

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COMO RECURSO AO
DIAGNÓSTICO DA RAIVA****POLIMERASE CHAIN REACTION TECHNIC AS RESOURCE TO RABIES
DIAGNOSIS**

Leda Maria Silva Kimura¹
Joeler Vargas Dantas Junior²
Wlamir Correa Moura³

Ivanete Kotait⁴
Victor Augustus Marins⁵
Paulo Eduardo Brandão⁶

RESUMO – A Raiva é uma das doenças mais temidas entre as diferentes zoonoses que ameaçam o homem, pois evolui sempre para o aspecto letal, sendo sua morbidade praticamente igual à mortalidade. Acresce ainda que os prejuízos econômicos causados ao rebanho bovino assumem impacto geral na economia pecuária, reduzindo a produção de leite e carne e gerando implicações na área de saúde pública. O laboratório representa uma peça fundamental nesse contexto, visto que o êxito das medidas complexas de prevenção numa comunidade, como vacinação perifocal, ou a terapia vacinal no ser humano exposto, dependem de 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 virose, 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 a Raiva, nas provas clássicas e 4 negativas nessas mesmas provas. A técnica de RT-PCR foi aplicada nestes 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.

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 cattle raising 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 vaccinal therapy in exposed humans, depend on the rapidity and realizability 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 the 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.

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

KEY WORDS – Rabies, RT-PCR, diagnosis.

¹ Médica-veterinária – Laboratório de Biologia Animal – PESAGRO/RJ. lkimura@pesagro.rj.gov.br. Al. São Boaventura, 770 – CEP 24120-191, Niterói, RJ.

² Biólogo – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCOS – FIOCRUZ). Cx. Postal 926, Manguinhos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ.

³ Médico-veterinário – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCOS – FIOCRUZ). Cx. Postal 926, Manguinhos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Médica-veterinária – Instituto Pasteur de São Paulo. Av. Paulista, 393, CEP 01311-000, São Paulo.

⁵ Médico-veterinário – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo (USP). Av. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo, SP.

INTRODUÇÃO – A Raiva tem estado presente no território nacional, podendo ser considerada endêmica, em grau diferenciado, de acordo com a região. No período de 1996-2004, foram notificados 29.969 casos da zoonose em diferentes espécies animais (Brasil, 2005b). Em relação à Raiva humana, no período de 1996 a 1999, o número de ocorrências manteve-se numa média de 26 casos/ano. No ano de 2000, foram notificados 28 óbitos, 21 em 2001 e 7 em 2002. Em 2003, foram registrados 17 óbitos humanos, sendo o cão o animal agressor de maior destaque, contrastando com o ano seguinte, em que o morcego hematófago foi responsável por 23 dos 29 casos em humanos (Casos..., 2006). A importância econômica da virose está relacionada à sua ocorrência em animais produtores de alimentos. A Raiva dos herbívoros, principalmente em bovinos, transmitida por morcego hematófago, representa importante limitação ao desenvolvimento da pecuária nacional. Devido à gravidade da doença, evoluindo sempre para o desfecho 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 utilizada no diagnóstico é a IFD, recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). O teste de IFD apresenta resultados confiáveis em poucas horas, quando realizado com 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 o foco é o

diagnóstico. A PB, detecta a infecção da amostra, mediante a inoculação da suspensão em sistemas biológicos e permite também o isolamento do agente. É utilizado concomitantemente como 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 patogenicidade 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 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 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. Esses autores propuseram a técnica de RT-PCR para uso em rotina laboratorial no diagnóstico da Raiva e para estudos epidêmicos do vírus rábico, conseguindo demonstrar a praticidade e a confiabilidade dessa 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 rotineiro da Raiva. Os produtos gerados por esta técnica permitem a caracterização genética pelo seqüenciamento

de áreas limitadas do genoma viral.

MATERIAIS E MÉTODOS –

Vírus de referência. As amostras virais padrão utilizadas no presente estudo foram: Challenge Standard Vírus (CVS31.2), 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 do SNC de mamíferos domésticos apresentando quadro neurológico sugestivo da Raiva, encaminhadas para diagnóstico da 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 negativos, também foram testadas. (Quadro 2). As amostras enviadas de laboratórios de outros estados do Brasil vieram com diagnósticos positivos para Raiva. Com a finalidade de padronização em nossos experimentos, todas as amostras 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 foi cedido pelo Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman.

Prova Biológica (PB). A prova biológica seguiu a metodologia descrita por Koprowski (1996). As amostras, após a trituração em gral, foram diluídas a 10% em PBS, contendo penicilina G potássica e sulfato de estreptomicina, centrifugadas por 54 minutos a 600g. o sobrenadante foi

coletado como inóculo. Camundongos albinos, com 21 dias de idade, foram inoculados com 0,03mL desse sobrenadante, via intracerebral e observados por um período de até 30 dias. Foram utilizados 10 animais por amostra. Os animais mortos, que apresentaram 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 da 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 1x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/μL de cada primer (504 e 304) (Quadro 1) e 200U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para uma reação final de 20μL, realizada a 42°C/60'. Dez microlitros de cada respectivo cDNA foram adicionados ao mix de PCR contendo 1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada primer (504 e 304), 1,5mM MgCl₂, 25 μL água ultrapura e 1,25U Taq DNA polymerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50μL e submetidos a uma desnaturação inicial de 94°C/2' seguidos de 40 ciclos de 94°C/30", 37°C/30" e 72°C/1,5', finalizando com uma extensão final de 72°C/7'. 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. (Fig. 1).



Fig. 1: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio 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).

Quadro 1 – Sequência dos “primes” 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			

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 2 – 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	Jaquariaiva-PR	Positiva	Positiva	Positiva
21	Bovina	2003	Camapuã-MS	Positiva	Positiva	Positiva
22	Sagüi	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	S.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 da Raiva. Segundo Rupprech et al., (2002), as técnicas moleculares têm se mostrado eficientes e seu uso em conjunto com outras técnicas já estabelecidas, como a imunofluorescência direta, pode reduzir o número de diagnósticos falso-negativos, aumentando a sensibilidade e especificidade dos testes. Já em 1991, Sacramento et al., encontraram 100% de concordância entre os resultados dessas mesmas técnicas. 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 pela Raiva e de quirópteros de regiões com focos recentes da virose enviados para laboratório), observaram que essas também se apresentaram positivas pela técnica molecular. Nenhuma amostra bovina suspeita que se apresentou negativa pelas técnicas tradicionais, revelou-se positiva pela RT-PCR, corroborando com os resultados aqui apresentados. Apesar de a Organização Mundial de Saúde não preconizar a RT-PCR como ferramenta para o diagnóstico da Raiva, diversos autores afirmam a sua grande 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 a finalidade de pesquisa genética e diagnóstico (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; Schaefer et al., 2005; Kobayashi, et al., 2005). Comparações da PCR com a IFD, avaliando principalmente amostras em decomposição, demonstraram a diminuição de sensibilidade da imunofluorescência direta. A RT-PCR comprovou ser capaz de amplificar a seqüência gênica alvo de amostras de tecido cerebral expostas 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). Em nossos estudos, os materiais 24, 27 e 28, provenientes da Paraíba e de Sergipe, até serem enviados para fazer parte desse estudo estavam perfeitamente estocados em freezer a -20°C, sendo que o diagnóstico efetuado no Instituto Parreiras Horta, em Aracaju apresentou resultados positivos na IFB e PB. Problemas operacionais ocorridos no aeroporto acarretaram demora na liberação dos materiais, ocasionando estado avançado de putrefação nessas amostras. Assim sen-

do, no reteste realizado os materiais 27 e 28 apresentaram resultados negativos na IFD e não foi possível inoculação em camundongos. A amostra 24, apesar de apresentar IFD positiva, também não foi possível a inoculação em camundongos, mas a RT-PCR apresentou-se positiva. Apesar do número reduzido de amostras em putrefação analisadas, consideramos o resultado indicativo de que a RT-PCR pode ser utilizada em amostras putrefeitas, corroborando com os resultados apresentados pelos diversos autores citados. Tordo (1996), sugere o método de RT-PCR para diagnóstico laboratorial de rotina, evidenciando a importância desta técnica para estudos de epidemiologia molecular. Em acordo com ele, os autores do presente estudo demonstraram que esta técnica obteve 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. Segundo Brasil-dos-Anjos (2003), 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. 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. 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). Considerando a sensibilidade e especificidade, bem como a habilidade de detectar vírus em amostras bastante decompostas, uma situação comum em países tropicais como o nosso, 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 com outras doenças. 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 tomar-se útil, uma vez que os laboratórios, até os distantes, podem receber materiais, já que os resultados dessa técnica dependem menos da conservação as 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

Enock Vieira da Silva, Marlon Vicente da Silva, Maria Aparecida de Carvalho Patrício e Francisco Airton Nogueira, pela remessa das amostras contempladas no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2. ed. Organización Panamericana 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/DAS, 2005a. 104p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão sobre Raiva dos herbívoros. Brasília, 2005b. disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02 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.

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.coba.org.br>>. Acesso em 07 fev 2004.

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, et al. Intravitam 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., AMND ATANASUI, P. The fluorescent antibody test. In: MSLIN, 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. Characterization of a novel Lyssavirus isolated from Pteropid bats K in Australia. *Virus Res*, Amsterdam, v. 54, p. 165-187, 1998.
- 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 based on N gene alleles. *Epidemiol. Infect.*, Cambridge, v.128, p.503-511, 2002.
- 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. 476p.
- 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 estríngência (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.; BOOURHY, 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.