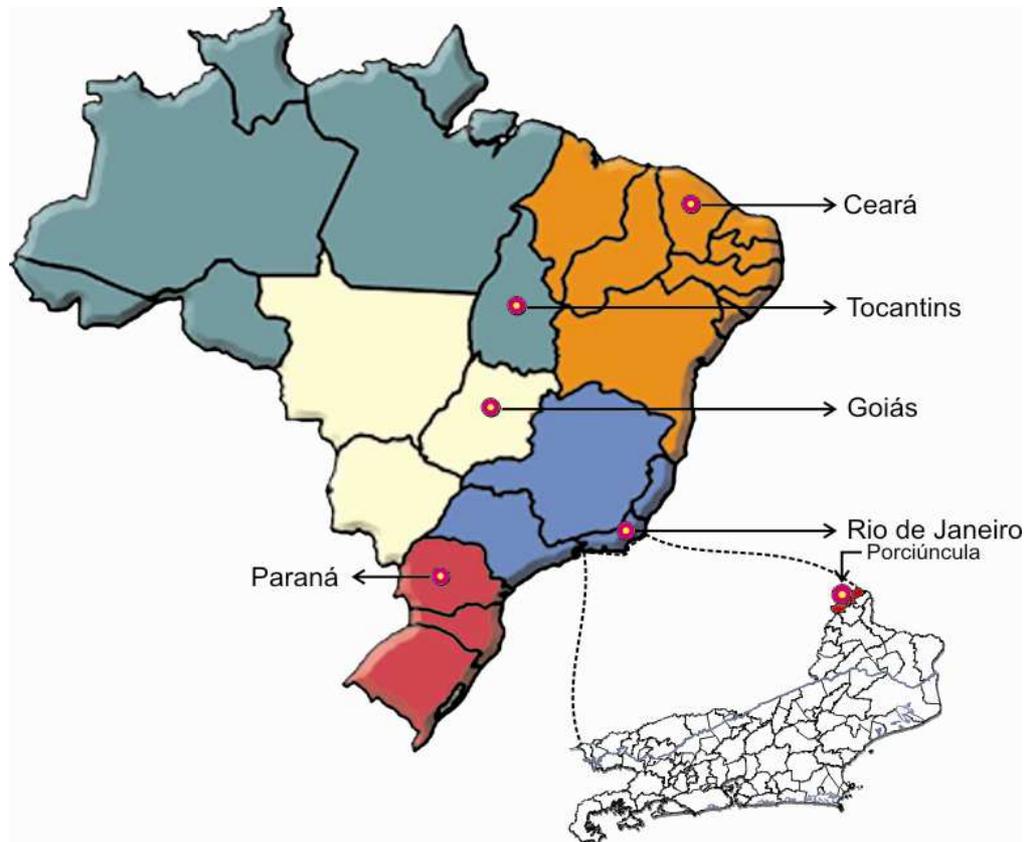


FIGURA 1 - Mapas do Brasil e do Estado do Rio de Janeiro, indicando os estados e municípios de origem das amostras utilizadas para a análise filogenética.

3.3-Prova de Imunofluorescência Direta (IFD)

Essa etapa foi realizada na área de Virologia do LBA da PESAGRO-RIO e na Área de Imunologia do INCQS-FIOCRUZ.

Lâminas confeccionadas com impressão dos fragmentos a serem examinados foram processadas conforme Dean et al. (1996), com modificações na fixação. A visualização foi realizada em microscópio de imunofluorescência.

O conjugado fluorescente policlonal marcado com isotiocianato de fluoresceína utilizado foi cedido pelo Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman/Rio de Janeiro.

Para cada amostra foram confeccionadas quatro lâminas, seguindo os passos abaixo:

a) Fixação das impressões pelo calor (bico de Bunsen).

b) Contorno das impressões com esmalte, com a finalidade de conter o conjugado e orientar a visualização ao microscópio.

c) Aplicação do conjugado constituído pelo soro anti-rábico hiperimune, marcado com isotiocianato de fluoresceína, a saber:

Impressão A (próximo à etiqueta de identificação):

Conjugado + CN (cérebro de camundongo normal, macerado e diluído com solução salina tamponada fosfatada.(PBS).

Impressão B (contrário à etiqueta):

Conjugado + CVS (cérebro de camundongo inoculado com vírus fixo, amostra CVS, diluído também em PBS, pH 8.0).

d) Acondicionamento das lâminas em câmara úmida à 37 °C por 30 minutos.

e) Lavagem das lâminas dentro de um recipiente com PBS, pH 7.2, durante 15 minutos. Esta lavagem foi realizada três vezes.

f) Execução da 4ª lavagem da mesma forma, utilizando-se água destilada e escorrendo após 5 minutos.

g) Montagem da lâmina com lamínula e glicerina fosfatada.

h) Leitura das lâminas em microscópio de imunofluorescência marca Zeiss, com objetiva de imersão 40 x.

i) Interpretação da IFD:

Impressão A – aplicação de conjugado com CN (cérebro de camundongo normal), estando o conjugado livre para unir-se ao antígeno da raiva caso esteja presente na impressão. O resultado positivo é caracterizado pelo aparecimento de inclusões fluorescentes ou fino pó de cor verde.

Impressão B – aplicação de conjugado com CVS, permitindo ao conjugado ser adsorvido e não estar disponível para unir-se ao antígeno da raiva presente na impressão. Materiais fluorescentes nesta impressão não devem ser observados.

Paralelamente é feita uma lâmina com material sabidamente positivo que passa por todo o processo do material suspeito para servir de controle. Sua positividade na impressão A e sua negatividade na impressão B são os parâmetros para a leitura do material suspeito.

3.4) Prova Biológica (PB)

Essa etapa foi realizada na área de Virologia do LBA. da PESAGRO-RIO e na Área de Imunologia do INCQS.

A PB seguiu a metodologia descrita por Koprowski (1996). As amostras, após trituração em gral, foram diluídas a 10% em PBS contendo penicilina G potássica e sulfato de estreptomicina e centrifugadas por 5 minutos à 600 x g. O sobrenadante foi coletado como inóculo.

Camundongos albinos suíços com 21 dias de idade foram inoculados com 0,03 mL do sobrenadante, por via intracerebral, e observados diariamente por um período de até 30 dias. Foram utilizados 10 animais por amostra. Os animais que vieram a óbito por apresentarem sintomatologia nervosa, a partir de 5 dias pós inoculação foram submetidos ao teste de IFD para confirmação final.(conforme descrito no item 3.3)

A manutenção e manejo dos animais experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (2004).

3.5-Reação de transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para o gene N.

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur de São Paulo.

A extração de RNA das amostras foi realizada a partir do sobrenadante de suspensão de cérebro a 10% , de acordo com o método TRIZOL[®] (InvitrogenTM) seguindo as instruções do fabricante.

Sete microlitros de cada RNA foram adicionados ao mix de transcrição reversa (síntese de cDNA) contendo 1 x First Strand Buffer (InvitrogenTM), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/ μ L de cada primer (504 e 304) (**Quadro 2 , Figura 2**) e 200U M-MLV Reverse Transcriptase (InvitrogenTM) para uma reação final de 20 μ L, realizada a 42°C/60 min.

Dez microlitros de cada respectivo cDNA foram adicionados ao mix de PCR contendo 1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/ μ L de cada primer (504 e 304), 1,5mM MgCl₂, 25 μ L água ultra-pura e 1,25U Taq DNA polymerase (InvitrogenTM) para uma reação final de 50 μ L e submetidos a uma desnaturação inicial de 94 °C/2 s., seguidos de 40 ciclos de 94 °C /30 seg, 37 °C /30 s. e 72 °C /1,5 min, finalizando com uma extensão final de 72°C/7 min. Como controle positivo foi utilizado CVS e como negativo, cérebro normal de camundongo (CN).

Todos os produtos da RT-PCR foram analisados em gel de agarose a 1 % corado com brometo de etídio a 0,5 μ g/ mL (**Figura 3**).

QUADRO 2– Sequência dos “primers” utilizados para amplificação de um segmento de 248 pb do gene N do vírus da raiva.

PRIMER	SEQUÊNCIA	Posição no genoma do PV	Sentido de orientação
504	5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3'	1287-1317	Senso (Orciari <i>et al.</i> , 2001)
304	5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3'	1514-1533	Anti-senso (Orciari <i>et al.</i> , 2001)
Fragmento amplificado=248pb			

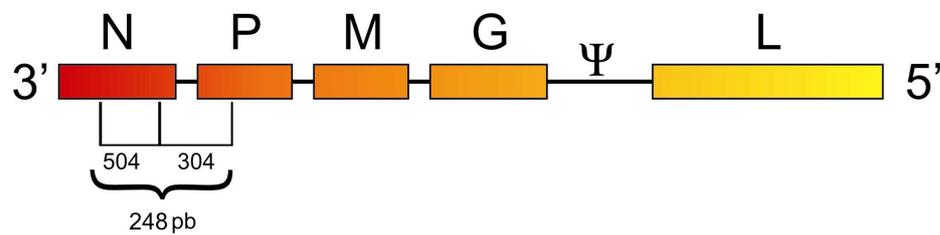


FIGURA 2- Esquema do genoma do vírus da raiva com a localização dos sítios de ligação dos iniciadores e o respectivo tamanho dos produtos da RT-PCR.

Fonte: Adaptado de www.sciencephoto.com.br

3.6-Sequenciamento de DNA e análise filogenética

Essa etapa foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano-USP e na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

Os fragmentos amplificados na RT-PCR (item 3.5) foram purificados com o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences™) e submetidos a reação de sequenciamento de DNA bi-direcional com DYEnamic ET 115 Dye Terminator (Amersham Biosciences™) de acordo com as instruções do fabricante, sendo as seqüências resolvidas em seqüenciador automático MEGABACE 1000 (Amersham Biosciences™).

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso de cada amostra foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciada. A seqüência consenso final de cada amostra foi obtida a partir das seqüências senso e o reverso-complemento das anti-senso de cada amostra alinhadas pelo método CLUSTAL/W com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> para confirmação do seqüenciamento.

A seguir, as seqüências de nucleotídeos consensuais de cada amostra foram alinhadas pelo método CLUSTAL/W com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999) juntamente com seqüências homólogas referentes a vírus da raiva relacionados a *Desmodus rotundus*, carnívoros domésticos e silvestres, primatas e amostras fixas recuperadas do GenBank, obtendo-se a árvore filogenética de distância com o algoritmo Neighbor-Joining com o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e 1000 repetições de bootstrap com o programa MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2004). A árvore filogenética foi aqui representada de maneira não enraizada, uma vez que não é foco deste estudo fazer análise evolutiva, mas apenas classificar as amostras estudadas. As identidades médias de nucleotídeos entre as amostras foram calculadas com o Excel a partir das identidades obtidas no programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Os números de acesso ao Genbank encontram-se na figura da árvore filogenética (**Figura 5**).

4 -RESULTADOS

4.1 IFD, PB e RT-PCR

Considerando as análises de cada amostra realizada nos laboratórios de origem, houve 100% de correlação entre as técnicas aplicadas nas 32 amostras estudadas, sendo que 28 amostras demonstraram positividade nas três técnicas aplicadas e quatro amostras enviadas para o diagnóstico da raiva, provenientes de animais que apresentavam sintomatologia nervosa, demonstraram negatividade nas provas de IFD, PB e RT-PCR.

Estes resultados encontram-se sumarizados no **Quadro 3**.

A **figura 3**, mostra os resultados da amplificação do cDNA dos vírus da raiva de algumas amostras utilizadas no presente estudo.

Por outro lado, considerando os resultados do reteste realizado nas amostras 24, 27 e 28 (todas em estado de putrefação), na prova de IFD foram negativas as amostras 27 e 28 e positiva a amostra 24, sendo que estas três amostras não foram submetidas à prova biológica devido à contaminação bacteriana.

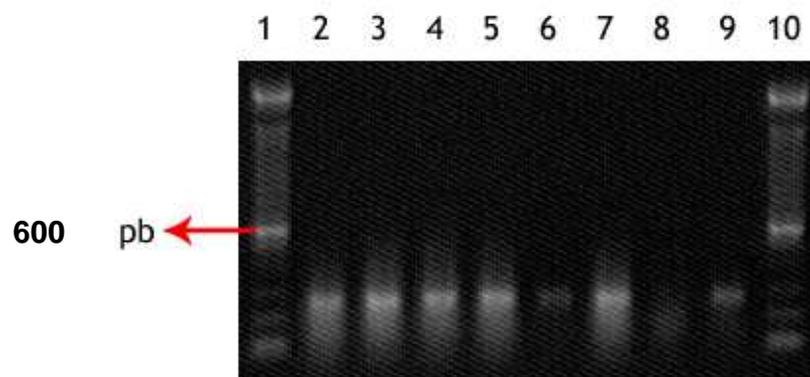


FIGURA 3 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, revelando os produtos de amplificação do fragmento de 249 pb referente à região que contem a nucleoproteína viral. Canaletas 1 e 10 - padrão de tamanho molecular; Canaleta 2 –bovino de Arapoti - PR; Canaleta 3- bovino de Dr. Ulisses-PR ; Canaleta 4- bovino de Porciúncula-RJ;Canaleta 5-bovino de Cerro Azul-PR; Canaleta 6- sagüi do Ceará; Canaleta 7- bovino de Camapuã-MS; Canaleta 8 - controle negativo (CN); Canaleta 9- controle positivo (CVS).

4.2- SEQÜENCIAMENTO e ANÁLISE FILOGENÉTICA

Treze amostras com resultados positivos nas três provas testadas foram selecionadas para o sequenciamento e análise filogenética (**Figuras 5, Quadro 4**). A triagem foi feita em função de concentração de DNA. Apesar das demais amostras estudadas terem resultados positivos na RT-PCR, algumas apresentavam concentração insuficiente de DNA. Amostras não seqüenciadas no presente estudo serão seqüenciadas em estudos futuros para complementar a pesquisa.

A **figura 4** apresenta o resultado da purificação do DNA dos vírus da raiva do gel de agarose de algumas amostras utilizadas no presente estudo.

O sequenciamento do fragmento de 248 pares de bases resultou em seqüências de 164 a 165 nucleotídeos. Quando as mesmas foram submetidas ao BLASTn, apenas seqüências referentes ao vírus da raiva foram obtidas como homólogas às aqui estudadas.

Nestas seqüências finais, foram mantidos apenas os 157 nucleotídeos referentes ao gene N, sendo descartados aqueles relacionados ao gene P.

O padrão de agregação obtido na árvore filogenética, no presente estudo, resultou na formação dos principais grupos esperados de amostras do vírus da raiva, ou seja, variante antigênica 2, 3, amostras fixas e variante de vírus da raiva de sagüis.

A árvore filogenética obtida para estas seqüências juntamente com seqüências homologas recuperadas do GenBank demonstrou o agrupamento das seqüências analisadas em quatro clusters principais (**Figura 5**): cluster 1, contendo as amostras de vírus da raiva relacionadas ao morcego hematófago *Desmodus rotundus* variante antigênica 3, dentro do qual se agregaram as amostras 224, 214, 75, 141, 132, 03, 38, 3399, 1266, 01 e 02 integrantes do presente estudo; cluster 2, contendo amostras de vírus da raiva relacionadas a sagüis do Nordeste brasileiro, ao qual se agregou a amostra 583 do presente estudo; cluster 3, onde se agregaram as amostras fixas SAD-B19 e PV de vírus da raiva e cluster 4, no qual se agregaram amostras de vírus da raiva relacionadas a carnívoros brasileiros silvestres e domésticos (variante antigênica 2), no

qual se encontra a amostra 92 do presente estudo, isolada de um paciente humano em 1992.

Dentro do cluster 1, as amostras 224, 214, 75, 141, 132, 03 e 38, todas isoladas de bovinos criados em Porciúncula, RJ, resultaram em um subcluster exclusivo, denominado de 1A sustentado por um valor de bootstrap de 64, com uma identidade média intracluster de 99,8%. Um segundo subcluster, denominado de 1B, com uma identidade média intracluster de 100% e um valor de bootstrap de 95%, resultou do agrupamento das amostras 3399 e 1266, isoladas respectivamente de *Desmodus rotundus* e de um bovino, originários do Estado do Paraná(Região Sul).

As amostras 01 e 02, oriundas de bovinos do Estado de Tocantins, agregaram de modo disperso entre amostras do Centro-Oeste brasileiro, uma região contígua a este Estado da Região Norte, com uma identidade média de nucleotídeos de 100% entre si e de 97,23% com as amostras do cluster 1 excetuando-se os subclusters 1 A e 1B (**Figura 5**).

O cluster 2, ao qual agregou a amostra 583, proveniente de sagüi, apresentou identidade média de nucleotídeos de 98,45%, com bootstrap de 100%.

O cluster 4 pôde ser subdividido em sub-cluster 4A, com amostras de vírus da raiva isoladas de canídeos silvestres do Nordeste brasileiro (identidade média de nucleotídeos de 95,31%), sub-cluster 4B, isoladas de cães e gatos do Nordeste brasileiro (identidade média de nucleotídeos intra-cluster de 100%) e sub-cluster 4C, contendo amostras de vírus da raiva relacionadas a variante antigênica 2 originárias do Centro-Oeste brasileiro, incluindo a amostra 92 do presente estudo, com identidade média de nucleotídeos de 98,9%. As identidades de nucleotídeos entre os clusters e subclusters encontram-se na **Tabela 1**.

Como o observado para as amostras do cluster 1, as identidades médias de nucleotídeos intra-cluster foram superiores às identidades entre os diferentes subclusters (**Tabela 1**).

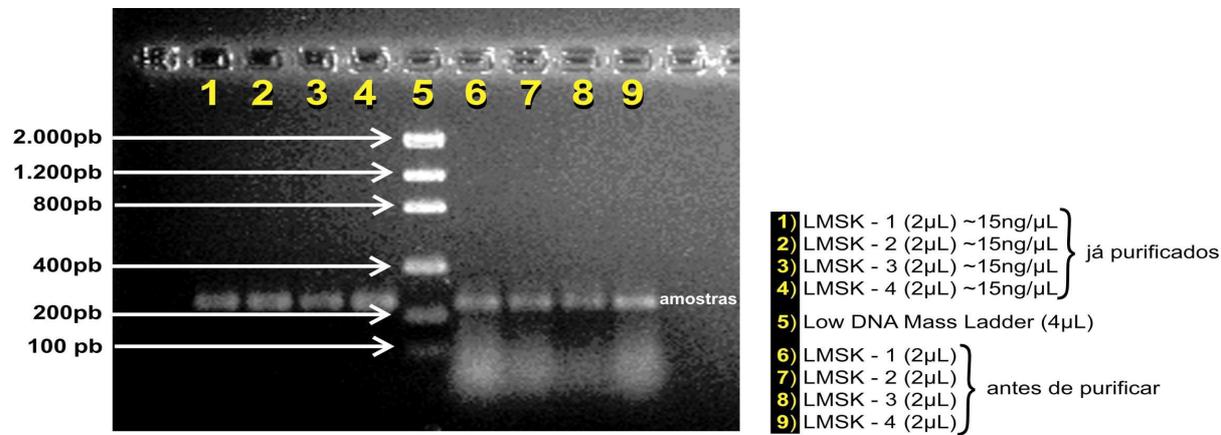
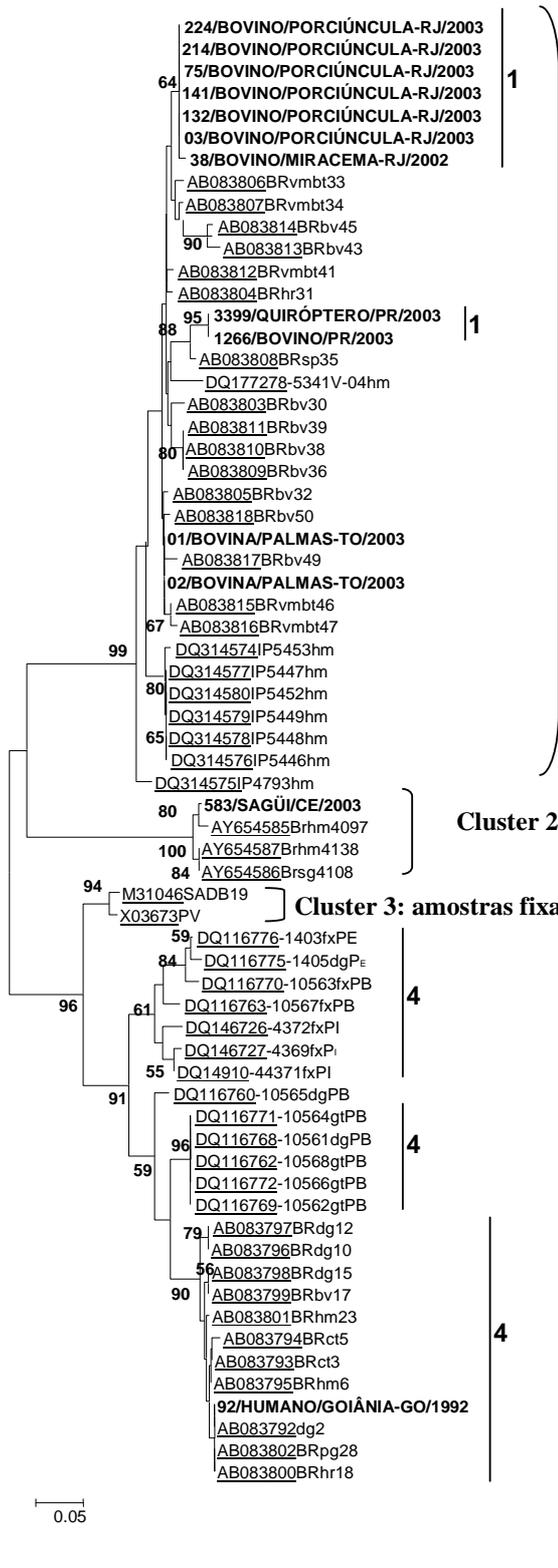


FIGURA 4-Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, a 0,5µg/ mL revelando os produtos de RT-PCR após a purificação.

QUADRO 3: Resultados das provas de Imunofluorescência direta, Prova biológica, Reação em cadeia pela polimerase, e Sequenciamento.

Número de registro	Hospedeiro de origem	Resultado IFD	Resultado PB	Resultado RT-PCR	Resultado sequenciamento
03	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
75	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
132	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
141	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
214	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
224	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
7	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
8	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
9	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
10	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
11	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
12	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
13	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
14	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
38	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
16	Canino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
1266	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
1318	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
1226	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
3399	Quiróptero	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
1238	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
583	Sagüi	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
92	Humano	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
24	Raposa	Positiva	Positiva	Positiva	NT
01	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
02	Bovino	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
27	Canino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
28	Canino	Positiva	Positiva	Positiva	NT
29	Bovino	Negativa	Negativa	Negativa	NT
30	Bovino	Negativa	Negativa	Negativa	NT
31	Bovino	Negativa	Negativa	Negativa	NT
32	Bovino	Negativa	Negativa	Negativa	NT

NT: Não testadas



Cluster 1: amostras relacionadas a *Desmodus rotundus*

Cluster 2: amostras relacionadas a sagüis

Cluster 3: amostras fixas

Cluster 4: amostras relacionadas a canídeos

FIGURA 5– Árvore filogenética de distância para uma região de alinhamento de 157 nucleotídeos da porção 3'terminal do gene N do vírus da raiva. As amostras integrantes do presente estudo encontram-se em negrito identificadas pelo nome/espécie de origem/região de origem/ano de isolamento, enquanto que as amostras do Genbank estão apresentadas por seus números de acesso . **Cluster 1**: amostras relacionadas ao morcego hematófago *Desmodus rotundus*/ variante antigênica 3; **Cluster 2**: amostras relacionadas a sagüis; **Cluster 3**: amostras fixas de vírus da raiva; **Cluster 4**: amostras relacionadas a carnívoros domésticos e silvestres brasileiros (variante antigênica 2). Os números acima de cada nó representam os valores de bootstrap acima de 50% para 1000 repetições; a barra indica o número de substituições por sítio de nucleotídeos no alinhamento.

TABELA 1 – Identidade de nucleotídeos para as seqüências apresentadas.

Grupo de amostras comparadas	Identidade média de nucleotídeos (%)
Cluster 1	95,8
1A	99,8
1B	100
Amostra 01 x Amostra 02	100
Cluster 1 exceto 1A, 1B e amostras 01 e 02	95,47
1A x 1B	94,3
1A x Cluster 1 exceto 1A, 1B e amostras 01 e 02	95,98
1A x amostras 01 e 02	94,3
1B x Cluster 1 exceto 1A, 1B e amostras 01 e 02	93,48
1B x amostras 01 e 02	94,9
Amostras 01 e 02 x Cluster 1 exceto 1A e 1B	97,23
Cluster 2	98,45
Amostra 583 x Cluster 2	98,23
Cluster 3	98
Cluster 4	93,61
4A	95,31
4B	100
4C	98,9
4A x 4B	91,21
4A x 4C	90,01
4B x 4C	93,42
Cluster 1 x Cluster 2	73,67
Cluster 1 x Cluster 3	76,45
Cluster 1 x Cluster 4	71,57
Cluster 2 x Cluster 3	72,41
Cluster 2 x Cluster 4	73,4
Cluster 3 x Cluster 4	87,75

QUADRO 4- Amostras seqüenciadas, por hospedeiro de origem, ano de isolamento, origem geográfica e número de acesso no GenBank.

Número de registro	Espécie/ano isolamento	Origem geográfica	Nº de acesso no GenBank
38	Bovina/2002	Rio de Janeiro	DQ640242
3399	Morcego hematófago/2003	Paraná	DQ640243
92	Humano/1992	Goiás	DQ640244
1266	Bovina/2003	Paraná	DQ640245
214	Bovina/2003	Rio de Janeiro	DQ640246
75	Bovina/2003	Rio de Janeiro	DQ640247
132	Bovina/2003	Rio de Janeiro	DQ640248
141	Bovina/2003	Rio de Janeiro	DQ640249
1	Bovina/2003	Tocantins	DQ640250
2	Bovina/2003	Tocantins	DQ640251
3	Bovina/2003	Rio de Janeiro	DQ640252
583	Sagüi/2003	Ceará	DQ640253
224	Bovina/2003	Rio de Janeiro	DQ640254

5-DISCUSSÃO

No presente estudo foi encontrada uma concordância de 100% nos resultados obtidos pela RT-PCR e pelas técnicas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos para diagnóstico do vírus da raiva.

Segundo Rupprecht, Halon e Hemachudha, (2002) e Brasil-dos-Anjos (2003), as técnicas moleculares têm se mostrado eficientes se usadas em conjunto com outras técnicas já estabelecidas, como a imunofluorescência direta, podendo reduzir o número de diagnósticos falso-negativos, aumentando a sensibilidade e especificidade dos testes.

Apesar da OMS não preconizar a RT-PCR como instrumento para o diagnóstico da raiva, diversos autores em todo o mundo afirmam a sua alta sensibilidade (SACRAMENTO; BOURHY; TORDO, 1991; KAMOLVARIN et al., 1993; BOURHY; KISSI; TORDO, 1993a, 1993b; SMITH et al., 1993; MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKY, 1996; TORDO, 1996; HEATON, 1997). Nos últimos anos a técnica começou a ser utilizada no Brasil, com fins principalmente de pesquisa genética (ITO et al., 2001a, 2001b; SOARES, et al., 2002; BRASIL-DOS-ANJOS, 2003; ROMIJN et al., 2003; PIERI, 2003; BORDIGNON et al., 2004, HEINEMANN et al., 2002; DANTAS JUNIOR et al., 2004; CARNIELI et al., 2005; SCHAEFER et al., 2005; KOBAYASHI, et al., 2005).

Já em 1991, Sacramento; Bourhy e Tordo (1991), encontraram 100% de concordância entre os resultados dessas mesmas técnicas utilizadas no presente estudo. Mais recentemente, Soares et al. (2002) apresentaram conclusões idênticas.

Romijn et al. (2003) trabalhando com amostras positivas pelas técnicas tradicionais (encéfalos coletados de herbívoros suspeitos de estarem acometidos de raiva e de quirópteros de regiões com focos recentes de raiva enviados para laboratório), observaram que essas também se apresentaram positivas pela técnica molecular. Nenhuma amostra de bovino suspeito que se apresentou negativa pelas técnicas tradicionais, apresentou-se positiva pela RT-PCR, no referido estudo, corroborando com os resultados aqui apresentados.

Dantas Junior et al. (2004), trabalhando com 50 amostras de herbívoros oriundas do Estado do Rio de Janeiro, também encontraram 100% de correlação entre a IFD, PB e a RT-PCR, concordante com os resultados aqui apresentados.

Ito et al. (2001b) analisaram 49 amostras de diferentes animais oriundos da Região Sul do Estado de São Paulo e Goiânia. Destas, 5 eram de morcegos hematófagos, 14 de bovinos, 12 de caninos, 11 de felinos, 2 de eqüinos, 1 de suino e 3 de humanos. A RT-PCR conseguiu detectar o vírus da raiva em todas as amostras, apresentando 100% de concordância com os resultados das técnicas de imunofluorescência e inoculação intracerebral em camundongos, testadas paralelamente.

Tordo, Sacramento e Bourhy (1996), sugerem o método de RT-PCR para o diagnóstico laboratorial de rotina, evidenciando a importância desta técnica para estudos de epidemiologia molecular. Em acordo com Tordo, os autores do presente estudo demonstraram que através desta técnica foram obtidos resultados idênticos àqueles obtidos por técnicas de diagnóstico de rotina (IFD, PB), provando que pode ser esta utilizada para fins de diagnóstico.

Soares et al. (2002), também afirmaram que a RT-PCR pode ser utilizada no diagnóstico da raiva, em casos de IFD negativa e urgência no diagnóstico, quando as amostras foram estocadas inadequadamente, gerando autólise, ou quando se tem pouco material, como no caso de pesquisas com animais de laboratório ou de pequeno porte (morcegos). Em seus estudos também encontraram concordância de 100% entre as técnicas tradicionais e moleculares, analisando 42 amostras clínicas.

Segundo estudos de Brasil-Dos-Anjos (2003), a técnica de RT-PCR aplicada em 81 amostras de tecido cerebral de animais suspeitos de óbito por raiva, mostrou sensibilidade de 95,5% e especificidade de 94,8%, quando comparada com as técnicas clássicas. O mesmo autor afirma ainda, que a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos virais, através de RT-PCR possuem sensibilidade comparável à propagação do vírus em culturas celulares, tendo a vantagem de serem mais rápidas e não dependerem da viabilidade do vírus, oferecendo riscos menores, o que é compatível com relação a normas de biossegurança.

Heaton, McElhinney e Lowings (1999) sugerem a técnica de RT-PCR para uma rápida identificação da doença, principalmente em casos humanos, nos quais se pode assegurar o tratamento pós-exposição adequado ao doente e a todos que tiveram contato com o mesmo. Utilizando esta técnica, conseguiram obter os resultados em 5 horas. Além disso, a aplicação do seqüenciamento de DNA automatizado dos produtos resultantes possibilitou uma caracterização dos diferentes genótipos do Gênero

Lyssavirus. Em estudos de Brasil-Dos-Anjos (2003), a realização de todas as etapas da reação de RT-PCR totalizou -se em torno de 8 horas.

Todos os autores citados, assim como os do presente estudo, enfocaram a nucleoproteína como opção para detecção por RT-PCR em seus estudos, por essa ser considerada uma região gênica muito conservada, facilitando o desenho de primers aptos para amplificação de inúmeras variantes virais (CREPIN; AUDRY; ROTIVEL, 1998; KISSI; TORDO; BOURHY, 1995).

Comparações da PCR com a IFD, avaliando principalmente amostras em decomposição, demonstraram uma menor sensibilidade da imunofluorescência direta. A RT-PCR demonstrou ser capaz de amplificar a seqüência gênica alvo de amostras de tecido cerebral expostas por até 96 horas à temperatura ambiente (SOARES et al., 2002).

Estudos de David et al. (2002) relataram que em amostras degradadas até 36 dias à temperatura de 37°C, a sensibilidade de detecção da RT-PCR foi maior quando comparada às técnicas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral. Vários outros autores compararam os resultados da RT-PCR com a imunofluorescência direta em amostras em decomposição, avaliando a queda de sensibilidade relacionada com o tempo de deterioração do tecido cerebral (KAMOLVARIN et al., 1993; HEATON, 1997; WHITBY; JOHNSTONE; SILLERO-ZUBIRI, 1997).

Até mesmo em ocasiões em que a suspeita de raiva foi aventada muito tempo após o óbito humano, a técnica de RT-PCR é de fundamental importância, para confirmar a suspeita e identificar a fonte de infecção, através de estudos genéticos (OLIVEIRA et al., 2006).

No presente estudo, as amostras 24, 27 e 28, provenientes da Paraíba e de Sergipe, até serem enviados para fazerem parte desse estudo estavam perfeitamente estocados em freezer a -20 C, no Instituto Parreiras Horta, em Aracajú, onde apresentaram resultados positivos na IFD e PB. Problemas operacionais ocorridos no aeroporto acarretaram demora na liberação dos materiais, ocasionando estado avançado de putrefação nestas amostras. Sendo assim, no reteste realizado em nossos estudos, os materiais 27 e 28 apresentaram resultados negativos na IFD e não foi possível proceder à inoculação em camundongos. A amostra 24, apesar de apresentar IFD positiva, também não pôde ser inoculada para a prova biológica. No entanto, a RT - PCR apresentou-se positiva nas 3 amostras .

Apesar do número reduzido de amostras em putrefação analisadas em nosso estudo, considera-se o resultado indicativo de que a RT-PCR pode ser utilizada em amostras putrefeitas, corroborando com os resultados apresentados pelos diversos autores citados.

Ito et al. (2001 a), analisando amostras brasileiras, utilizando técnicas moleculares, demonstraram que os vírus isolados foram separados em dois grupos de reservatórios: cães e morcegos hematófagos. Todos os vírus cães-relacionados mostraram homologia de 99%. Os vírus morcego-relacionados mostraram homologia de 96,6% e puderam ser divididos em dois subgrupos correspondentes as áreas onde os vírus foram isolados.

Estudos de Ito et al. (2003) também com amostras brasileiras indicam que o ciclo da raiva no Brasil é bastante complexo e apresenta sobreposição dos ciclos urbano e silvestre em muitas áreas do país.

O padrão de agregação obtido na árvore filogenética, no presente estudo, resultou na formação dos principais grupos esperados de amostras do vírus da raiva, ou seja, variante antigênica 2, 3, amostras fixas e variante de vírus da raiva de sagüis (FAVORETTO et al., 2001; CARNIELI et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2005), o que valida tanto a área do genoma do vírus da raiva como o método e o algoritmo utilizados para a reconstrução filogenética, o que está de acordo com os resultados de Carnieli et al. (2006), os quais, a partir da mesma região do gene N aqui analisada, obtiveram padrão similar de segregação.

Todas as amostras colhidas no Estado do Rio de Janeiro se agregaram em um cluster único (1A), sustentado por um valor de bootstrap de 64, com uma identidade média intracluster de 99,8%, enquanto que as amostras do Estado do Paraná formaram um segundo cluster exclusivo (1B), com uma identidade média intracluster de 100% e um valor de bootstrap de 95%. Como, no caso destas amostras, a única variável de diferenciação foi a região geográfica de isolamento, visto que todas foram isoladas entre 2002-2003 de bovinos, exceto pela amostra 3399, isolada de *Desmodus rotundus*, pode-se sugerir que no Brasil há um claro padrão regional de distribuição de amostras de vírus da raiva associadas à variante antigênica 3, concordante com Holmes et al. (2002) e Romijn et al. (2003) que demonstraram ser o agrupamento de amostras de vírus da raiva primariamente determinado pela influência de barreiras geográficas em detrimento de barreiras espécie-específicas.

Corroborando com Heinemann et al. (2002), no presente estudo também não foram encontradas diferenças temporais entre as amostras estudadas, visto que a amostra 92 do presente estudo, segregou com amostras de até 13 anos de diferença no cluster 3.

Romijn et al. (2003), trabalharam com amostras de vírus da raiva provenientes de oito municípios do Estado do Rio de Janeiro. As amostras tiveram segmentos de seu gene N examinados através da amplificação por RT-PCR e métodos de sequenciamento diretos. Uma árvore filogenética foi construída com os resultados, evidenciando a existência de correlação da origem geográfica e de espécie com grupos distintos dentro do mesmo gênero *Lyssavirus* da família Rhabdoviridae.

Heinemann et al. (2002), analisando amostras de vírus da raiva de bovinos e morcegos hematófagos de regiões diferentes do Estado de São Paulo, baseada no sequenciamento direto de produtos ampliados por PCR de 600 nucleotídeos do gene da nucleoproteína, apresentaram resultados que demonstram que não havia diferenças genéticas significantes entre amostras por eles examinadas, quando identificadas de hospedeiros distintos e de regiões geográficas diferentes. Autores como Sacramento, Bourhy e Tordo, 1992; Smith et al. 1992; Bourhy et al. 1993 b; Tordo et al. 1993 b; Kissi et al. 1995; Von Teichman et al. 1995; De Mattos et al. 1996, corroboram com essa premissa.

A hipótese de um padrão regional é também suportada pelas amostras 01 e 02, oriundas de bovinos do Estado de Tocantins, as quais se agregaram de modo disperso entre amostras do Centro-Oeste brasileiro, uma região contígua a este Estado da Região Norte, com uma identidade média de nucleotídeos de 100% entre si e de 97,23% com as amostras do cluster 1 excetuando-se os subclusters 1 A e 1B. A formação de tais clusters regionais fica também evidente quando se comparam as identidades intra e entre-clusters, visto que as primeiras foram sempre superiores às últimas.

Este mesmo padrão regional pôde ser observado com relação ao cluster 4, referente a amostras de vírus da raiva relacionadas a carnívoros terrestres: o subcluster 4B, com identidade média de nucleotídeos intra-cluster de 100% contém amostras do Nordeste brasileiro, enquanto que o subcluster 4C, com identidade média de nucleotídeos de 98,9%, contém amostras do Centro-Oeste, no qual concordantemente se classificou a amostra 92, proveniente de Goiânia, Estado de Goiás, localizado na referida região geográfica. Como o observado para as amostras do cluster 1, as identidades médias de nucleotídeos intra-cluster foram superiores às identidades entre os

diferentes subclusters, o que demonstra que também entre as amostras de vírus da raiva relacionadas a carnívoros terrestres no Brasil há também um padrão regional de variação genética.

Entretanto, como demonstrado por Carnieli et al. (2006), a variação genética entre amostras de vírus da raiva de carnívoros terrestres pode também ser associada a espécies hospedeiras, visto que o cluster 4A contém exclusivamente amostras originárias de canídeos silvestres do Nordeste brasileiro.

Bordignon et al. (2004), afirmaram que a homologia entre as seqüências das amostras de vírus da raiva catarinenses com seqüências de amostras representativas do ciclo silvestre da raiva, previamente caracterizados nos Estados de São Paulo, Tocantins, Goiás, Minas Gerais indicam que o agrupamento das amostras se dá de modo espécie-específico. Os mesmos autores, afirmam que, no entanto, agrupamentos geográficos devem ser levados em consideração em estudos futuros sobre a epidemiologia molecular da raiva no Brasil, visto a grande extensão territorial brasileira e o vasto número de espécies das quais os vírus já foram isolados em nosso país.

A amostra 583, isolada de um sagüi cujo encéfalo foi coletado em 2003 no Estado do Ceará, foi classificada, segundo a análise filogenética, como a variante de *Callithrix jacchus* (sagüi de tufo branco) descrita em 2001 por Favoretto et al. (2001) após estudos voltados para a raiva em sagüis desta espécie no Estado do Ceará. Esta observação demonstra que a variante de sagüis de vírus da raiva ainda está circulando entre esses primatas não humanos na região.

Estudos de caracterização molecular de amostras de vírus da raiva são de fundamental importância para que se possa conhecer melhor as variantes virais presentes em diferentes regiões geográficas, ou mesmo variantes relacionadas com diferentes espécies hospedeiras. Esforços contínuos no monitoramento da diversidade genética entre amostras de vírus da raiva selvagens devem ser realizados, pois alterações no material genético podem levar a modificações nas suas proteínas. O sistema imune de indivíduos infectados por esta variante pode não responder e desenvolverem a doença, apesar de haver sido vacinado com amostra de vírus fixo.

Considerando a sensibilidade e a especificidade, bem como a habilidade de detectar RNA de vírus da raiva em amostras bastante decompostas, uma situação comum em países tropicais como Brasil, o uso da RT-PCR relacionado ao gene N aparenta ser tão eficiente quanto as técnicas clássicas para a detecção de partículas

infecciosas ou antígenos de vírus da raiva. Devido a estas características, sugere-se o uso da RT-PCR como técnica complementar ao diagnóstico da raiva.

Na ausência de laboratório de diagnóstico em alguns estados brasileiros, é inegável que em muitas regiões a raiva esteja sendo subnotificada ou confundida por outras enfermidades. A ocorrência da raiva em animais silvestres é registrada de maneira esporádica, uma vez que não é comum o envio de materiais destes animais ao laboratório de diagnóstico, nem mesmo para fins de vigilância epidemiológica (BRASIL, 2005b). Nesse quadro, a técnica de RT-PCR, pode tornar-se útil, uma vez que os laboratórios, mesmo distantes, podem receber amostras, visto que os resultados dessa técnica dependem menos da conservação das amostras.

6 - CONCLUSÕES

-Em nossos estudos encontramos concordância de 100% nos resultados obtidos pela RT-PCR e pelas técnicas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos para diagnóstico do vírus da raiva.

- Apesar do número reduzido de amostras em putrefação analisadas, considera-se o resultado indicativo de que a RT-PCR pode ser utilizada em amostras putrefeitas.

-Foi encontrado um padrão regional de distribuição de amostras de vírus da raiva associadas à variante antigênica 3 de acordo com as diferentes regiões geográficas estudadas.

- O padrão de segregação obtido na árvore filogenética resultou na formação dos principais grupos esperados de amostras do vírus da raiva, ou seja, variante antigênica 2, 3, amostras fixas e variante de vírus da raiva de sagüis, no qual se classificou uma amostra de vírus da raiva detectada em um sagüi do presente estudo.

-Amostras de vírus da raiva originárias de bovinos Porciúncula/RJ formaram um cluster exclusivo dentre aquele inerente à variante antigênica 3, havendo um ciclo regional de transmissão desta variante na região.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.; SZYFRES, B. Rabia. In: _____. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organización Pan-americana de la Salud, 1986. p. 502-526.

ALMEIDA, J. D. et al. Electron Microscope observation on rabies virus by negative staining. **Virology**, San Diego, v. 18, p. 147, 1962

ANDRADE, M.R. et al. Infecção experimental em primates no humanos (*Callithrix* sp) com el virus de la rabia: acompanhamento del curso de la enfermedad. Animales de Experimentación, **La Revista Hispanoamericana**, Mexico, v. 4, n. 5, p. 7-10, 1999.

AMENGUAL, B. et al. Evolution of european bat Lyssaviruses. **J. Gen. Virololy**, San Diego, v. 78, n. 9, p. 2319-2328, 1997.

AZEVEDO, M. P. Raiva. **R. Bras. Clin. Terap., São Paulo** v. 10, n. 4, p. 233-241, abr. 1981.

BADRANE, H. et al. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **J. Virol.**, Washington,DC, v. 75, p. 3268-76, 2001.

BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. **J. Virol.**, Washington,DC, v.75, p. 8096-8104, 2001.

BAER, G. M. **The natural history of rabies**. 2. ed. Boca Raton : CRC Press, 1991. 454 p.

BELOTTO, A. J. Situação da raiva no mundo e perspectivas de eliminação da raiva transmitida pelo cão na América Latina. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DA RAIVA, 2000, São Paulo, SP. **Programas e Resumos**. São Paulo, SP: Secretaria da Saúde, 2000. p. 20-21.

BELOTTO, A. J. Raiva transmitida por morcegos nas Américas: impacto na saúde pública e na produção. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL – MORCEGOS COMO TRANSMISSORES DA RAIVA, 2001, São Paulo, SP. **Programas e resumos**. São Paulo, SP: Secretaria da Saúde, 2001. p. 24-25.

BELLOTO, A. J. A raiva no Brasil em 1984. Aspectos operacionais e epidemiológicos. **R. Fund. SESP**, São Paulo, v. 30, n. 2, p.167-182, 1985.

BLANCOU, J.; MESLIN, F. X. Brief review of the history of zoonoses. **R. Sci. Tech.**, v.19, p.15-22, 2000.

BORDIGNON, J. et al. Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Arch. Virol.**, New York, v. 150, p. 695-708, 2004.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. **Virology**. San Diego, v. 194, n. 70-81, 1993a.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Taxonomy and evolutionary studies on Lyssaviruses with special reference to Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 60, p. 277-282, 1993b.

BOURHY, H. et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 80, p. 2545-2557, 1999.

BOURHY, H. et al. Completely cloning and molecular organization of a rabies-related virus: Mokola virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 70, p. 2419-2426, 1992 .

BOURHY, H; SUREAU, P. **Laboratory methods for rabies diagnosis**. Paris: Instituto Pasteur, 1991. 197 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2005a. 104 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão sobre raiva dos herbívoros**. Brasília, 2005b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02 de jan. 2006. Adaptação do texto do Dr. Fumio Honma Ito.

BRASIL-DOS-ANJOS, G. **Padronização da reação de RT-PCR para o diagnóstico da raiva**. 2003. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

BUNSCHOTEN, H. et al. Rabies virus-specific human T-cell clones provide help for an “in vitro” antibody response against neutralizing antibody-inducing determinants of viral glycoprotein, **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 70, p.1513-1521,1989.

CARBALLAL, G.; OUBIÑA, J. R. Vacunas virales. In: _____. **Virologia medica**. 3. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1998. cap. 25, p. 457-474.

CARNIELI, P. J. et al. Phylogeny of rabies virus identified in a cat closely related to vampire bat based on the nucleoprotein gene. **Virus Reviews and Research**, v.10, p. 50-54, 2005.

CARNIELI P.J. et al. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, Amsterdam, v. 120, p. 113-120, 2006.

CASOS notificados de raiva humana no Brasil. Disponível em: <<http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/news/pptraivahumana.ipg>>. Acesso em: 02 jan. 2006.

CDC. Human rabies prevention - United States, 1999. **MMWR** - Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, v. 48, n. RR - 1, jan. 1999. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/Professional/acip/ACIP99.htm>. Acesso em: 24 maio 2006.

CDC. Human Rabies Prevention - United States, 2004: **MMWR** - Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta v.16, 2004a. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/Professional/acip/ACIP04.htm>. Acesso em: 24 maio 2006.

CDC. Human Rabies Prevention - United States,2004: : **MMWR** - Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta v.9, 2004b. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/Professional/acip/ACIP04.htm>. Acesso em: 24 maio 2006.

CIUCHINI, F. et al. Risposta immunitaria in bovini vaccinati contro la rabia con virus attenuato ceppo ERA. **Riv. Zoot. Vet.**, v. 9, n. 3, p. 176-184, 1981.

CORDEIRO,C.C. et al. Avaliação da vacina anti-rábica ERA, frente a variantes antigênicas do vírus da Raiva, diferentes períodos pós imunização. **Rev. Saúde Públ., S. Paulo**, v. 24, p. 512-517, 1990.

CORRÊA, O. **Doenças infecciosas dos animais domésticos** – viroses dos animais. 2. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1975. v. 3, p. 329.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Doenças infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. São Paulo: Ed. Medsi , 1992 . 823 p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Legislação & ética**. São Paulo, [2004?]. Disponível em:<<http://www.cobea.org.br>>. Acesso em: 07 fev. 2004.

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microb.**, Washington, DC, v. 117, p. 1117-1121, 1998.

DANTAS JUNIOR, J. V. et al. Protocolo de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa para a detecção do vírus da raiva. **Arq. Bras. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p.398-400, 2004

DAVID, D. et al. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 87, p. 111-118, 2002.

DELAGNEAU, J. F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Structure of rabies virus: spatial relationships of the proteins G, M1, M2 and N. **Ann. L'Institut Pasteur: Virol., Paris**, v. 132E, p. 473-493, 1981.

DE MATTOS, C. A. et al. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 34, p. 1553-1558, 1996.

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

DULBECCO, R.; GINSBERG, H. S. Os rabdovirus. In: _____. **Microbiologia de Davis**. 2. ed. São Paulo: Ed. Harbra, 1980, p. 1623 –1633, v. 4.

ERBOLATO, E. B. et al. Eficácia da vacina anti-rábica ERA em camundongos, frente a quatro diferentes variantes do vírus da Raiva. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 23, p. 447-454, 1989.

FAVI, M. et al. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 8, n. 1, p. 79-81, 2002.

FAVORETTO, S. R. et al. Rabies in marmoset (*Callithrix jacchus*), Ceara, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7 p. 1062-1065, 2001.

FENNER, F. J. et al. Laboratory diagnosis of viral diseases. In. _____. **Veterinary Virology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 213-239.

FLORES-CRESPO, R. **La rabia en las diferentes especies, sus transmisores y su control**. México: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura/Organización Panamericana de la Salud, 1998. 127 p.

FRANCKI, R.I.B. et al. Classification and nomenclature of viruses. **Arch. Virol.**, New York, Suppl. 2, 1991.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle**. Brasília: 1998. 117 p.

GAUDIN, Y. et al. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. **J. Virol.**, Washington, DC, v. 67, p. 1365-1372, 1993.

GAUDIN, Y. et al. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, San Diego, v. 184, p. 441- 444, 1992.

GERMANO, P.M.L. et al. Avaliação da resposta imunitária da vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes aplicadas em cães primo vacinados em condições naturais. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 67-74, 1982.

GERMANO, P. M. L. Avanços na pesquisa da raiva. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 86-91, 1994.

GOLDENBERG, S. Ferramentas de análise molecular e os agentes das grandes endemias. **Ciênc. Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 43-47, 2002.

GOULD, A. R. et al. Characterisation of a novel Lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. **Virus Research**, Amsterdam, v. 54, p. 165-87, 1998.

HAGAN, W. A.; BRUNER, D. W. **Las enfermedades infecciosas de los animales domesticos; con especial referencia a su etiologia, diagnóstico y terapéutica biológica.** 2. ed. Durango: La Prensa Medica Mexicana, 1952. 800 p.

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.

HAYASHI, Y. et al. Estudos de proteção cruzada de 24 cepas de vírus da raiva isoladas de diferentes espécimes animais do Brasil. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 27, p. 27-37, 1984.

HEATON, P.; McELHINNEY, L. M.; LOWINGS, J. P. Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. **J. Virol. Meth.** Amsterdam, v. 81, p. 63-69, 1999.

HEATON, P. R. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 35, n. 11, p. 2762-2766, nov. 1997.

HEINEMANN, M. B. et al. Genealogical analyses of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 128, p. 503-511, 2002.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C. Human rabies, a disease of complex neuropathogenetics mechanism and diagnostic challenges. **The Lancet Neurology**, v. 1 p. 101-109, 2002.

HOLMES, C. E. et al. Genetic constraints and the adaptive evolution of rabies virus in Nature. **Virology**, San Diego, v. 292, p. 247-257, 2002.

IÑIGO, E. L. et al. Descripción de procesos empleados en las técnicas de control de vampiros y en la vacunación de bovinos. In: FLORES-CRESPO, R. **La rabia en las diferentes especies, sus transmisores y su control**. México: IICA / OPS, 1998. p.115-127.

ITO, M. et al.. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **J. Cli. Virol.**, v. 26, p. 317-330, 2003.

ITO, M. et al. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, San Diego, v. 284, p. 214-22, 2001a.

ITO, M. et al. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 63, n. 12, p. 1309-1313, 2001b.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 18. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1989. 450 p.

KAMOLVARIN, N. et al. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 167, n. 1, p. 207-210, 1993.

KAPLAN, C.; TURNER, G. S.; WARREL, D. A. **Rabies, the facts**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1986. p. 8-74.

KAWAI, A.; MORIMOTO, K. Functional aspects of *Lyssavirus* proteins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, New York, v. 187, p. 27-42, 1994.

KIMURA, L. M. S. **Estudo comparativo da localização do vírus da raiva no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados**. 2000. 117 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro. 2000.

KIMURA, L. M. S., LIMA, J. G. P.; SILVA, J. A. C. Diagnóstico laboratorial da raiva no Estado do Rio de Janeiro, no período de 1978 a 1987. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 4., São Lourenço, 1988. **Resumos:** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, p. 129. 1988

KIMURA, L. M. S. et al. Comparative study of Rabies virus localization in laboratorial diagnosis in the CNS of naturally infected bovines. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 9., 1998, São Lourenço, MG. **Resumos...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 1998.

KIMURA, L. M. S. et al. **A Situação da raiva no Estado do Rio de Janeiro.** Niterói [s.n.], 2005. Trabalho apresentado no 6º Congresso Brasileiro de Buiatria, 2005. Armação de Búzios, RJ.

KING, A.; TURNER, G. S. Rabies: a review. **Journal Comp. Pathology**, London, v. 108, p. 1-39, 1993.

KISSI, B. et al. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 80, n. 8, p. 2041-2050, 1999.

KISSI, B.; TORDO, N.; BOURHY, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. **Virology**, San Diego, v. 209, p. 526-537, 1995.

KOBAYASHI, Y. et al. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.

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

KOTAIT, I. et al. **Controle da raiva dos herbívoros.** São Paulo: Instituto Pasteur, 1998. 15 p. (Manual Técnico do Instituto Pasteur, n,1).

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

LARGHI, O.; OUBIÑA, J. R. Família Rhabdoviridae. In: CARBALLAL, G.; OUBIÑA, J. R. **Virologia médica**. 3. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1998. cap. 13, p. 245-260.

LARSON, J. K.; WUNNER, W. H.; ERTL, H. C. L. Immune response to the nominal phosphoprotein of rabies virus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 73-88, 1992.

LEMOS, H. N.; SOUZA, M. M. de. Reações adversas na vacinação anti-rábica humana. **A Folha Médica**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5/6, nov./dez. 1990.

LENTZ, T. L. et al. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, Washington, DC, v. 215, p. 182-184, 1982.

LORD, R. D. **Manual de campanha para o controle de morcegos vampiros e da raiva**. Austin: Bat Conservation International, 1998. 39 p.

MARQUES, G. H. F.; KOTAIT, I. Situação epidemiológica da raiva dos herbívoros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL – MORCEGOS COMO TRANSMISSORES DA RAIVA, 2001, São Paulo. **Programas e Resumos**. São Paulo: Secretaria da Saúde, 2001. p. 27-28.

MARSCH, M.; BRON. R. SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface. **J. Cell Sci.**, Essex, v. 110, pt. 1, p. 95-103, 1997.

MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. 476 p.

MORIMOTO, K. et al. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 3152-3156, 1998.

MURPHY, F. A. Virus Taxonomy. In: FIELDS, B. N. et al. **Fundamental virology**. 3. ed. Lippincott: Raven Publishers, 1996. cap. 2, p. 15-54.

NADIN-DAVIS, S. A.; CASEY, G. A.; WANDELER, A. A molecular epidemiological study of rabies virus in central Ontario and western Quebec. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 75, n. 10, p. 2575-2583, 1994.

NADIN-DAVIS, S. A.; CASEY, G. A.; WANDELER, A. Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 74, n. 5, p. 829-837, 1993.

NADIN-DAVIS, S. A.; HUANG, W.; WANDELER, A. I. The design of strain-specific polymerase chain reactions for discrimination of the raccoon rabies virus strain from indigenous rabies viruses of Ontario. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 57, p. 1-14, 1996.

NADIN-DAVIS, S. A. et al. Antigenic and genetic divergence of rabies viruses from bat species indigenous to Canada. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 74, p. 139-156, 2001.

NADIN-DAVIS, S. A. et al. Phylogeographic patterns exhibited by Ontario rabies virus variants. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 123, p. 325-36, 1999.

NATHANSON, N.; GONÇALEZ-SCARANO, F. Immune response to Rabies virus. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 145-161.

OLIVEIRA, A. N. et al. Bovine rabies in the State of Rio de Janeiro. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 7., 1994, São Lourenço. **Anais...** Sociedade Brasileira de Virologia, 1994. p.31.

OLIVEIRA, A. N. et al. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Rev. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 83-88, 2000.

OLIVEIRA, R. et al. Postmortem confirmation of human rabies source. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 867 - 869, 2006.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, Washington. **Programa de adiestramiento en salud animal para America Latina – cuarentena animal**. Washington, 1986. v. 1 – Enfermedades cuarentenables.

ORCIARI, L. A. et al. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, Surrey, v. 19, p. 4511- 4518, 2001.

PICCININI, R. S. Controle de morcegos hematófagos: análise e discussão dos métodos existentes. **Bol. Def. Sanit. Anim.**, Brasília, v. 16, n. 1/4, p. 116-157. 1982.

PIERI, K. M. S. **Caracterização de amostras de vírus da raiva isoladas no Estado de Santa Catarina através da técnica de PCR de baixa estringência (LSSP-PCR)**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

POCH, O. et al. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 71, n. 5, p. 1153-1162, 1990.

ProMED-MAIL. **Raiva humana - Brasil (Sergipe)**. Viena: International Society for Infections Diseases. 2005a. Disponível em:< <http://www.promedmail.org>>. Acesso: 3 jun. 2005a.

ProMED-MAIL. **Raiva, raposas - Brasil (Teresina, PI)**. Viena: International Society for Infections Diseases. 2005b. Disponível em:< <http://www.promedmail.org>>. Acesso: 1 jun. 2005b.

RAVKOV, E. V.; SMITH, J. S.; NICHOL, S. T. Rabies virus glycoprotein gene contains a long 3'noncoding region which lacks pseudogene properties. **Virology**, San Diego, v. 206, p. 718-723, 1995.

REIS, M. C. et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística da Clínica de Bovinos (Oliveira dos Campinhos, Santo Amaro, Bahia), Universidade Federal da Bahia, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999 (Relato de caso). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 4, n. 1, p. 12-17, 2003.

REUBEL, G. H.; STUDDERT, M. J. Benefits and limitations of polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet. Bull.**, Wallingford, v. 68, p. 505-515, 1998.

ROMIJN, P. C. ; KIMURA, L. M. S. Alerta sobre a expansão da Raiva no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996. p. 125.

ROMIJN, P. C. et al. Estudo sobre a encefalite não purulenta em animais domésticos do Estado do Rio de Janeiro. In: REUNIÃO DE PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS (CCTA) DA UENF, 2., 1995, Campos dos Goytacazes. Resumos, 1995. p.37.

ROMIJN, P. C. et al. Study of Lyssavirus of bat origin as a source of Rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro – Brazil. **Am. J. Tropical Med. Hyg.**, Baltimore, v. 69, p. 81-86, 2003.

RUPPRECHT, C. E.; HALON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 2, p. 327-343, 2002.

SACRAMENTO, D. et al. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 73, n. 5, p. 1149-1158, 1992.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, London, n. 6, p. 229-240, 1991.

SCHAEFER, R. et al. First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years. **Veter. Rec.**, London, v. 16, p. 216-217, 2002.

SCHAEFER, R. et al. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 107, p.161-170, 2005.

SCHNEIDER, M.C.; SANTOS-BURGOA, C. Tratamiento contra la rabia humana: un poco de su historia. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 454-463, 1994.

SILVA, M. V. da et al. Evolution of rabies in vampire bats through the analysis of epizooty of bovines from the State of Rio de Janeiro from 1984 to 1997. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BAT RESEARCH, 11., 1998, Pirenópolis. **Abstracts...** New York: College of the State University of New York, 1998. **Bat Research News**, Potsdam, v. 39, n. 3, p. 73, 1998.

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. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 8, n. 6, p.1-4, 1973. Veterinária.

SMITH, J. S. Rabies virus epitopic variation: use in ecologic studies. **Advanced Virus Research**, n. 36, p. 215-253, 1989.

SMITH, J. S. et al. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. **J. Infect. Dis.** Chicago, v. 166, p. 296-307, 1992.

SMITH, J.; YAGER, P. A.; ORCIARI, L. A. Rabies in wild and domestic carnivores of Africa: epidemiological and historical associations determined by limited sequence analysis. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, Pretoria, v. 60, p. 307-314, 1993.

SOARES, R. M. et al. A Heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 109-111, 2002.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural proteins of rabies virus. **J. Virol.**, Washington, DC, v. 7, p. 241-249, 1971.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 1-24.

STEELE, J. H. History of rabies. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. p. 1-29, v. 1.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: WHO, 1996. p. 28-51.

TORDO, N. et al. Structure and expression in baculovirus of the Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine. **Virology**, San Diego, n. 194, p. 59-69, 1993a.

TORDO, N. et al. Molecular epidemiology of lyssaviruses: focus on the glycoprotein and pseudogenes. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, Pretoria, v. 60, p. 315-323, 1993b.

TORDO, N.; SACRAMENTO, D.; BOURHY, H. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. WHO, 1996. p. 157-174,

TORDO, N. et al. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA-viruses. **Virology**, San Diego, v. 165, p. 565-576, 1988.

TORDO, N. et al. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 83, p. 3914-3918, 1986.

TORDO, N.; CHARLTON, K.; WANDELER, A. Rhabdoviruses: rabies. In: COLLIER, L.H. **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. London: Arnold Press, 1998. p. 666-692.

UIEDA, W.; HARMANI, N.; SILVA, M. Rabies in insectivoros (Mollosidae) bats of southeastern Brazil. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 393-397, 1995.

VON TEICHMAN, B. F. et al. Molecular epidemiology of rabies virus in South Africa: evidence for two distinct virus groups. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 76, pt. 1, p. 73-82, 1995.

WAGNER, R.; ROSE, J. K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: FILDS, D. M.; KINIPE, P. M. **Filds virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Raven, 1996. p. 1121-1159.

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. **J. Wildlife Dis.**, Ames, v. 33, n. 4, p. 912-915, 1997.

WILKINSON, L. History. In: JACKSON, A. C. ; WUNNER, H. **Rabies**. New York: Academic Press, 2002. cap.1, p. 1-22.

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of rabies virus. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural histore of rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 31-37.

WUNNER, H. W. Rabies Virus. In: JACKSON, C. A.; WUNNER, H. W. **Rabies**. New York: Academic Press, 2002. p. 23-77.

ZANETTI, C. R. et al. Failure of protection induced by a brazilian vaccine against Brazilian wild rabies viruses. **Arch. of Virol.**, New York, v. 143, p. 1745-1756, 1998.

ANEXO I

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COMO RECURSO AO DIAGNÓSTICO
DA RAIVA.**

POLIMERASE CHAIN REACTION AS RESOURCE TO RABIES DIAGNOSIS.

Aceito para publicação pela Revista Brasileira de Medicina Veterinária em abril de
2006.

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COMO RECURSO AO
DIAGNÓSTICO DA RAIVA.**

POLIMERASE CHAIN REACTION AS RESOURCE TO RABIES DIAGNOSIS

KIMURA, Leda Maria Silva ¹; DANTAS JÚNIOR, Joeler Vargas² ; MOURA, Wlamir
Correa ³ ; KOTAIT, Ivanete ⁴ ; MARIN, Victor Augustus²; BRANDÃO, Paulo Eduardo
⁴

1- Médico- Veterinário - Laboratório de Biologia Animal – PESAGRO/RJ
e-mail: lkimura@pesagro.rj.gov.br

2-Biólogo - Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde-INCQS-
FIOCRUZ

3 - Médico- Veterinário - Instituto Nacional de Controle Qualidade em
Saúde-INCQS-FIOCRUZ

4- Médico- Veterinário- Instituto Pasteur de São Paulo.

RESUMO

A raiva é uma das doenças mais temidas entre as diferentes zoonoses que ameaçam o Homem, pois evolui sempre para o êxito letal, sendo, na prática, sua morbidade igual à mortalidade. Acrescem-se ainda os prejuízos econômicos, causados ao rebanho bovino, seu impacto geral na economia agrícola, reduzindo a produção de leite e carne, e suas implicações na área de saúde pública. O Laboratório representa uma peça fundamental nesse contexto, uma vez que o êxito das medidas complexas de prevenção numa comunidade, como a vacinação perifocal, ou ainda o tratamento profilático ao ser humano exposto, dependem da rapidez e da confiabilidade do diagnóstico. Esta condição tem induzido ao desenvolvimento e adaptações de técnicas visando melhorar a velocidade e a eficiência do diagnóstico da raiva, assim como o incremento das pesquisas. O presente estudo objetivou ressaltar o valor da técnica molecular de RT-PCR como uma ferramenta adicional ao diagnóstico clássico da raiva, sem, no entanto, substituir as provas convencionais. Trinta e duas amostras obtidas de Sistema Nervoso Central de mamíferos domésticos e silvestres de diferentes regiões do Brasil foram selecionadas, 28 apresentando positividade para raiva nas provas clássicas e 4 negativas nas mesmas provas. A técnica de RT-PCR foi aplicada nesses materiais, demonstrando 100% de concordância com aqueles resultados. A técnica de RT-PCR demonstrou sensibilidade inclusive em amostras que se apresentavam em estado de putrefação.

PALAVRAS-CHAVE - Raiva, RT-PCR, diagnóstico.

ABSTRACT

Rabies is one of most feared diseases among the different zoonoses that threaten humans, since it always succumbs to death and its morbidity is equal to the mortality. Additionally, rabies leads to economic damages to the herd of cattle and its general impact in the agricultural economy reduces the milk and meat production, consequently affecting the public health area. Laboratory diagnosis of rabies represents a fundamental tool in this context, since the success of the prophylactic measures in a community, as perifocal vaccination or postexposure prophylaxis in humans, depend on the rapidity and reliable of the diagnosis. This condition has stimulated to the development and adaptations of techniques with aimed to improve the efficiency of rabies diagnosis, as well as the incrementation of researches. The present study aimed to evaluate an RT-PCR assay as an alternative tool to the standard diagnosis of rabies, but not replacing the conventional tests. Thirty two samples obtained from the Central Nervous System of domestic and wild mammals from different regions of Brazil were selected, finding 28 positives and 4 negatives for rabies by the standard tests. The same material was tested by the RT-PCR technique, demonstrating 100% of concordance with those results. Also, the RT-PCR technique showed great sensitivity decomposed samples.

KEY WORDS - Rabies, RT-PCR, diagnosis.

INTRODUÇÃO

A raiva está presente no território nacional podendo ser considerada endêmica, em grau diferenciado de acordo com a região geopolítica. No período de 1996-2004 foram notificados 29.969 mil raiva em diferentes espécies animais (Brasil, 2005b). Em relação à raiva humana foi observado que, no período de 1996 a 1999, a frequência de casos se manteve numa média de 26 casos/ano. No ano de 2000 foram notificados 18 óbitos, 21 em 2001 e 7 em 2002. Em 2003, foram descritos 17 óbitos humanos, sendo o cão o animal agressor de maior destaque, contrastando com o ano 2004, no qual o morcego hematófago foi o responsável por 24 dos 30 casos em humanos (Casos.....,2006)

A importância econômica da raiva está relacionada à sua ocorrência em animais produtores de alimentos. A raiva de herbívoros, principalmente em bovinos, transmitida por morcegos hematófagos, representa uma importante limitação ao desenvolvimento da pecuária nacional, além de representar riscos à saúde pública.

Devido à gravidade da doença, evoluindo sempre para o êxito letal, a possibilidade de um diagnóstico falso-negativo deve ser reduzida tanto quanto possível. Para isso, a maioria dos laboratórios utiliza dois testes: a prova de imunofluorescência direta (IFD) como teste principal e a prova de inoculação intracerebral em camundongos (PB) como teste complementar (Acha & Szyfres,1986).

A técnica mais amplamente utilizada para o diagnóstico da raiva é a IFD, recomendada pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização Mundial de Saúde Animal .O teste de IFD apresenta resultados confiáveis em poucas horas, quando realizados em materiais frescos, em 95-99% dos casos (Brasil, 2005a). Segundo Silva et al., (1973) a técnica de imunofluorescência reúne indiscutivelmente as vantagens de rapidez e especificidade, quando se tem em foco o diagnóstico.

A PB detecta a infecciosidade da amostra, com inoculação da suspensão em sistemas biológicos e permitindo o isolamento do agente. É utilizado concomitantemente ao teste da IFD (Koprowski ,1996).

Nas últimas décadas, os avanços tecnológicos das ciências biológicas, notadamente a biologia molecular e a imunologia, permitiram aprofundar os

conhecimentos sobre o vírus da raiva, a patogenia e a imunoprofilaxia da infecção, assim como o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos (Germano, 1994).

Assim, 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 a determinação da variabilidade genética do vírus da raiva, inclusive entre cepas, e para o esclarecimento dos mecanismos de replicação e transmissão viral.(Germano, 1994).

. A PCR associada à transcrição reversa (RT-PCR), representou um grande avanço no diagnóstico e na tipificação de amostras de *Lyssavirus*. (Sacramento et al.,1991; Bourhy et al., 1993a; Gould et al., 1998). Sacramento et al, desenvolveram, em 1991, o primeiro protocolo de RT-PCR para o vírus da raiva e, a partir daí, a evolução desta técnica tem sido marcante. Estes autores propuseram a técnica de RT-PCR para uso em rotina laboratorial no diagnóstico da raiva e para estudos epidêmicos do vírus da raiva, conseguindo demonstrar a praticidade e confiabilidade desta técnica na amplificação do gene N.

O objetivo do presente estudo foi verificar a viabilidade da inclusão da técnica de RT-PCR no diagnóstico laboratorial de rotina da raiva.

Os produtos gerados por esta técnica permitem ainda, caracterização genética pelo seqüenciamento de áreas limitadas do genoma viral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus de referência

As cepas virais utilizadas no presente estudo foram: Challenge Standard Virus (CVS 31.2), mantida por passagens em cérebros de camundongos, e Pasteur Vírus (PV), mantida por sucessivas passagens em cultura de células BHK-21.

Amostras de campo

Foram utilizadas 32 amostras de SNC de mamíferos domésticos apresentando quadro neurológico sugestivo da raiva, encaminhadas para diagnóstico desta virose entre os anos 1985 e 2004, oriundas de diferentes municípios do Brasil.

Vinte e oito dessas amostras apresentaram resultados positivos para raiva: 21 bovinos, 3 caninos, 1 humano, 1 sagüi, 1 morcego hematófago e 1 raposa. (três dessas amostras, encontravam-se em putrefação).

Quatro amostras de SNC com resultados de IFD e PB negativas, também foram testadas. (Quadro 1) .

As amostras enviadas por laboratórios de outros estados do Brasil vieram com diagnósticos positivos para raiva atestados.

Em nossos experimentos as amostras 24, 27 e 28 que chegaram em estado de putrefação foram retestadas.

Técnicas:

Teste de Imunofluorescência Direta (IFD)

Lâminas confeccionadas com impressão dos fragmentos a serem examinados foram processadas conforme Dean et al., 1996, e visualizadas ao microscópio de imunofluorescência. O conjugado fluorescente policlonal marcado com isotiocianato de fluoresceína utilizado foi cedido pelo Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman/Rio de Janeiro.

Prova Biológica (PB)

A prova biológica seguiu a metodologia descrita por Koprowski (1996).

As amostras, após trituração em gral, foram diluídas a 10% em PBS (Solução salina tamponada fosfatada) contendo penicilina G potássica e sulfato de estreptomicina e centrifugadas por 5 minutos à 600 g. O sobrenadante foi coletado como inóculo.

Camundongos albinos suíços com 21 dias de idade foram inoculados com 0,03 mL do sobrenadante, por via intracerebral, e observados diariamente por um período de até 30 dias. Foram utilizados 10 animais por amostra. Os animais que vieram a óbito após apresentarem sintomatologia nervosa, foram submetidos ao teste de IFD para confirmação final.

A manutenção e manejo dos animais experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2004.

Extração de RNA e RT-PCR

A extração de RNA das amostras foi realizada a partir do sobrenadante de suspensão de cérebro a 10% , de acordo com o método TRIZOL[®] (Invitrogen[™]) seguindo as instruções do fabricante.

Sete microlitros de cada RNA foram adicionados ao mix de transcrição reversa (síntese de cDNA) contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen[™]), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/ μ L de cada primer (504 e 304)(Quadro1) e 200U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen[™]) para uma reação final de 20 μ L, realizada a 42°C/60 min.

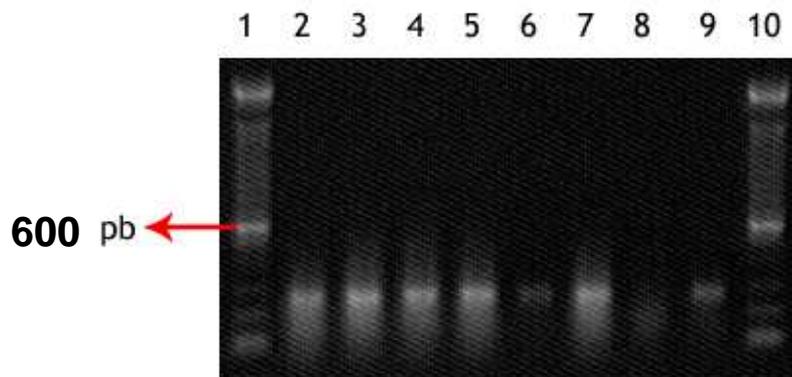
Dez microlitros de cada respectivo cDNA foram adicionados ao mix de PCR contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen[™]), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/ μ L de cada primer (504 e 304), 1,5mM MgCl₂, 25 μ L água ultra-pura e 1,25U Taq DNA polymerase (Invitrogen[™]) para uma reação final de 50 μ L e submetidos a uma desnaturação inicial de 94 °C/ 2 seg., seguidos de 40 ciclos de 94 °C /30 seg, 37 °C /30 seg e 72 °C /1,5 min, finalizando com uma extensão final de 72°C/7 min.

Todos os produtos da RT-PCR foram analisados em gel de agarose a 1 % corado por brometo de etídio. Foram consideradas positivas as amostras que resultaram no fragmento esperado de 249 pares de bases (Figura 1).

Quadro 2– Sequência dos “primers” utilizados para amplificação de um segmento de 249 pb do gene N do vírus da Raiva.

PRIMER	SEQUÊNCIA	Posição no genoma do SAD(B19)	Sentido de orientação
504	5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3	1290-1317	Senso (Orciari et al., 2001)
304	5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3'	1514-1523	Anti-senso (Orciari et al., 2001)
Fragmento amplificado=249pb			

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, revelando os produtos de amplificação do fragmento de 249 pb referente à região que contém a nucleoproteína viral.



Canaletas 1 e 10 - padrão de tamanho molecular; Canaleta 2 –bovino de Arapoti - PR; Canaleta 3- bovino de Dr. Ulisses-PR ; Canaleta 4-bovino de Porciúncula-RJ;Canaleta 5-bovino de Cerro Azul-PR; Canaleta 6- sagüi do Ceará; Canaleta 7- bovino de Camapuã-MS; Canaleta 8 - controle negativo (CN); Canaleta 9- controle positivo (CVS).

RESULTADOS

Nas 32 amostras estudadas houve 100% de correlação entre as técnicas aplicadas. Vinte e oito amostras demonstraram positividade nas 3 técnicas aplicadas e quatro amostras enviadas para o diagnóstico da Raiva, provenientes de animais que apresentavam sintomatologia nervosa, demonstraram negatividade nas provas de IFD, PB e RT-PCR.

Quadro 1- Amostras de SNC e resultados de IFD, PB e RT-PCR para detecção do vírus da Raiva.

Nº	Espécie	Ano	Origem geográfica	Resultado IFD	Resultado PB	RT-PCR
1	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
2	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
3	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
4	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
5	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
6	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
7	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
8	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
9	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
10	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
11	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
12	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
13	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
14	Bovina	2003	Porciúncula-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
15	Bovina	2002	Miracema-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
16	Canina	1985	N.Iguaçu-RJ	Positiva	Positiva	Positiva
17	Bovina	2003	Arapoti-PR	Positiva	Positiva	Positiva
18	Bovina	2003	Dr.Ulisses-PR	Positiva	Positiva	Positiva
19	Bovina	2003	Cerro Azul-PR	Positiva	Positiva	Positiva
20	Quiróptero	2003	Jaquariaíva-PR	Positiva	Positiva	Positiva
21	Bovina	2003	Camapuã-MS	Positiva	Positiva	Positiva
22	Saqui	2003	Ceará	Positiva	Positiva	Positiva
23	Humana	1992	Goiânia-GO	Positiva	Positiva	Positiva
24	Raposa	2004	Sossego-PB	Positiva	Positiva	Positiva
25	Bovina	2003	Palma -TO	Positiva	Positiva	Positiva
26	Bovina	2003	Palma-TO	Positiva	Positiva	Positiva
27	Canina	2003	São Cristóvão-SE	Positiva	Positiva	Positiva
28	Canina	2002	N.S. das Dores-SE	Positiva	Positiva	Positiva
29	Bovina	2002	Miracema- RJ	Negativa	Negativa	Negativa
30	Bovina	2003	Valença- RJ	Negativa	Negativa	Negativa
31	Bovina	2003	Valença- RJ	Negativa	Negativa	Negativa
32	Bovina	2003	Valença- RJ	Negativa	Negativa	Negativa

DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

No presente estudo foi encontrada uma concordância de 100% nos resultados obtidos pela RT-PCR e pelas técnicas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos para diagnóstico do vírus da raiva.

Segundo Rupprecht et al. (2002) e Brasil-dos-Anjos(2003), as técnicas moleculares têm se mostrado eficientes se usadas em conjunto com outras técnicas já estabelecidas, como a imunofluorescência direta, podendo reduzir o número de diagnósticos falso-negativos, aumentando a sensibilidade e especificidade dos testes.

Apesar da Organização Mundial de Saúde não preconizar a RT-PCR como ferramenta para o diagnóstico da raiva, diversos autores em todo o mundo afirmam a sua alta sensibilidade (Sacramento et al.,1991; Kamolvarin et al., 1993; Bourhy et al.,1993a e 1993b; Smith et al., 1993; Meslin & Kaplan,1996; Tordo, 1996; Heaton,1997). Nos últimos anos a técnica começou a ser utilizada no Brasil, com fins principalmente de pesquisa genética (Ito et al.,2001 ; Soares, et al.,2002; Brasil-dos-Anjos,2003; Romijn, et al.,2003; Pieri,2003; Bordignon et al.,2004,Heinemann et al.,2002; Dantas Junior et al.,2004; Carnieli et al. ,2005; Schaefer et al.,2005; Kobayashi et al.,2005).

Já em 1991, Sacramento et al. encontraram 100% de concordância entre os resultados dessas mesmas técnicas utilizadas no presente estudo. Mais recentemente, Soares et al., (2002) apresentaram conclusões idênticas. Romijn et al. (2003), trabalhando com amostras positivas pelas técnicas tradicionais (encéfalos coletados de herbívoros suspeitos de estarem acometidos de raiva e de quirópteros de regiões com focos recentes de Raiva enviados para laboratório), observaram que essas também se apresentaram positivas pela técnica molecular. Nenhuma amostra de bovino suspeito que se apresentou negativa pelas técnicas tradicionais, apresentou-se positiva pela RT-PCR, corroborando com os resultados aqui apresentados.

Dantas Junior et al., (2004), trabalhando com 50 amostras de herbívoros oriundas do Estado do Rio de Janeiro, também encontraram 100% de correlação entre a IFD, PB e a RT- PCR ,concordante com os resultados aqui apresentados.

Ito et al. ,(2001) analisaram 49 amostras de diferentes animais oriundos do sul do Estado de São Paulo e Goiânia. Destas, 5 eram de morcegos hematófagos, 14 de bovinos, 12 de caninos, 11 de felinos, 2 de equinos , 1 de suino e 3 de humanos. A RT-PCR conseguiu detectar o vírus da raiva em todas as amostras, apresentando 100% de

concordância com os resultados das técnicas de imunofluorescência e inoculação intracerebral em camundongos, testadas paralelamente.

Tordo (1996), sugere o método de RT-PCR para o diagnóstico laboratorial de rotina, evidenciando a importância desta técnica para estudos de epidemiologia molecular. Em acordo com Tordo, os autores do presente estudo demonstraram que através desta técnica foram obtidos resultados idênticos àqueles obtidos por técnicas de diagnóstico de rotina, provando que pode ser utilizada para fins de diagnóstico.

Soares et al. (2002) também afirmaram que a RT-PCR pode ser utilizada no diagnóstico da raiva, em casos de IFD negativa e urgência no diagnóstico, quando as amostras foram estocadas inadequadamente, gerando autólise, ou quando se tem pouco material, como no caso de pesquisas com animais de laboratório ou morcegos. Em seus estudos também encontraram correlação de 100% entre as técnicas tradicionais e moleculares, analisando 42 amostras clínicas.

Segundo estudos de Brasil-Dos-Anjos (2003), a técnica de RT-PCR aplicada em 81 amostras de tecido cerebral de animais suspeitos de óbito por raiva, mostrou sensibilidade de 95,5% e especificidade de 94,8%, quando comparada com as técnicas clássicas. O mesmo autor afirma ainda, que a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos virais, através de RT-PCR possuem sensibilidade comparável à propagação do vírus em culturas celulares, tendo a vantagem de serem mais rápidas e não dependerem da viabilidade do vírus, oferecendo riscos menores com relação à biossegurança.

Heaton et al. (1999) sugerem a técnica de RT-PCR para uma rápida identificação da doença, principalmente em casos humanos, nos quais se pode assegurar o tratamento pós-exposição adequado ao doente e a todos que tiveram contato com o mesmo. Utilizando esta técnica, conseguiram obter os resultados em 5 horas. Em estudos de Brasil-Dos-Anjos (2003) a realização de todas as etapas da reação de RT-PCR demorou em torno de 8 horas.

Todos os autores citados, assim como os do presente estudo, enfocaram a nucleoproteína como opção para detecção por RT-PCR em seus estudos, por essa ser considerada uma região gênica muito conservada, facilitando o desenho de primers aptos para amplificação de inúmeras variantes virais. (Crepin et al., 1998; Kissi et al., 1995).

Comparações da PCR com a IFD, avaliando principalmente amostras em decomposição, demonstraram a diminuição de sensibilidade da imunofluorescência direta. A RT-PCR demonstrou ser capaz de amplificar a sequência gênica alvo de

amostras de tecido cerebral expostas por até 96 horas à temperatura ambiente (Soares et al., 2002).

Estudos de David et al., (2002) relataram que em amostras degradadas até 36 dias à temperatura de 37°C, a sensibilidade de detecção da RT-PCR foi maior quando comparada às técnicas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral. Vários outros autores compararam os resultados da RT-PCR com a imunofluorescência direta em amostras em decomposição, avaliando a queda de sensibilidade relacionada com o tempo de deterioração do tecido cerebral (Kamolvarin et al., 1993; Heaton et al., 1997; Whitby et al., 1997).

Até mesmo em ocasiões em que a suspeita de raiva foi aventada muito tempo após o óbito humano, a técnica de RT-PCR é de fundamental importância, para confirmar a suspeita e identificar a fonte de infecção, através de estudos genéticos posteriores. (Instituto Pasteur, 2004).

No presente estudo, os materiais 24, 27 e 28, (quadro 2) provenientes da Paraíba e de Sergipe, até serem enviados para fazerem parte desse estudo estavam perfeitamente estocados em freezer a -20 C, no Instituto Parreiras Horta, em Aracajú, onde apresentaram resultados positivos na IFD e PB. Problemas operacionais ocorridos no aeroporto acarretaram demora na liberação dos materiais, ocasionando estado avançado de putrefação nestas amostras. Sendo assim, no reteste realizado em nossos estudos, os materiais 27 e 28 apresentaram resultados negativos na IFD e não foi possível proceder à inoculação em camundongos. A amostra 24, apesar de apresentar IFD positiva, também não foi possível inocular. No entanto, a RT - PCR apresentou-se positiva nas 3 amostras.

Apesar do número reduzido de amostras em putrefação analisadas em nosso estudo, consideramos o resultado indicativo de que a RT-PCR pode ser utilizada em amostras putrefeitas, corroborando com os resultados apresentados pelos diversos autores citados.

Considerando a sensibilidade e a especificidade, bem como a habilidade de detectar vírus em amostras bastante decompostas, uma situação comum em países tropicais como Brasil, o uso da RT-PCR relacionado ao gene N aparenta ser tão eficiente quanto as técnicas clássicas para a detecção do vírus da raiva. Devido a estas características, sugere-se o uso da RT-PCR como técnica complementar ao diagnóstico da Raiva.

Na ausência de laboratório de diagnóstico em alguns estados brasileiros, é inegável que em muitas regiões a raiva esteja sendo subnotificada ou confundida por outras

enfermidades. A ocorrência da raiva em animais silvestres é registrada de maneira esporádica, uma vez que não é comum o envio de materiais destes animais ao laboratório de diagnóstico, nem mesmo para fins de vigilância epidemiológica. Nesse quadro, a técnica de RT-PCR, pode tornar-se útil, uma vez que os laboratórios, mesmo distantes, podem receber amostras, visto que os resultados dessa técnica dependem menos da conservação das amostras.

Agradecimentos:

Ao Dr. Cláudio de Moraes Andrade pelo apoio ao desenvolvimento do estudo.

Ao Instituto Pasteur de São Paulo pelo apoio técnico-científico e financeiro.

Aos Médicos Veterinários: Enoch Vieira da Silva, Marlon Vicente da Silva, Maria Aparecida de Carvalho Patrício, Francisco Airton Nogueira e Nélio Batista de Moraes , pelo envio de amostras trabalhadas no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2. ed. Organización Pan-americana de la Salud, 1986. p. 502-526.

BORDIGNON, J; BRASIL dos ANJOS, G; BUENO, C. R. et al. Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. Arch. Virol., New York, v. 150, p.695-708, 2004.

BOURHY, H., KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. Virology, San Diego, v.194, p. 70-81, 1993a.

BOURHY, H., KISSI, B.; TORDO, N. Taxonomy and evolutionary studies on Lyssaviruses with special reference to Africa. Onderstepoort J. Vet. Res., Pretoria, v. 60, p.277-282, 1993b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Controle da raiva dos herbívoros. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2005a. 104 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão sobre Raiva dos Herbívoros. Brasília, 2005b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02 de jan.2006. Adaptação do texto do Dr. Fumio Honma Ito.

BRASIL-DOS-ANJOS, G. Padronização da reação de RT-PCR para o diagnóstico da raiva. 2003.126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

CARNIELI, P.J.; BRANDÃO, P.E.; CASTILHO, J.G. et al. Phylogeny of rabies Virus Identified in a cat closely related to vampire bat based on the nucleoprotein gene. Virus Reviews and Research. vol.10, p.50-54, 2005.

CASOS notificados de raiva humana no Brasil. Disponível em: <<http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/news/pptraivahumana.ipg>>. Acesso em: 02 jan. 2006.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Legislação & ética. São Paulo, [2004?]. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>. Acesso em: 07 fev. 2004.

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y. et al. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol., Washington, v.117, p.1117-1121, 1998.

DANTAS JUNIOR, J. V.; KIMURA, L. M. S.; FERREIRA, M. S. R. et al. Protocolo de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa para a detecção do vírus da raiva. Arq. Bras. Vet. Zoot., Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p.398-400, 2004.

DAVID, D.; YAKOBSON, B.; ROTENBERG, D. et al. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam. v. 87, p.111-118, 2002.

DEAN, D. J., ABLESET ALH, M. K.; ATANASUI, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies*, 4. ed. Geneva: WHO. p. 88-95. 1996.

GERMANO, P. M. L. Avanços na pesquisa da raiva. *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo, v. 28, n.1, p.86-91, 1994.

GOULD A. R.; HYATT A. D.; LUNT, R. et al. Characterisation of a novel Lyssavirus isolated from Pteropid bats K in Australia. *Virus Res.*, Amsterdam, v. 54, p.165-187, 1998.

HEATON, P.; McELHINNEY, L.M.; LOWINGS, J.P. - Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. *J. Virol. Meth.* 81: 63-69, 1999.

HEATON, P. R. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* Washington, v. 35, n. 11, p. 2762-2766, nov. 1997.

HEINEMANN, M. B.; FERNANDES-MATIOLI, F. M. C.; CORTEZ, A. et al. Genealogical analyses of rabies virus strains from Brazil base don N gene alleles. *Epidemiol. Infect.*, Cambridge, v.128, p. 503-511, 2002.

INSTITUTO PASTEUR. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Case report of post-exhumation human rabies in the city of São Paulo. *Rev.Saúde Pública*, vol.38, n.5, p.741-742, 2004.

ITO, M.; ARAI, Y. T.; ITOU, T. et al. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology*, San Diego, v. 284, p. 214-22, 2001.

KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMOKE, R. et al. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 167, n.1, p. 207-210, 1993.

KISSI, B., TORDO, N.; BOURHY, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*, San Diego, v. 209, p. 526-537, 1995.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y. et al. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.*, Tokyo, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.

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

MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. Laboratory techniques in rabies. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. 476 p.

ORCIARI, L. A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A. et al. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. *Vaccine*, Surrey, v. 19, p. 4511-4518, 2001.

PIERI, K. M. S. Caracterização de amostras de vírus rábico isoladas no Estado de Santa Catarina através da técnica de PCR de baixa estringência (LSSP-PCR). 2003. 82f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ROMIJN, P. C.; VAN der HEIDE, R.; CATTANEO, C. A. M. et al. Study of Lyssavirus of bat origin as a source of Rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro – Brazil. *Am. J. Tropical Med. Hyg.*, Baltimore, v. 69, p. 81-86. 2003.

RUPPRECHT, C.E.; HALON, C.A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.*, New York, v. 2, p. 327-343, 2002.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N.. PCR as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Molecular and Cellular Probes*, London, v.6, p. 229-240, 1991.

SCHAEFER, R.; BATISTA, H. B. R.; FRANCO, A. C. et al. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v.107, p.161-170, 2005.

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. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 8, p.1-4, 1973.

SMITH, J. S.; YAGER, P. A., ORCIARI, L. A. Rabies in wild and domestic carnivores of Africa: epidemiological and historical associations determined by limited sequence analysis. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, Pretoria, v. 60, p. 307-314. 1993.

SOARES, R. M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S. M. et al. A Heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 109-111, 2002.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 28-51.

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. *J. Wildlife Dis.*, Ames, v. 33, n. 4, p. 912-915, 1997.

