UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PATOLOGIA DAS DOENÇAS TROPICAIS

Livia Medeiros Neves Casseb

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA RAIVA, CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E GENÉTICA DE CEPAS DO *VÍRUS DA RAIVA* ISOLADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Belém
2009

Livia Medeiros Neves Casseb

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA RAIVA, CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E GENÉTICA DE CEPAS DO *VÍRUS DA RAIVA* ISOLADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará.
Área de Concentração: Microbiologia
Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Co-orientadora: Drª. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa

Belém
2009

Livia Medeiros Neves Casseb

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA RAIVA, CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E GENÉTICA DE CEPAS DO *VÍRUS DA RAIVA* ISOLADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará.
Área de Concentração: Microbiologia
Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Co-orientadora: Drª. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa

Data de aprovação: 27/10/2009

Banca examinadora:

_____- Orientador
Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Doutor
Instituto Evandro Chagas

_____
Rita Catarina Medeiros de Souza
Doutora
Universidade Federal do Pará (UFPA)

_____
Hélio Langoni
Doutor
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu

_____
Márcio Roberto Teixeira Nunes
Doutor
Universidade Federal do Pará (UFPA)

À Deus, aos meus pais e irmãs, ao meu marido e filhos, dedico esta Monografia.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à Deus, aos meus pais e familiares que sempre me apoiaram para que este dia chegasse, mesmo que com broncas ou reclamações, as orientações sempre foram para o crescimento moral, espiritual e profissional.

À família que construí, meus filhos (Iago Manssour e Hugo), por aturarem todas as minhas irritações até a finalização deste trabalho.

À Alexandre Casseb, que além de marido contribuiu muito para minha formação profissional.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) na pessoa da diretora Drª. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos, por gentilmente fornecer as amostras e dados utilizados no estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos que aceitou me orientar e me incentivou para conclusão deste trabalho.

À co-orientadora Drª. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa, minha orientadora de laboratório, com quem aprendi todas as técnicas empregadas no diagnóstico da Raiva. E, por sua demonstração de amizade e carinho adquiridos após anos de trabalho juntas.

Ao Armando Pereira, que além de amigo é técnico do Laboratório de Raiva, por todos os ensinamentos e companheirismo.

Aos técnicos e companheiros de laboratório, Carlos Vieira e Mário Ferro, que sempre estiveram presentes.

À Taciana Barbosa, que colaborou comigo na execução deste trabalho, principalmente no que diz respeito às técnicas moleculares, e ainda por ter aceitado dividir comigo algumas responsabilidades externas ao laboratório de raiva.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular, que por muitas vezes colocaram-se a disposição para ajudar, em especial à Adriana Ribeiro, Mayra Silva e Clayton,.

Ao Núcleo de Sequenciamento e Bioinformática da SAARB/IEC, principalmente ao colega Samir Mansour Casseb e, que foi responsável pelo sequenciamento das amostras utilizadas neste trabalho.

À Daniele Medeiros, que colaborou ao extremo para conclusão deste trabalho, principalmente no que diz respeito às análises filogenéticas.

Ao Dr. Márcio Nunes que colaborou grandemente com as análises filogenéticas e avaliação do trabalho.

Aos membros da banca examinadora Professores Doutores Hélio Langoni, Márcio Nunes, Rita Medeiros que fizeram colocações muito importante e que com certeza engrandeceram esse trabalho.

À Daniele Henriques minha companheira de mestrado, por todo o apoio em disciplinas que fizemos juntas.

À Jannifer Chiang pelo auxílio despendido na elaboração de algumas fotos.

Aos demais servidores, contratados e estagiários da SAARB/IEC, pelo ambiente familiar e de confraternização que é mantido na seção, em especial ao “Clube da Luluzinha” que cria um ambiente descontraído em cada uma de suas reuniões.

Ao Dr. Wilson Uieda e Fernanda Andrade, pelos ensinamentos para identificação de espécies de quirópteros e pela identificação dos morcegos mencionados nessa dissertação.

Ao Dr. Nelson Ribeiro, pela identificação de alguns morcegos mencionados nessa dissertação.

E à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Nunca desesperes face às mais sombrias aflições de tua vida, pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda.”

Provérbio chinês

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a epidemiologia da raiva, procedimentos complementares ao diagnóstico - caracterização antigênica e genética - foram incluídos neste estudo para investigar o perfil epidemiológico da raiva animal na Amazônia brasileira, entre janeiro de 2000 e julho de 2009. Foi realizada uma revisão cuidadosa das informações de amostras do sistema nervoso central (SNC) recebidas e analisadas no Laboratório de Raiva do Instituto Evandro Chagas. Um total de 265 cepas de vírus rábico isoladas de amostras do SNC de seres humanos (n=33) e animais domésticos/silvestres (n=232) foram caracterizadas antigenicamente por imunofluorescência indireta (IFI), utilizando um painel de oito anticorpos monoclonais preparados pelo CDC contra a nucleoproteína do vírus da raiva; Além disso, 21 delas tiveram a nucleoproteína (gene N) caracterizada geneticamente por sequenciamento nucleotídico parcial seguida de análise filogenética. As sequências obtidas foram comparadas entre si e com outras sequências de vírus da raiva do Brasil e outros países das Américas, utilizando os métodos de máxima verossimilhança e bayesiano. Foi observada uma menor transmissão do vírus da raiva em áreas urbanas; detecção do ciclo rural da raiva em quase todos os estados da Amazônia; ocorrência do ciclo aéreo nos estados do Pará e Amapá; identificação da variante antigênica 2 (AgV2) do vírus da raiva, entre cães e gatos domésticos como o principal mecanismo de transmissão viral, detecção de circulação de variantes antigênicas AgV3, AgV4 e variante "*Eptesicus*" entre animais silvestres e, finalmente, a redução da transmissão cão-homem do vírus da raiva, que foi substituído por um aumento da transmissão morcego-homem, especialmente no estado de Pará. Em conclusão, a associação de técnicas antigênica e moleculares permitiu uma melhor compreensão da epidemiologia molecular do vírus da raiva na Amazônia Brasileira:

Palavras Chave: *vírus da Raiva*, Amazônia brasileira, Caracterização Antigênica, Caracterização Genética, Epidemiologia Molecular.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the epidemiology of rabies, new diagnostic procedures – antigenic and genetic characterization - were included in this study to investigate the epidemiologic profile of animal rabies in the Brazilian Amazon region, between January 2000 and July 2009. A careful revision of information of Central Nervous System (CNS) samples received and examined at Rabies Laboratory of Instituto Evandro Chagas was performed. A total of 265 rabies virus strains isolated from CNS samples of humans (33) and domestic/sylvatic animals (232) were antigenically characterized by indirect immunofluorescent assay (IFA) using a panel of eight monoclonal antibodies against the rabies virus nucleoprotein produces by the CDC; moreover, from 21 of them the nucleoprotein (gene N) was partially characterized by nucleotide sequencing followed by phylogenetic analyzes. Obtained sequences were compared internally and with other rabies virus sequences from Brazil and other American countries, using the Bayesian and maximum likelihood methods. It was observed a lower transmission of rabies virus in urban areas; the detection of the rural cycle of rabies in almost all Amazonian states; the occurrence of aerial rabies cycle in Pará and Amapá states; identification of rabies virus variant 2 (AgV2) among domestic dogs and cats as the main viral transmission mechanism; detection of circulating antigenic variants AgV3, AgV4 and "*Eptesicus*" variant in sylvan animals; and finally, reduction of dog-to-man transmission of rabies virus which was replaced by an increasing of bat-to-man transmission cycle, especially in Pará state. In conclusion, the association of antigenic and molecular techniques resulted in a better understanding of rabies molecular epidemiology in the Amazon region

Keywords: *Rabies virus*, Brazilian Amazon, antigenic characterization, genetic characterization, Molecular Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pág.

Figura 1. Análise filogenética comparativa entre integrantes da família *Rhabdoviridae* e *vírus Itacaiunas* e *Curionopolis* baseada nas sequências nucleotídicas parciais do gene N, utilizando o método NJ. Proposta da formação do gênero *Bracorhabdovirus*, ainda não aprovada pelo ICTV, com. números adjacentes a cada ramo representam o percentual de *bootstrap* calculado para 2000 repetições. Escala: barra representa 10% de divergência na sequência nucleotídica..... 24

Figura 2. Ilustração esquemática do VRab mostrando glicoproteínas de superfície que envolvem o complexo RNP..... 28

Figura 3. Esquema ilustrativo do genoma do v*írus da Raiva*..... 28

Figura 4. Ciclos de transmissão da raiva 33

Figura 5. Raiva humana por espécie agressora, Brasil, 1986 a 2009*..... 34

Figura 6. Patogênese da infecção pelo VRab..... 35

Figura 7 Esquema ilustrativo da recepção, entrada, transcrição, tradução, replicação e saída de partículas virais. 36

Figura 8. Microisoladores (gaiolas) de acrílico com tampa de aço cromado, em Racks de exaustão mantidos no infectório NBA-3..... 48

Figura 9. Inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos..... 49

Figura 10. Amostras positivas de animais do estado do Pará diagnosticadas no IEC, entre janeiro de 2000 e julho de 2009..... 71

Figura 11. Número de casos de raiva em carnívoros domésticos entre janeiro de 2000 e julho de 2009..... 75

Figura 12. Mapa da região Amazônica, mostrando os estados e municípios de procedência das cepas do VRab isoladas de carnívoros domésticos caracterizadas antigenicamente de acordo com o número de amostras positivas testadas..... 78

Figura 13. Mapa da região Amazônica, mostrando os estados e municípios de procedência das cepas do VRab isoladas de herbívoros domésticos e animais silvestres caracterizadas antigenicamente de acordo com o número de amostras positivas testadas..... 80

Figura 14. Mapa da região Amazônica, mostrando os estados e municípios de procedência das cepas do VRab isoladas de humanos caracterizadas antigenicamente de acordo com o número de amostras positivas testadas..... 82

Figura 15. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etidium, mostrando amplicons do gene N do VRab das amostras NC e VLab..... 84

Figura 16. Árvore filogenética com sequências parciais do gene N (450 nt) pelo método de MV com cálculo de *Bootstrap* baseado em 1.000 pseudoréplicas. Dentro dos parênteses estão representados os valores do método Bayesiano. Observa-se a formação de dois grupos principais, Quirópteros e Carnívoros, e subdivisão em clados relacionado ás variantes antigênicas, sendo os *vírus Duvenhage* e *vírus Mokola* utilizados como grupo externo. Em vermelho, destacam-se as amostras deste estudo. As demais cepas do VRab estão denominadas de acordo com o hospedeiro, número de acesso do GenBank e país de isolamento, respectivamente.... 88

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, de acordo com estado, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009..... 67

Tabela 2. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Acre, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009..... 68

Tabela 3. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e animais, do estado do Amapá, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009..... 69

Tabela 4. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Amazonas, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009..... 70

Tabela 5. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Maranhão, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009..... 71

Tabela 6. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Pará, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009..... 72

Tabela 7. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado de Rondônia, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009..... 74

LISTA DE QUADROS

		Pág.
Quadro 1.	Gêneros e espécies da família *Rhabdoviridae* que infectam mamíferos.....	25
Quadro 2.	Padrões de reação das diferentes variantes antigênicas com os anticorpos monoclonais (MATTOS, MATTOS, 1998; NADIN-DAVIS, 2007).....	53
Quadro 3.	Iniciadores utilizados no protocolo de RT-PCR para amplificação do genoma do vírus rábico.....	58
Quadro 4.	Reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar do vírus rábico.....	59
Quadro 5.	A PCR para a amplificação do cDNA do vírus rábico.....	60
Quadro 6.	Espécies de morcegos com diagnostico positivo de raiva no IEC, provenientes do estado do Pará e hábito alimentar.....	73
Quadro 7.	Perfis de leitura das amostras não compatíveis com o painel de anticorpos monoclonais.....	76
Quadro 8.	Amostras selecionadas para caracterização genética.....	83
Quadro 9	Cepas de VRab utilizadas na análise filogenética de acordo com os hospedeiros, origem geográfica, ano de isolamento e variantes antigênicas.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
®	Marca registrada
° C	Graus Celsius
?	Sem informação
~	Aproximadamente
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
µL	Microlitro
µM	Micromolar
X^2	Teste do qui-quadrado
α	Alfa
β	Beta
Ψ	Pseudogene
A	Adenina
a.C.	Antes de Cristo
aa	Aminoácidos
AC	Estado do Acre
AcM	Anticorpos monocloais
AIC	Critério de informação Akaike
AM	Estado do Amazonas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bov	Bovino
BRA	Brasil
C	Citosina
C-	Controle negativo
CAN	Canadá
Cao	Canino
CCN	Cérebro de camundongo normal

CDC	*Centers for Diseases Control and Prevention*
cDNA	DNA complementar
CEPAN	Comitê de ética em pesquisas com animais
CGDT	Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis
CHI	Chile
cm^2	Centímetro quadrado
COVEV	Coordenação de Vigilância das doenças transmitidas por vetores e Antropozoonoses
Cth	*Cerdocyon thous*
CVS	*Challenger Virus Standard*
Da	Dáltons
ddATP	Dideoxinucleotídeo adenosina trifosfato
ddCTP	Dideoxinucleotídeo citosina trifosfato
ddGTP	Dideoxinucleotídeo guanidina trifosfato
ddTTP	Dinucleotídeo timidina trifosfato
DEVEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica
DL_{50}	Dose letal suficiente para matar 50% dos camundongos
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Dinucleotídeos trifosfato
EDTA	Etilenodiamino ácido tetra acético
EMEM	*Eagle Minimum Essential Medium*
Eq	Eqüino
EQD	Equador
EUA	Estados Unidos da América
Fel	Felino
Fer	Ferret
G	Guanina
GC%	Percentual de guanina e citosina
GFR	Guiana Francesa
Gl	Glicoproteína
Gp	Gliocoproteínas
hnRT-PCR	heminested-RT-PCR
Hum	Humano

i.c.	Intracerebral
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	International Commitee on Taxonomy of Viruses
IEC	Instituto Evandro Chagas
IF	Imunofluorescência
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
Ira	Irara
KDal	Quilo Dálton
Km^2	Quilometro quadrado
L	RNA-polimerase
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LCR	Líquido céfalo raquidiano
Lin	Lince
M	Proteína matriz
MA	Estado do Maranhão
mA	Miliamper
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCMC	*Markov Chain Monte Carlo*
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	Micrômetros
mM	Milimolar
MP	Máxima parcimônia
MS	Ministério da Saúde
MV	Máxima verossimilhança
MX	México
N	Nucleoproteína
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NBA-3	Nível biológico de segurança animal 3
NC	Variante antigênica não compatível com o painel de AcM
Ng	Nanogramas

NJ	Agrupamento de vizinhos (*Neighbor Joining)*
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
P	Fosfoproteína
p	Valor obtido no teste estatístico
P.A.	Puro para análise
p.i.	Período de incubação
PA	Estado do Pará
PANAFTOSA	Centro Pan-Americano de Febre Aftosa
pb	Pares de bases
PB	Prova biológica
pH	Potencial de hidrogênio
PM	Peso molecular
pmoles	Picomoles
PPTM	Padrão de Peso e Tamanho Molecular
Pri	Primata
Quir	Quiróptero
Rap	Raposa
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RNP	Ribonucleocapsídio helicoidal
RO	Estado de Rondônia
rpm	Rotações por minuto
RT	Reação de transcrição reversa
RT-PCR	Reação de cadeia mediada pela polimerase precedida por uma transcrição reversa
SAARB	Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
SACPA	Seção de Criação e Produção de Animais
SESPA	Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso Periférico
SST	Solução salina tamponada

SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T	Timina
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris EDTA
TmA	Temperatura de anelamento
Tris-HCL	Tris ácido clorídrico
U/μL	Unidade por microlitro
UF	Unidade federativa
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNESP	Universidade Estadual Paulista
V	Volts
VABL	*Australian bat lyssavirus*
VAg	Variante antigênica
VARA	*vírus Aravan*
VDUV	*vírus Duvenhage*
VEBL-1	*European bat lyssavirus* tipo-1
VEBL-2	*European bat lyssavirus* tipo-2
VIRK	*vírus Irkut*
VKHU	*vírus Khujand*
VLab	Variante laboratorial
VLB	*virus Lagos bat*
VMOK	*vírus Mokola*
VRab	*vírus da Raiva*
VWCB	*vírus West caucasian bat*

SUMÁRIO

		Pág.
RESUMO		7
ABSTRACT		8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES		9
LISTA DE TABELAS		11
LISTA DE QUADROS		12
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS		13
1	**REVISÃO DE LITERATURA**	21
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	21
1.2	AMAZÔNIA	23
1.3	O VÍRUS DA RAIVA	23
1.4	EPIDEMIOLOGIA	29
1.5	PATOGENIA	36
1.6	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	38
1.7	TRATAMENTO	40
2	**JUSTIFICATIVA**	41
3	**OBJETIVOS**	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	45
4.1	LEVANTAMENTO DE DADOS	45
4.1.1	**Amostras de humanos e animais analisadas pelas técnicas de IFD e PB no período de janeiro de 2000 a julho de 2009**	45

4.1.2 Identificação dos quirópteros positivos para o VRab..... 45
4.1.3 Caracterização Antigênica..... 46
4.2 CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE CEPAS DO VRab..... 46
4.2.1 Re-isolamento viral de cepas do VRab..... 46
4.2.2 Teste de imunofluorescência indireta (IFI) para caracterização antigênica de cepas do VRab..... 50
4.2.2.1 Amostras..... 50
4.2.2.2 Fundamento da técnica..... 50
4.2.2.3 Procedimentos da técnica segundo Mattos e Mattos (1998)..... 51
4.2.2.4 Anticorpos monoclonais (AcM)..... 53
4.2.2.5 Titulação do conjugado anti-camundongo..... 54
4.2.2.6 Critérios para repetição do teste..... 55
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 55
4.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DO VRab PELO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE N..... 56
4.4.1 Extração do Ácido Nucléico pelo método do Reagente Trizol LS..... 57
4.4.2 Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR)..... 58
4.4.2.1 Iniciadores específicos..... 58
4.4.2.2 RT-PCR 59
4.4.2.3 Visualização do produto da RT-PCR..... 60
4.4.3 Purificação do cDNA..... 61
4.4.4 Sequenciamento nucleotídico..... 62
4.4.5 Análise filogenética..... 64

5 RESULTADOS..... 66

6 DISCUSSÃO..... 90

7 CONCLUSÕES..... 109

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 111

APÊNDICES..... 131

APÊNDICE A Lista de re-isolamentos de cepas do VRab obtidos e utilizados nesse trabalho de acordo com ano de obtenção, município e estado de origem..... 132

APÊNDICE B Resultados obtidos pela caracterização antigênica através do painel de AcM de cepas do VRab isoladas na Amazônia brasileira pelo IEC, no período de janeiro de 2000 a julho de 2009..... 136

ANEXOS..... 143

ANEXO A Procedimentos da técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) (LARGHI, 1975) utilizada no laboratório de diagnóstico de raiva da SEARB/IEC/MS/SVS..... 144

ANEXO B Procedimentos da Prova Biológica (KOPROWSKY, 1996) utilizada no laboratório de diagnóstico de raiva da SEARB/IEC/MS/SVS..... 149

ANEXO C Cópia da autorização da diretoria do IEC, para o processamento das amostras utilizadas neste trabalho.... 150

ANEXO D Parecer de aprovação no Comitê de ética em pesquisas com animais (CEPAN) / IEC / SVS / MS..... 151

ANEXO E Modelo de protocolo para testes de IFI (utilizado no laboratório de diagnóstico de raiva da SEARB/IEC/MS/SVS)..... 152

ANEXO F Soluções e reagentes utilizados nas técnicas de diagnóstico, utilizados no laboratório de diagnóstico de raiva da SEARB/IEC/MS/SVS..... 153

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A raiva é uma doença infecciosa aguda, causada por um vírus, que compromete o sistema nervoso central (SNC) e que se caracteriza por quadro de encefalite. Pode acometer todas as espécies de mamíferos, incluindo a humana, sendo seu prognóstico fatal em praticamente todos os casos. É uma zoonose por ter como hospedeiros, reservatórios e transmissores, mamíferos silvestres ou domésticos, que podem transmitir a doença aos seres humanos e demais mamíferos susceptíveis (REZENDE et al., 1997; REICHMANN, 2000; ITO et al., 2003; TAKAOKA, 2003), por soluções de continuidade no tegumento produzidas por mordedura ou arranhadura de animais ou pessoas infectadas (NOVA, RENGELL, HINRICHSEN, 2002).

Até alguns anos, considerava-se que a raiva possuía três ciclos: urbano, rural e silvestre. No entanto, atualmente, outro ciclo tem sido descrito entre os morcegos (espécies hematófagas ou não), denominado ciclo aéreo (TAKAOKA et al., 2003). A raiva continua sendo um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento, principalmente, a forma transmitida por cães e gatos, mantendo-se a cadeia de transmissão animal doméstico/homem em áreas urbanas (BRASIL, 1998; OPS, 2007). Tanto para esses países, quanto para países desenvolvidos, a raiva representa uma sobrecarga econômica, face aos onerosos gastos com tratamento pós-exposição, diagnóstico e estudos epidemiológicos,

imunizações de animais domésticos e controle da população de animais silvestres (REZENDE et al., 1997; BRASIL, 2008).

Segundo Machado (1994), o diagnóstico laboratorial *in vivo* baseia-se no isolamento do vírus a partir da saliva e, mais raramente, do líquido cefalorraquidiano e urina, podendo ainda se demonstrar a presença de antígenos do vírus em células da córnea, obtidas por esfregaço e coradas por anticorpos específicos em testes de imunofluorescência (IF); e também no bulbo piloso pela técnica de RT-PCR (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006; TRIMARCHI, NADIN-DAVIS, 2007); no entanto, resultados negativos não excluem a raiva como causa da doença se o diagnóstico clínico é indicativo da virose, e nesses casos, está indicada a pesquisa de vírus em material do SNC obtido após a morte (BRASIL, 2008).

A raiva possui muitas interfaces entre os mundos humano e animal. Portanto, a vigilância epidemiológica da doença guarda estreita relação entre o tratamento de pessoas expostas e as atividades de controle da raiva animal. A ênfase unilateral (ou na área humana ou animal) leva a que não se perceba os fatores determinantes da doença e, consequentemente, perca-se a qualidade das intervenções (BRASIL, 2005a). Sem dúvida, um caso de raiva humana representa a falência de um sistema de saúde (BRASIL, 1998), demonstrada pela falta de capacidade de ação em nível local, quando se trata de áreas afastadas dos centros de atenção à saúde (PANAFTOSA, 2007).

1.2 AMAZÔNIA

A Amazônia representa uma grande região natural ao norte da América do Sul formada pela bacia do Rio Amazonas e recoberta pela maior floresta equatorial do mundo; divide-se em matas de terra firme, matas de várzea e matas de igapó (KOOGAN; HOUAISS, 2000), e atinge parte do território de nove países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru, República da Guiana, Suriname e Venezuela (KOOGAN; HOUAISS, 2000; PORTALAMAZONIA, 2008). A Amazônia brasileira abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, compreendendo uma área de 5.033.072 Km^2, ou seja, 61% do território brasileiro (PORTALAMAZONIA, 2008)[1].

1.3 O *VÍRUS DA RAIVA*

A raiva é causada por um vírus cujo genoma é constituído por ácido ribonucléico (RNA), membro da ordem *Mononegavirales,* família *Rhabdoviridae* do gênero *Lyssavirus.* A família *Rhabdoviridae*, é composta de seis gêneros: *Lyssavirus, Vesiculovirus, Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus, Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus* (ICTV, 2005; LYLES; RUPPRECHT, 2007) e o *Bracorhabdovirus*, tentativa de novo gênero (DINIZ et al, 2006; 2008), afora dezenas de vírus não classificados em gêneros (figura 1).

[1] http://portalamazonia.globo.com/artigo_amazonia_az.php?idAz=134

Figura 1. Análise filogenética comparativa entre integrantes da família *Rhabdoviridae* e *vírus Itacaiunas* e *Curionopolis* baseada nas sequências nucleotídicas parciais do gene N, utilizando o método NJ. Proposta da formação do gênero *Bracorhabdovirus*, ainda não aprovada pelo ICTV, com. números adjacentes a cada ramo representam o percentual de *bootstrap* calculado para 2000 repetições. Escala: barra representa 10% de divergência na sequência nucleotídica.
Fonte: DINIZ et al, 2006

Até o início da década de 1970 considerava-se o *vírus da Raiva* como uma unidade antigênica. Atualmente, sabe-se que o gênero *Lyssavirus* tem sete genótipos (VAN REGENMORTEL et al., 2000; ICTV, 2005), sendo o genótipo I o *vírus da Raiva* clássico (VRab); o genótipo II, o *vírus Lagos bat* (VLB); genótipo III, *vírus Mokola* (VMOK); genótipo IV, *vírus Duvenhage* (VDUV); genótipo V, *vírus European bat lyssavirus 1* (VEBL-1); genótipo VI, *vírus European bat lyssavirus 2* (VEBL-2) (MARSTON et al., 2007); e genótipo VII, *vírus Australian bat lyssavirus* (VABL) (POUNDER, 2003); há ainda cinco variantes virais que tem sido sugerido constituírem novos genótipos de *Lyssavirus* (KUZMIN et al., 2005; LYLES; RUPPRECHT, 2007), a variante *vírus Aravan*, *vírus Khujand* (KUZMIN et al., 2003;

2005), *vírus Irkut*, *vírus West caucasian bat* (VWCB) (BOTVINKIN et al., 2003) e *vírus Rochambeau* (ICTV, 2005) (quadro 1).

Quadro 1: Gêneros e espécies da família *Rhabdoviridae* que infectam mamíferos.
(continua)

Virus	Fontes ou reservatórios	Localização geográfica
Gênero *Lyssavirus*		
vírus da Raiva	Canídeos domésticos e selvagens, mustelídeos, viverrídeos e morcegos	Em todo o mundo, exceto Austrália, Antártida, e algumas ilhas
virus Lagos bat	Morcegos frugívoros (*Megachiroptera*)	Africa
virus Mokola	Provavelmente morcegos insetívoros e roedores	Africa
virus Duvenhage	Provavelmente morcegos insetívoros	Africa
European bat lyssavirus 1	morcegos insetívoros	Europa
European bat lyssavirus 2	morcegos insetívoros	Europa
Australian bat lyssavirus	morcegos frugívoros (*Megachiroptera*) e insetívoros	Australia
vírus Rochambeau†		
vírus Aravan†	*Myotis blythi*	Quirguistão-Ásia central
vírus Khujand†	*Myotis mystacinus*	Tajiquistão
vírus Irkut†	*Murina leucogaster*	Sibéria Oriental
vírus West caucasian bat†	*Miniopterus schreibersi*	Montanhas do Cáucaso
Gênero *Vesiculovirus*		
VSV-Indiana	Cavalos, bovinos, suínos, mosquitos, flebotomíneos	Mexico, Américas central e do Sul
VSV-New Jersey	Cavalos, bovinos, suínos, mosquitos, flebotomíneos	Mexico, Américas central e do Sul
VSV-Alagoas	Mamíferos, flebotomíneos	América do Sul
vírus Piry	Mamíferos	América do Sul
vírus Cocal	Mamíferos, mosquitos e ácaros	América do Sul
vírus Carajás	Mamíferos, flebotomíneos	América do Sul
vírus Maraba	Mamíferos, flebotomíneos	América do Sul
vírus Isfahan	flebotomíneos, carrapatos	Asia
vírus Chandipura	Mamíferos, flebotomíneos	Asia
vírus BeAn 157575†		
vírus Boteke†		
vírus Calchaqui†		
Eel virus American†		
vírus Gray Lodge†		
vírus Jurona†		
vírus Klamath†		
vírus Kwatta†		

(conclusão)

Virus	Fontes ou reservatórios	Localização geográfica
vírus La Joya†		
vírus Malpais Spring†		
vírus Mount Elgon bat†		
vírus Perinet†		
Pike fry rhabdovirus†		
vírus Porton†		
vírus Radi†		
vírus Tupaia†		
Ulcerative disease rhabdovirus†		
vírus Yug Bogdanovac†		
Gênero *Ephemerovirus*		
vírus da Febre efêmera bovina	Bovinos, búfalos, mosquitos, *Ceratopogonidae*	Africa, Asia, Australia
vírus Adelaide River	Bovinos, búfalos, mosquitos, *Ceratopogonidae*	Australia
vírus Berrimah	Bovinos, dípteros?	Australia
vírus Kimberley†		
vírus Malakal†		
vírus Puchong†		
Gênero *Bracorhabdovirus*‡		
vírus Itacaiunas		Amazônia Brasileira
vírus Curionopolis		Amazônia Brasileira
Algumas espécies sem gênero		
vírus Bahia Grande		
vírus Muir Springs		
vírus Reed Ranch		
vírus Flanders		
vírus Hart Park		
vírus Kamese		
vírus Mosqueiro		
vírus Mossuril		
vírus Barur		
vírus Fukuoka		
vírus Kern Canyon		
vírus Nkolbisson		
vírus Le Dantec		
vírus Keuraliba		
vírus Connecticut		
vírus New Minto		
vírus Sawgrass		
vírus Chaco		
vírus Sena Madureira		
vírus Timbo		

† Tentativa de espécie no gênero; ‡ Sugestão de gênero; VSV: vírus da Estomatite vesicular
Fonte: ICTV, 2005, p. 629-640; LYLES; RUPPRECHT, 2007, p. 1364 (tradução nossa);

Com morfologia de bala de revólver, o VRab, possui dimensões de 75 nm de diâmetro por 180 nm de extensão, com genoma composto de RNA fita simples não segmentado de sentido negativo (3’ – 5’), contendo aproximadamente 12 kilobases (figura 2), e que possui cinco genes (figura 3) que codificam cinco proteínas (ICTV, 2005; BATISTA, FRANCO, ROEHE, 2007).

A partícula viral é composta por duas unidades estruturais, sendo um cilindro central e denso formado pelo ribonucleocapsídio (RNP) helicoidal, onde é formado pelo genoma viral associado às proteínas N, P e L, conformação que mantém o RNA no formato apropriado para a transcrição e replicação, além de protegê-lo das ribonucleases e da resposta imune inata (LUO et al., 2007; WUNNER, 2007) e, um envelope lipoprotéico, onde se inserem as Glicoproteínas (G) que interagem com o nucleocapsídio pela proteína da Matriz (M). As espículas glicoproteicas formam na superfície do vírion um trímero (ITO et al., 2003; ICTV, 2005).

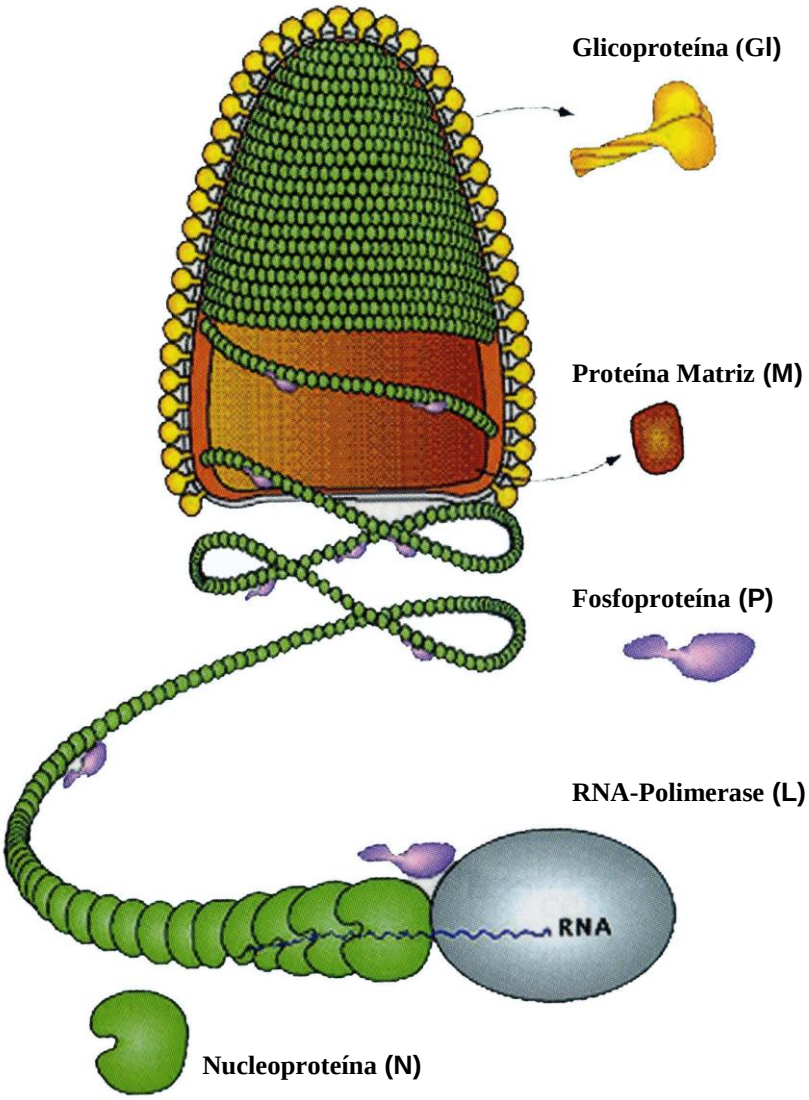


Figura 2. Ilustração esquemática da partícula do v*írus da Raiva* (VRab) mostrando glicoproteínas de superfície (Gl), proteínas de matriz (M), fosfoproteínas (P), RNA-polimerase (L) e a Nucleoproteína (N) envolvendo o genoma de RNA, formando o complexo RNP (L+P+N+RNA).
Fonte: Adaptado de ICTV*,* 2005.

Figura 3. Esquema ilustrativo do genoma do v*írus da Raiva* (VRab).
Legenda : N: Nucleoproteína, P: Fosfoproteína, M: Proteína Matriz, Gl: Glicoproteína, L: RNA-Polimerase, Ψ: Pseudogene
Fonte: Adaptado de Kimura, 2006.

1.4 EPIDEMIOLOGIA

A proteína N (450 aa, 47-62 KDal) é fosforilada no resíduo de serina na posição 389, apresenta epítopos conservados que tem capacidade de induzir resposta imune celular envolvendo células T auxiliares e T citotóxicas, portanto, variações no gene afetam diretamente a patogenicidade, imunogenicidade e neurotropismo viral (WUNNER, 2007). Essa proteína apresenta ainda determinantes antigênicos grupo-específicos, com quatro sítios antigênicos ao longo da proteína, sendo os sítios I e IV compostos de epítopos lineares, enquanto II e III são de conformação dependente para o reconhecimento de linfócitos T (GOTO et al., 2000; ICTV, 2005; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

A proteína N também é capaz de induzir produção de anticorpos neutralizantes, além de desempenhar outras atividades importantes; sendo fundamental na regulação da transcrição do RNA viral, onde participa ativamente na capsidização de novas moléculas de RNA genômico sintetizadas, na transcrição do genoma viral e no transporte axoplásmico intraneuronal (ICTV, 2005; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

O genótipo I possui variantes antigênicas conforme a espécie animal e a região ou país proveniente. As diferenças antigênicas do VRab são correlacionadas com as espécies animais de origem, e assim os anticorpos monoclonais têm sido utilizados na biotipagem de isolados do VRab (SWANGO, 1997). Por outro lado, a estrutura molecular das cepas de VRab reflete seu hospedeiro animal, sendo portanto, possível identificar a provável origem genética de um isolado viral do VRab a partir da composição do RNA viral (KONEMAN et al., 2001). A identificação das variantes pode ser feita pela técnica de

imunofluorescência indireta usando painel de anticorpos monoclonais (AcM) anti-nucleoproteína produzidos nos *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC), Atlanta, EUA, que permite uma Tipificação Antigênica (WIKTOR, KOPROWSKI, 1978), e que deve ser complementada pelo sequenciamento genético (TAKAOKA et al., 2003).

A identificação das variantes antigênicas do VRab proporciona informações importantes sobre as relações epidemiológicas do vírus e seus transmissores, permitindo a elaboração de estratégias de controle mais efetivas, o que favorece uma utilização mais racional dos recursos de saúde pública (VULKELIC, 2001).

Carrieri e colaboradores (2001), observaram a ocorrência de raiva canina e felina transmitida pela variante antigênica 3 (VAg3 comumente encontrada em morcegos da espécie *Desmodus rotundus*) no estado de São Paulo. Essas informações poderiam indicar a possibilidade de introdução da variante 3 no ciclo urbano. Posteriormente, Favoretto e colaboradores (2002) confirmaram esses dados no sudeste do Brasil e em outros países da América Latina, também demonstrando o envolvimento de quirópteros na transmissão da raiva no ciclo urbano. Na Venezuela, Vulkelic (2001) registrou a ocorrência de três casos de raiva canina em área urbana nos quais o vírus isolado foi identificado por caracterização antigênica como variante antgênica 3 (VAg3); esse autor relatou também, caso de raiva felina relacionada a morcego insetívoro, demonstrando a existência de outros reservatórios ainda desconhecidos na América Latina.

Os avanços registrados em biologia molecular possibilitaram, em 1981, o relato da primeira sequência dos genes do VRab e estabeleceram as bases para a classificação definitiva desse vírus mediante a análise antigênica

comparativa (WUNNER et al., 1988). Do mesmo modo, foi possível identificar a estrutura molecular e codificar o genoma viral, estabelecendo a correlação entre as sequências do ácido nucléico primário e aminoácidos, e as propriedades biológicas e imunológicas do VRab (WUNNER et al., 1988; NATARAJAN, MUKUNDAN, JOHN, 1992).

Assim, as pesquisas efetuadas com base na biologia molecular têm sido de relevante importância, não só para complementar os conhecimentos sobre a patogênese e a imunologia da infecção rábica, como também, para a determinação da variabilidade genética do VRab, inclusive entre cepas, e ainda para o esclarecimento dos mecanismos de replicação e transmissão viral (WUNNER et al., 1988). O estudo da variabilidade genética representa, portanto, um passo fundamental para a geração de informações para a epidemiologia molecular da raiva, determinando fontes de infecção, origens de surtos e relações genéticas, geográficas e temporais entre os VRab isolados a partir de diferentes espécies animais (KIMURA, 2006).

A raiva é uma doença cosmopolita (REZENDE et al., 1997); por outro lado, os dados sobre a morbidade e mortalidade constituem uma única informação, uma vez que a doença apresenta quase 100% de letalidade nas diferentes espécies animais (BRASIL, 2005b, REZENDE et al., 1997).

Com exceção da Oceania, a raiva está presente em todos os continentes. Nos outros continentes apresenta distribuição variável, tendo-se como países livres da doença o Uruguai, Barbados, Jamaica, Ilhas do Caribe, Portugal, Espanha, Irlanda, Grã-Bretanha, Países Baixos, Bulgária e Japão (ITO et al., 2003; REZENDE et al., 1997). No Brasil, a raiva é considerada endêmica, e presume-se que muitos casos não sejam diagnosticados e nem notificados, ou sejam

confundidos com outras enfermidades, devido à falta de laboratórios de diagnóstico em alguns estados brasileiros (ITO et al., 2003).

Segundo Miranda, Silva e Moreira (2003), as áreas de maior risco de ocorrência de surto coincidem com as regiões de menor desenvolvimento socioeconômico, havendo necessidade de elaboração de um programa de erradicação da raiva canina regionalizado, utilizando-se estratégias diferenciadas de acordo com as áreas de risco.

Todas as espécies de animais de sangue quente são susceptíveis à infecção com o VRab, embora existam diferenças quanto à susceptibilidade; por exemplo, os catinguelês encontram-se entre as espécies mais resistentes, já os canídeos silvestres, “racoons”, morcegos e bovinos estão entre as mais susceptíveis; cães, gatos, ovinos, caprinos, primatas não humanos, cavalos e seres humanos têm susceptibilidade intermediária. Os reservatórios primários são os animais silvestres em muitas partes do mundo, mas a principal fonte de infecção aos seres humanos ainda são os animais domésticos. Sendo assim, quando a raiva de cães e gatos está controlada, a ocorrência de raiva em humanos fica reduzida a um nível muito baixo (SWANGO, 1997).

A raiva apresenta quatro ciclos distintos de transmissão (BRASIL, 2005a). No ciclo urbano os principais transmissores e/ou hospedeiros primários do VRab são cães e gatos. No ciclo rural, a raiva é normalmente transmitida a bovídeos e equídeos pelos morcegos hematófagos; o ciclo silvestre terrestre, ocorre entre animais, essencialmente canídeos silvestres; e no ciclo silvestre aéreo, os morcegos (hematófagos ou não) são os transmissores (TAKAOKA, 2003) (figura 4).

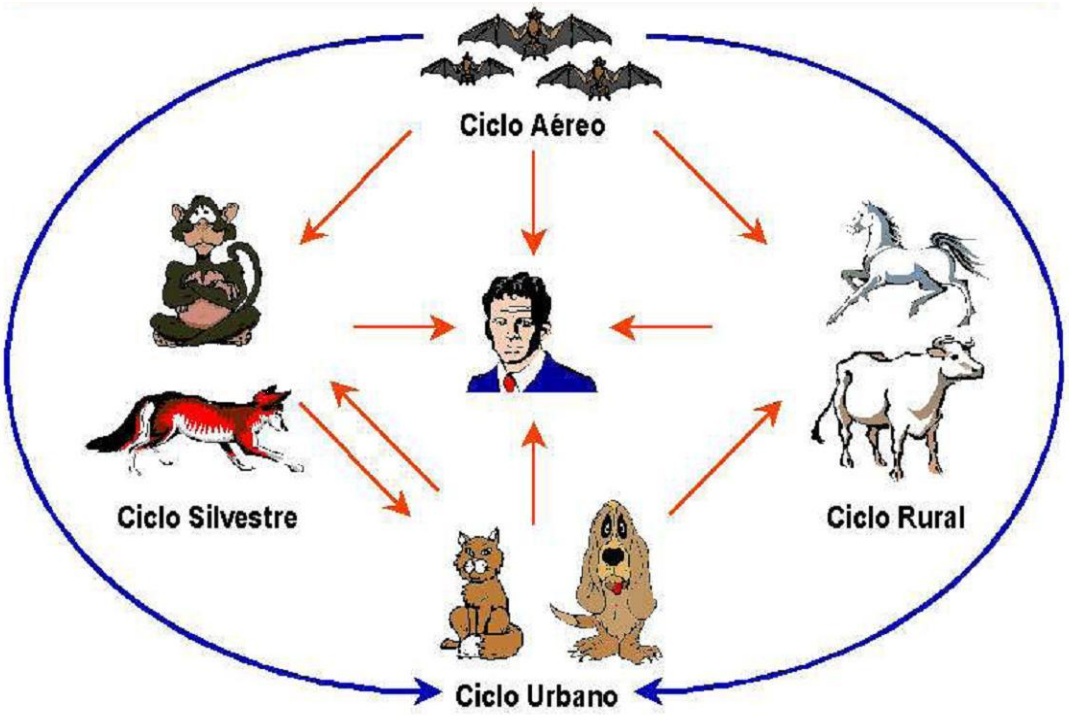


Figura 4: Ciclos de transmissão da raiva
Fonte: TAKAOKA et al, 2003.

Nas duas últimas décadas houve uma redução significativa no número de casos humanos registrados por ano, caindo de 173, em 1980, para 17 casos em 2003, sendo registrados pelo menos 10 casos anuais de raiva humana no país, desde o início da década de 1990, tendo o cão como o principal transmissor da doença. Atualmente, esses casos estão concentrados principalmente nas Regiões Norte e Nordeste. A raiva humana transmitida pelo cão está controlada na Região Sul e em alguns Estados da Região Sudeste, havendo a perspectiva de sua eliminação nesta década (MS, 2008; 2009).

Nos últimos dez anos, o aumento na detecção de casos de raiva em outros mamíferos como morcegos, raposas e saguis, e a identificação de novas variantes virais vem apontando para uma mudança no perfil epidemiológico da raiva no país, com a caracterização dos ciclos aéreo e silvestre terrestre, além dos ciclos urbano e rural. A transmissão a hospedeiros humanos por contato com cães

infectados persiste nas capitais de alguns estados, onde as metas de cobertura vacinal da população canina não tem sido atingidas. Nos anos de 2004 e 2005 a ocorrência de surtos de raiva humana transmitida por morcegos na Amazônia (figura 5) destaca a importância deste ciclo de transmissão, que requer estratégias diferenciadas para o seu controle (MS, 2008; 2009).

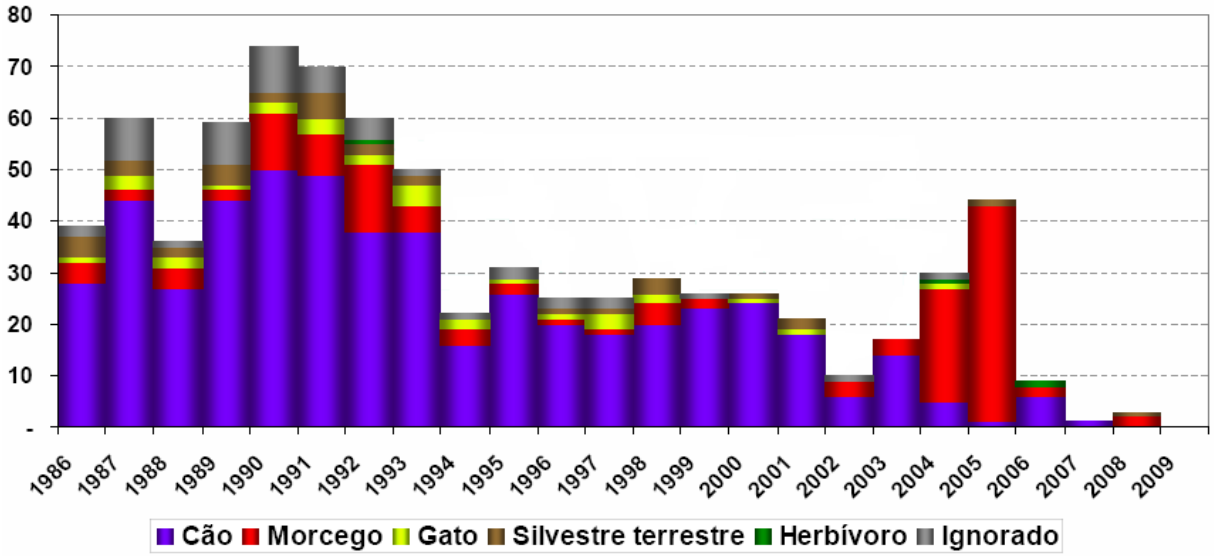


Figura 5. Raiva humana por espécie agressora, Brasil, 1986 a 2009*.
Fonte: COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS, 2009[2]
Legenda: * até maio de 2009

A transmissão ocorre pela penetração do vírus contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura e, mais raramente, pela arranhadura e lambedura de mucosas. Penetrando no organismo, o VRab atinge o sistema nervoso periférico e, ascende de modo centrípeto até atingir o sistema nervoso central (figura 6). Em seguida o vírus, utilizando a rota centrífuga dissemina-se para vários órgãos, inclusive as glândulas salivares, quando o hospedeiro torna-se apto a transmitir o vírus (BRASIL, 2005a); excepcionalmente o VRab pode também ser transmitido por xenotransplantes (BONEVA, FOLKS;

[2] http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva_apresentacao05062009.pdf

CHAPMAN, 2001); e ainda há casos de transmissão inter-humana por meio de transplantes de córnea (BRASIL, 2005a) e outros órgãos como pulmões, fígado, rins e enxerto vascular (BURTON et al*.,* 2005; HPA, 2005; SRINIVASAN, BURTON, KUEHNERT*,* 2005).

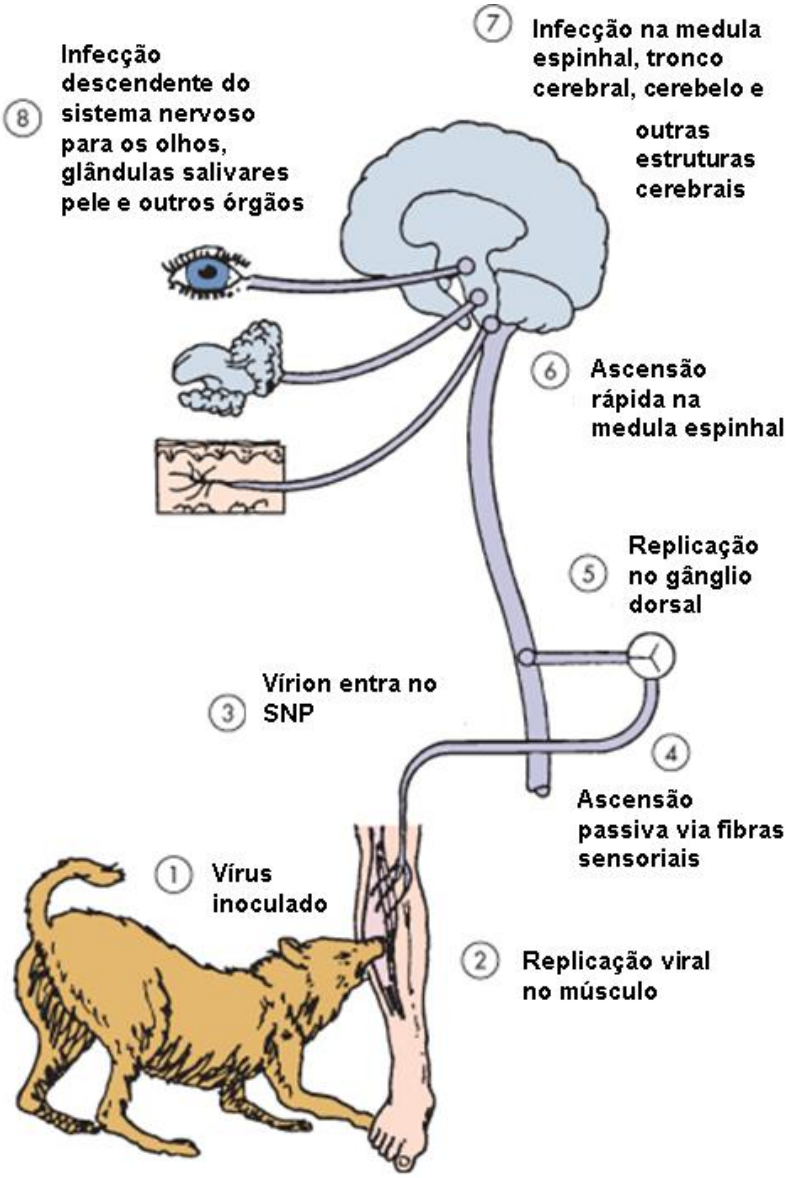


Figura 6: Patogênese da infecção pelo VRab
Fonte: MURRAY et al., 1992

1.5 PATOGENIA

O mecanismo de patogenicidade do vírus rábico se dá pela inibição da síntese de proteína celular do hospedeiro e pelo tropismo viral por nervos periféricos e células do SNC (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Após a infecção é provável que ocorra uma primeira replicação do vírus nas células musculares (BLOOD; HENDERSON; HADOSTITS, 1983; FERNANDES, 2001), o VRab se liga aos receptores da acetilcolina nos miócitos (tecido muscular) na área da mordedura (CORRÊA; CORRÊA, 1992, JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993). Após a introdução do vírus ocorre o desencadeamento de eventos ao nível celular tais como: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem e brotamento virais (figura 7) (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

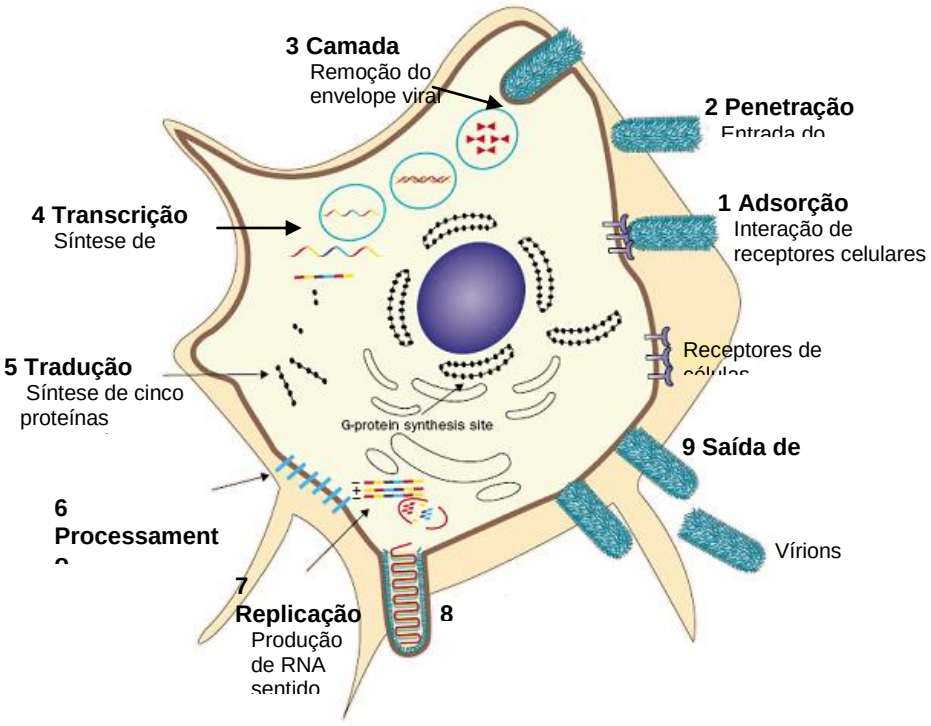


Figura 7 - Esquema ilustrativo da recepção, entrada, transcrição, tradução, replicação e saída de partículas virais.
Fonte: Adaptado de Rupprecht, Hanlon, Hemachudha, 2002.

Após a ligação do vírion à célula hospedeira, o mesmo é internalizado pela célula por endocitose. Segue-se à liberação do genoma viral no citoplasma por fusão mediada pela glicoproteína viral, o que implica pequenas mudanças conformacionais na mesma. O primeiro evento após a entrada do VRab na célula é a transcrição dos seus genes, produzindo cinco RNA mensageiros (RNAm) monocistrônicos, seguido da síntese de seu genoma complementar de fita positiva (5'-3') (BADRANE et al*.,* 2001).

O vírus, então, invade os neurônios motores por meio dos terminais axonais ou neurônios sensoriais pelo fuso neuromuscular ou dos terminais axonais. Na sequência, o vírus progride de forma centrípeta seguindo o fuso axonal retrógrado. Os vírus que seguem via neurônios motores chegam aos cornos ventrais da medula espinhal e núcleos motores do tronco encefálico, no SNC. Já os que progridem via neurônios sensoriais chegam até os gânglios crânio-espinhais e então ao SNC (JUBB, KENNEDY e PALMER, 1993).

Esta progressão do músculo até o SNC pode ser rápida ou demorar meses, dependendo dos fatores que interferem no período de incubação. Uma vez no SNC, a disseminação é rápida, ocorrendo por meio das sinapses de forma trans-neural, seguido de disseminação ativa de forma centrífuga para os nervos periféricos e invasão de tecidos com inervação abundante, tais como glândulas salivares, onde o vírus pode replicar-se no epitélio dos ácinos e ser eliminado junto com a saliva pelos ductos. Desta forma, nos casos fatais o vírus pode ser encontrado nos SNC e SNP, nos demais tecidos e em secreções como o leite. A resposta imune inata parece estar modulada de acordo com a patogenicidade do vírus em adição à ausência de resposta imune eficiente do SNC; sugere-se que as cepas virais tem selecionado estratégias imuno-subversivas para escapar da

resposta imune do hospedeiro. O decréscimo da resposta imune claramente depende da patogenicidade da amostra (LAFON, 2007).

Em relação à raiva de morcegos hematófagos, já foi pesquisada a presença do vírus rábico em diferentes órgãos fora do sistema nervoso, tendo sido isolado o vírus de glândulas salivares, gordura interescapular, coração, pulmão, testículos e mesmo em fetos (SCHEFFER, 2005; SCHEFFER et al., 2007). Vale ressaltar que nos morcegos o VRab tem maior afinidade pela glândula salivar do que pelo tecido nervoso (JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993).

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O suporte laboratorial é imprescindível para o diagnóstico dessa virose, já que os sinais clínicos da doença são diversos (FERNANDES, 2001). Alguns autores, no entanto, como Corrêa e Corrêa (1992) afirmam que o diagnóstico clínico fortemente sugestivo ou suspeito de raiva possui alto valor preditivo devido aos sinais e sintomas serem muito característicos nas formas furiosa e paralítica, combinados ao curso agudo, progressão contínua da doença e morte entre 5-10 dias desde o início dos sintomas.

Segundo Rezende e colaboradores (1997), as provas de diagnóstico realizadas no paciente em vida apresentam baixo percentual de positividade, mas após a morte o diagnóstico não impõe nenhuma dificuldade, uma vez que vários órgãos do SNC encontram-se impregnados com antígeno rábico. As provas mais usadas para diagnóstico específico são a de detecção de antígenos pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) e o isolamento viral após a inoculação em

camundongos (PB), com a confirmação do isolamento feita pela IFD, a partir de fragmentos de órgãos do SNC, principalmente do encéfalo. A prova de IFD é a que apresenta resultados confiáveis em poucas horas, quando realizados em materiais frescos, com positividade de 95-99% dos casos (BRASIL, 2005c).

Outras técnicas para diagnóstico são: a pesquisa citológica de inclusões de Negri (facilmente identificáveis pela coloração de Sellers e hematoxilina-eosina); detecção do genoma viral pela reação de cadeia mediada pela polimerase precedida por uma transcrição reversa (RT-PCR) (REZENDE et al., 1997; BRASIL, 2005a). Atualmente, um importante instrumento de vigilância epidemiológica é a tipificação antigênica pela imunofluorescência indireta (IFI) usando AcM, que é uma técnica específica e rápida, e a caracterização genética por RT-PCR e sequênciamento nucleotídico (BRASIL, 2005a); também a heminested-RT-PCR (hnRT-PCR) tem sido empregada obtendo-se boa sensibilidade e especificidade, confirmando o diagnóstico da IFD em curto período de tempo (ARAÚJO, 2008; HEATON et al., 1997).

Quanto às provas inespecíficas, no geral, fornecem poucos dados que possam auxiliar no diagnóstico, como hemograma (leucocitose com neutrofilia, excepcionalmente encontra-se leucopenia), dosagem de eletrólitos, gasometria, provas de função respiratória, eletroencefalograma (revela a gravidade da doença), exame do LCR (para diferenciar das meningites e de outras encefalites) (REZENDE et al., 1997; BRASIL, 2005b).

1.7 TRATAMENTO

Não existe tratamento estabelecido eficaz para pacientes com encefalomielite por raiva. Os protocolos terapêuticos de Milwaukee envolvem indução ao coma, no entanto, não há uma clara razão para uma função neuroprotetora desta terapêutica (JACKSON, 2009), em Recife/PE foi conseguida uma cura determinada pelo *clearence* viral na RT-PCR utilizando o protocolo modificado (COVEV, 2008). Porém, devido a sua baixa reprodutibilidade seu uso deverá ser abandonado, pois existem muitos relatos de suas falhas (JACKSON, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A identificação das variantes antigênicas do vírus rábico permite o reconhecimento de questões associadas com a transmissão e a elaboração de estratégias de controle mais efetivas, e melhor utilização dos recursos de saúde pública (VULKELIC, 2001). Painéis de AcM anti-nucleoproteína tem sido utilizados na tipificação do VRab (SWANGO, 1997), sendo possível identificar a provável origem de um isolado viral a partir da utilização desse painel de anticorpos monoclonais (KONEMAN et al., 2001).

A vigilância epidemiológica da raiva necessita, para ser eficaz, de instrumentos laboratoriais e de logística (equipes treinadas para controle de quirópteros, campanhas de vacinação, etc.). Por esse motivo, em vista das mudanças no perfil epidemiológico da raiva animal no sudeste do Brasil observada por Carrieri e colaboradores (2001), deve-se investigar se a mudança está ou não ocorrendo também na região Norte do país.

Sabendo que raiva é uma virose prevalente em mamíferos na região amazônica, um estudo prévio de tipificação antigênica realizado com algumas cepas virais, somente do estado do Pará, foi identificado que no ano de 2006 não ocorreu mudança no perfil epidemiológico, tendo sido observado que a transmissão da raiva em cães ainda é realizada pela variante antigênica 2 (VAg2) do vírus nesse estado (CASSEB et al., 2006); mas ainda é necessário que o estudo seja estendido para os demais estados da região, bem como ampliá-lo para outros municípios do estado do Pará.

Estudos semelhantes, de caracterização antigênica, foram realizados em outros países das Américas, como Venezuela (MATTOS et al., 1996), EUA (ROHDE et al, 1997), Chile (YUNG; FAVI; FERNÁNDEZ, 2002), e México (LOZA-RUBIO et al., 1995; LOZA-RUBIO et al., 1996; VELASCO-VILLA et al., 2002; VELASCO-VILLA et al., 2006), e diversos países da Europa (BOURHY et al., 1992), obtendo-se um perfil da circulação do vírus nas regiões e, algumas vezes descrevendo possíveis novas variantes antigênicas do VRab.

O uso exclusivo da caracterização antigênica utilizando o painel de AcM apresenta limitações, a exemplo da diversidade de variantes circulantes dentre espécies de morcegos não hematófagos, as quais não são totalmente contempladas no painel de oito AcM. Nesses casos a análise genética deve ser realizada, a fim de proporcionar informações mais detalhadas sobre a relação evolutiva dos isolados, sendo preferível a análise de sequências parciais ou totais do gene N, que é um gene altamente conservado. O estudo genético é também indicado quando a tipificação antigênica gerou resultados atípicos, que podem ser decorrentes de pequenos erros na interpretação da reação (BRASIL, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análise epidemiológica dos casos de Raiva na Amazônia brasileira mediante levantamento de dados de casos positivos diagnosticados no IEC, caracterizar antigênica e geneticamente cepas do VRab isoladas de espécimes biológicos (encéfalos) de humanos e animais procedentes de estados da região no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar antigenicamente cepas do VRab isolados de carnívoros domésticos obtidos entre janeiro de 2000 a julho de 2009 utilizando o painel de AcM.
- Caracterizar antigenicamente cepas do VRab isolados de humanos, herbívoros domésticos e animais silvestres obtidos entre janeiro de 2005 a julho de 2009 utilizando o painel de AcM.
- Caracterizar geneticamente cepas de VRab que não foram passíveis de caracterização antigênica.
- Descrever as variantes antigênicas e genéticas do VRab circulantes na Amazônia brasileira no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

- Descrever a epidemiologia e epidemiologia molecular do VRab na Amazônia brasileira no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LEVANTAMENTO DE DADOS

4.1.1 Amostras de humanos e animais analisadas pelas técnicas de IFD e PB no período de janeiro de 2000 a julho de 2009

Foram utilizados para este estudo amostras de encéfalos de diferentes Unidades das Secretarias de Saúde Estaduais e Municipais no período de janeiro de 2000 a julho de 2009, recebidas no Laboratório de Diagnóstico de Raiva da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC), laboratório de referência macrorregional para os estados da região Norte. A partir dos registros do laboratório, foi feito levantamento do total de amostras de encéfalos humanos e animais domésticos e silvestres positivas e negativas pelas técnicas de Imunofluorescência direta (IFD) (ANEXO A) e/ou Prova biológica (PB) (ANEXO B), os quais foram relacionados por estado, espécie e ano.

4.1.2 Identificação dos quirópteros positivos para o VRab

Dados da identificação das espécies dos quirópteros positivos para raiva no ano de 2004 foram obtidos no Instituto Pasteur de São Pauloe os quirópteros positivos nos anos subsequentes foram identificados pelos professores

doutores Nelson Antônio Bailão Ribeiro, do IEC, e Wilson Uieda, Universidade Estadual Paulista (UNESP) Campus Botucatu, segundo características morfológicas e morfométricas externas (em milímetros).

4.1.3 Caracterização Antigênica

Dados de caracterização antigênica a partir do ano de 2005 também foram levantados, visto que a técnica foi implantada na rotina do Laboratório de Diagnóstico de Raiva do IEC em agosto de 2004, e assim os casos de raiva humana até o ano de 2004 foram caracterizados antigenicamente no Instituto Pasteur de São Paulo. Portanto, para as cepas virais utilizadas a partir de 2005 foi realizado somente um levantamento dos dados contidos nos registros do Laboratório de Diagnóstico de Raiva /SAARB/IEC, conforme descrito anteriormente.

4.2 CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE CEPAS DO VRab

4.2.1 Re-isolamento viral de cepas do VRab

Para a caracterização antigênica foram selecionadas 133 amostras de encéfalos de carnívoros domésticos positivas para raiva no período de 2000 a 2004. Para utilização desses isolados nesse estudo foi feita solicitação à direção

do IEC, conforme orientação do Comitê de Ética em Pesquisa dessa instituição com documento de liberação (ANEXO C), bem como o mesmo teve a aprovação no Comitê de ética em pesquisas com animais (CEPAN) do IEC (ANEXO D).

Foram incluídas no estudo amostras de encéfalos caninos e felinos positivas para raiva, nos testes de IFD (ANEXO A) e PB (ANEXO B), procedentes de diversos estados da região Amazônica, diagnosticadas no IEC, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2004, e que foram selecionadas aleatoriamente, o que correspondeu a 19,03% das amostras de carnívoros domésticos positivas no acervo da SAARB/IEC no período de 2000 a 2004.

Foram excluídas, das tentativas de re-isolamento, amostras de outras espécies de animais, amostras negativas em um dos testes realizados, amostras muito deterioradas, que impossibilitariam o re-isolamento viral.

As amostras selecionadas neste estudo foram re-inoculadas pela via intracerebral em camundongos albinos suíços recém-nascidos para tentativas de re-isolamento viral. Os camundongos foram cedidos pela Seção de Criação e Produção de Animais (SACPA/IEC/SVS/MS), sendo distribuídos em número de seis animais em cada microisolador (gaiolas) de acrílico com tampa de aço cromado, em *racks* de exaustão (figura 8), com fornecimento de ração balanceada e água à vontade. Os animais foram mantidos no infectório NBA-3 em ambiente refrigerado, temperatura aproximada de 25° C (± 3° C) e os camundongos recém-nascidos estavam acompanhados de uma fêmea recentemente parida. Todos os procedimentos com os animais foram realizados por ou sob orientação de veterinário.

Figura 8. Microisoladores (gaiolas) de acrílico com tampa de aço cromado, em Racks de exaustão mantidos no infectório NBA-3

Para a inoculação intracerebral em camundongos suíços albinos recém-nascidos (2-3 dias de idade), foi preparada uma suspensão a 20% a partir do cérebro de carnívoros domésticos infectados, em solução salina tamponada (SST), com albumina bovina a 0,75 % e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Esses animais foram inoculados com 0,02 mL da respectiva suspensão utilizando-se agulhas 13x4,5 mm e seringas de 1 mL e para esse fim foi usada a contenção física de acordo com o que segue: os animais foram seguros pela cabeça com o dedo indicador e o dedo polegar, tendo o resto do corpo apoiado nos outros dedos (figura 9).

Figura 9. Inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos.

Os animais infectados foram observados diariamente e, quando apresentaram sinais de doença, foram retirados das respectivas gaiolas, eutanasiados a partir do método físico “deslocamento cervical” conforme recomendação do Manual Para Técnicos em Bioterismo do COBEA (DE LUCA et al., 1996; MEZADRI; TOMAZ; AMARAL, 2004), o qual refere que esse “é o método mais simples e humanitário adotado para eutanásia de camundongos e cobaias”. Em seguida, foram retirados os tecidos de SNC para impressão em lâminas não lapidadas para microscopia de imunofluorescência, contendo dez círculos. O restante do encéfalo foi colocado em criotubos e identificados com rótulo onde consta o registro da amostra, passagem, dia de doença e data em que foram colhidos, sendo, então, conservados a -70° C para posterior liofilização.

Após a eutanásia e colheita dos tecidos nervosos, todas as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos para descarte de material biológico infectado até serem transportadas para incineração.

4.2.2 Teste de imunofluorescência indireta (IFI) para caracterização antigênica de cepas do VRab

4.2.2.1 Amostras

Foram submetidas à técnica de IFI para caracterização antigênica 265 amostras, sendo 34 amostras de humanos e 231 de animais, assim distribuídas: 171 caninos, 20 de felinos, 21 bovídeos, 14 quirópteros, três equídeos, um suíno (*Sus scrofa*) e uma irara (*Eira barbara,* Linnaeus, 1758).

4.2.2.2 Fundamento da técnica

A técnica de IFI envolve o uso de dois anticorpos, o primeiro, um anticorpo não marcado, denominado de anticorpo-alvo, liga-se a sítios específicos da nucleoproteína viral, em impressão de tecido nervoso em lâmina, na qual é incubado e lavado, posteriormente é colocado um segundo anticorpo, o qual está conjugado a um fluorocromo, que reconhece o anticorpo alvo, essa reação é revelada por emissão de raios ultravioletas em microscópio de fluorescência. Pelo fato de um número de anticorpos marcados se ligarem a cada anticorpo-alvo, a fluorescência é intensificada (FERREIRA; ÁVILA, 1996; HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008)

4.2.2.3 Procedimentos da técnica segundo Mattos e Mattos (1998)

- Foram preparadas quatro lâminas demarcadas com dois campos de leitura, ou oito lâminas com um só campo de leitura;
- As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos;
- Fixadas em acetona P.A. a –20^{o}C durante toda à noite;
- Retiradas da acetona e deixadas para secar por 30 minutos;
- Colocadas em porta lâminas em freezer -70 ºC ou prosseguiu-se com o teste.
- Retiradas as lâminas da acetona P.A. ou do porta lâminas contido no freezer -70 °C e deixadas para secar;
- Foram acrescentados 17 µL de diluição 1:3.000 (diluição de trabalho) pré-estabelecida por titulação, em SST pH 7,4, de cada um dos oito anticorpos monoclonais em cada impressão;
- As lâminas foram identificadas com o número dos AcM (C1, C4, C9, C10, C12, C15, C18 e C19);
- Incubadas a 37^{o}C, por 30 minutos, em câmara úmida;
- Retiradas da estufa, as lâminas foram lavadas individualmente utilizando pisseta contendo SST. com máximo cuidado, para que não ocorresse transferência do AcM de uma impressão para outra, quando dois ou mais AcM foram utilizados por lâmina;
- Cada impressão foi lavada por duas vezes com a pisseta contendo SST, sendo 10 segundos por impressão a cada vez;
- As lâminas foram deixadas submersas em SST, por 10 minutos, em copo de Coplim;

- Foram estendidas sobre papel toalha para secarem em temperatura ambiente para a próxima etapa.
- Foram colocados em cada impressão, 20 µL de conjugado anti-camundongo previamente titulado e diluído 1:800 em SST;
- Incubadas a 37^{o}C por 30 minutos em câmara úmida;
- Retiradas e lavadas conforme procedimento utilizado na primeira etapa;
- As lâminas foram retiradas da imersão em SST e passadas em água destilada;
- Foram estendidas sobre papel toalha para secarem em temperatura ambiente;
- As lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 8,5) e lamínulas 24x60 mm;
- A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot (Zeiss), que utiliza lâmpada de mercúrio de 50 *Watts,* filtro barreira LP 520, filtro excitador BP 450-490 e divisor cromático FT 510, com ocular de aumento de dez vezes e objetivas de 20 e 40 vezes, sempre começando pelos controles positivo (CVS) e negativo (CCN), variando em cruzes de acordo com a intensidade do brilho e quantidade de antígeno, devendo ser interpretada segundo o perfil de leitura previamente estabelecido para estudar a epidemiologia do VRab nas Américas pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC/Atlanta) (quadro 2).
- Os resultados foram lançados em protocolo de IFI (ANEXO E)

Quadro 2. Padrões de reação das diferentes variantes antigênicas com os anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais	**C1**	**C4**	**C9**	**C10**	**C12**	**C15**	**C18**	**C19**	**VAg**
CVS/ERA SAD/PAST	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	Lab
Canina/Capivara	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**	1
Canina (Brasil)	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**	2
Morcego hematófago (*Desmodus rotundus* - Brasil)	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**+**	3
Tadarida brasiliensis (Brasil)	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	4
Morcego hematófago (*Desmodus rotundus* - Venezuela)	**-**	**+**	**v**	**+**	**+**	**v**	**-**	**v**	5
Lasiurus cinereus	**v**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	6
Raposa de Arizona	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**	**+**	7
Cangambá	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	8
Tadarida brasiliensis (México)	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	9
Gambá (Sul da Califórnia)	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	10
Morcego hematófago (*Desmodus rotundus* - México)	**-**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**+**	11
Callithrix jacchus (Brasil)[1]	**-**	**-**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**	

Legenda: **+** positivo; **-** negativo; **v** reação débil; [1] Favoretto et al. (2002)
Fonte: Adaptado de Mattos e Mattos (1998); Nadin-Davis (2007).

4.2.2.4 Anticorpos monoclonais (AcM)

O painel com oito AcM (C1, C4, C9, C10, C12, C15, C18 e C19) anti-nucleoproteína viral, produzidos no CDC/Atlanta foram recebidos diluídos a 1:10 em EMEM (*Eagle Minimum Essential Medium*) suplementado com 10% de soro

fetal bovino, 25mM de tampão Hepes e 1mM de azida sódica, e conservados em freezer (-20°C). As soluções estoque foram preparadas em EMEM em cabine de fluxo laminar em uma diluição de 1:100, e armazenados em freezer (-20°C); a solução trabalho foi diluída em SST a partir da estoque, segundo titulação realizada no laboratório, esta solução pode ser conservada em geladeira (4°C).

Os AcM foram submetidos a titulação para determinação de uma diluição ótima. Para tanto, utilizaram-se cepas já conhecidas do VRab como CVS, cepa variante 2, cepa variante 3, e/ou eventualmente outras cepas.

A diluição com uma intensidade de fluorescência de três a quatro cruzes (75 a 100% de campo fluorescente) foi considerada a diluição de trabalho para cada AcM em particular.

4.2.2.5 Titulação do conjugado anti-camundongo

- Prepararam-se e identificaram-se lâminas dos controles positivo (CVS) e negativo (CCN), para cada diluição;
- Dilui-se o conjugado (lote: 02706 ICN/CAPPEL), conforme o recomendado pelo laboratório produtor, sendo duas diluições acima e duas abaixo do título recomendado;
- Prosseguiu-se com o teste de IFI;
- Fez-se a leitura das lâminas em microscópio de fluorescência (objetivas 20x, 40x e ocular de 10x)
- Determinou-se a diluição ideal, observando a presença de inclusões e sua intensidade de coloração nas lâminas de CVS e inexistência de coloração

inespecífica nas lâminas de CCN. Sendo o título 1:800 a diluição ideal para utilizar nos testes.

- O conjugado anti-camundongo foi diluído 1:800 em SST no momento do teste, e conservado em temperatura de refrigeração (4-8 °C).

4.2.2.6 Critérios para Repetição de Teste

- Quando não ocorreu reação na lâmina de CVS;
- Sempre que houve dúvidas quanto ao resultado do teste de IFI.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Este é um estudo quantitativo analítico retrospectivo observacional cujo objetivo foi traçar o perfil epidemiológico baseado na caracterização antigênica de cepas do VRab com diagnóstico laboratorial confirmado a partir de encéfalos infectados, processados no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste do qui-quadrado (X^2) admitindo nível α de 0,05, nível β de 0,04, poder do teste de 0,96; valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e, para valores esperados menores que 5 (E<5) foi utilizado o teste de probabilidade exato de Fisher. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Bio Estat 5.0 (AYRES et al., 2007).

4.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DO VRab PELO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE N

Para caracterização genética foram selecionadas amostras virais cujo padrão de leitura não foi compatível com os das variantes já identificadas nas Américas (não compatíveis – NC), VLab, bem como algumas cepas antigenicamente caracterizadas, principalmente as oriundas de animais silvestres, segundo métodos descritos por Barbosa (2007).

Brevemente, utilizou-se para extração do ácido nucléico o método do reagente Trizol LS; seguiu-se com etapas de reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) em dois passos; os produtos da RT-PCR foram visualisados em gel de agarose 1,5% em tampão TAE; as bandas foram cortadas e purificadas pelo *Kit* de purificação *Invisorb fragment cleanUp* (Invitek), seguindo estritamente as recomendações do fabricante; os produtos de purificação foram novamente vizualizados em gel de agarose 1,5% em TAE para quantificação do cDNA em fotodocumentador Loccus Biotecnologia por meio do programa LabImage 1D L340; posteriormente realizou-se o sequenciamento nucleotídico em um sequenciador automático, modelo ABI PRISM 3130 (Applied Biosystem); finalmente, procedeu-se o alinhamento das sequencias obtidas, e a análise filogenética.

4.4.1 Extração do Ácido Nucléico pelo método do Reagente Trizol LS

Para a realização da extração do RNA viral foi utilizada uma suspensão de tecido nervoso a 50%, contendo 1g do tecido nervoso, macerado em 1000 µL da solução de albumina bovina a 0,75% em SST com antibióticos. Prosseguiu-se com uma centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a extração do RNA viral.

Em um microtubo de 1,5mL, 250µL da suspensão foi misturada a 750µL de TRIZOL *Reagent* (*Life Technologies*, Invitrogen). Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (P.A.). Os tubos foram agitados por 15 segundos em vórtex, permanecendo em repouso durante 10 minutos, à TA. Seguiu-se com uma centrifugação a 12.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Após esta centrifugação foi possível verificar a formação de três fases: uma fase rosada e mais densa constituída pelo trizol, uma intermediária correspondente aos detritos celulares e uma fase aquosa na qual se encontra o ácido nucléico.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5mL estéril onde a ela foi adicionado 500µL de isopropanol (P.A.). Os tubos foram manualmente invertidos e colocados em repouso por 10 minutos a TA, seguido de uma centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi desprezado, sendo então adicionado 1mL de etanol a 75%. Uma rápida agitação em vórtex foi realizada, seguindo-se de última centrifugação a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão e o sedimento foi seco a TA. A reconstituição do RNA foi feita com 20µL de água livre

de DNase e RNase, sendo o mesmo armazenado a -70°C ou imediatamente utilizado na RT-PCR.

4.4.2 Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR)

4.4.2.1 Iniciadores específicos

O par de iniciadores (quadro 3) foi desenhado por meio do Programa OligoPerfect™ Designer disponível no site da Invitrogen (http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716), baseado na região conservada do gene N, a partir da análise do alinhamento entre o protótipo do vírus rábico e amostras isoladas no Brasil.

Quadro 3. Iniciadores utilizados no protocolo de RT-PCR para amplificação do genoma do vírus rábico.

Iniciador	Posição no genoma	Sequência	GC%	TmA*	Produto
Rab NF	868 (+)	G G A A G A G A T A A G A A G A A T G T T T G	34.78	54.16	490 pb
Rab NR	1359 (-)	T T G G A G C T G A C T G A G A C A T A	45.00	54.33	

Legenda: TmA = temperatura de anelamento (50mM Na+); pb = pares de base; GC%: percentual de guanina e citosina

4.4.2.2 RT-PCR

De acordo com Travassos da Rosa e colaboradores (2005), objetivando-se o aumento da sensibilidade do teste foi realizada a RT e a PCR em dois passos distintos; primeiramente 5 µL do RNA extraído, previamente diluído a 50% em água livre de RNAse, foi desnaturado a 94ºC por 1 minuto. Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), inicialmente realizou-se a reação de transcrição reversa (RT) ajustada para o volume final de 10 µL por amostra constituído por uma mistura de 5µL de RNA viral e 5µL de RNA (~2-5 ng); e 5µL da mistura de reação que inclui tampão RT 1x (250mM Tris-HCl pH 8.3, 100mM NaCl, 15mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA); 0,5 mM de dNTP; 10mM de DTT; 10U/µL de enzima RT (Superscript-II, Reverse Transcriptase, Invitrogen); 2,5µM do iniciador 868 NF (5'-GGAAGAGATAAGA AGAATGTTTG-3´),e 20U de inibidor de RNAse (RNaseOUT –Invitrogen). A RT foi processada em um ciclo de 42ºC durante 90 minutos (quadro 4).

Quadro 4. Reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar do vírus rábico.

Reagentes para Transcrição Reversa	**Concentração Inicial**	**Concentração Final**	**Reação de 20 µl**
Água livre de RNase e DNase	-	-	5µl
Tampão (RT)	5x	1x	4 µl
dNTP	10 mM	0,5 µM	1 µl
DTT	100 mM	10 mM	2 µl
RT (SuperScri III)	200 U/µL	10 U/µL	1 µl
RNAsin	40 U/µL	2 U/µL	1 µl
Primer NF	50 µM	2,5 µM	1 µl
Amostra	-	1:4	5 µl

A amplificação do produto da RT foi realizada pela técnica de PCR, cujo volume da reação foi ajustado para 25μL contendo: 5μL do cDNA e 20 μL da mistura de reação constituída por tampão de PCR 10x (250mM Tris-HCl pH 8.3, 100mM NaCl, 0.1 mM EDTA); 1,5mM de $MgCl_2$; 0,2μM de dNTPs; 1μM de cada iniciador 868 NF e 1359 NR (5´-TTGGAGCTGACTGAGACATA-3´) e 0,05U/μL de DNA polimerase (Platinum Taq DNA Polymerase). A PCR foi executada com 35 ciclos, onde cada um é composto de 94°C durante 40 segundos (desnaturação), 55°C, durante 40 segundos (hibridização), e 74°C por 1 minuto (síntese) (quadro 5).

Quadro 5. A PCR para a amplificação do cDNA do vírus rábico.

Reagentes para a Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase	**Concentração Inicial**	**Concentração Final**	**Reação de 25 μl**
Água livre de RNase e DNase		-	15 μl
Tampão (TAQ)	10X	1x	2,5 μl
MgCl	50 mM	1,5 mM	0,75 μl
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5 μl
Primer NF	50 μM	1 μM	0,5 μl
Primer NR	50 μM	1 μM	0,5 μl
TAQ Platinum	5 U/μL	0,05 U/μL	0,25 μl
cDNA	-	1:5	5 μl

4.4.2.3 Visualização do produto da RT-PCR

Os produtos das amplificações foram visualizados após eletroforese

em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X (Tris 10mM; Acetato 0,1 M; EDTA 1mM pH 7,2) corado com brometo de etídio, mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

Os produtos amplificados foram migrados juntamente com um marcador indicativo do número de pares de base (*Low DNA Mass - 100 bp ladder*, Invitrogen), e controles negativo (CCN) e positivo (CVS) de extração durante aproximadamente 30 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 80V e 7mA, respectivamente. A fim de verificarmos a ocorrência de possíveis contaminações durante a realização da técnica de RT-PCR, tubos contendo apenas água livre de RNase foram também migradas no gel, bem como os demais componentes da mistura de RT-PCR.

4.4.3 Purificação do cDNA

A purificação do cDNA foi realizada utilizando o *kit* comercial de purificação *Invisorb fragment cleanUp* (Invitek) no qual colunas de retenção a base de sílica foram usadas. A técnica consistiu em retirar com auxílio de estilete metálico as bandas visualizadas no gel, que foram transferidas para tubos de 2,5 mL estéreis e previamente pesados. O peso das bandas foi calculado mediante a subtração do peso total do tubo (peso do tubo + peso do fragmento) pelo peso do tubo sem o gel. Em seguida foram adicionados 1 mL de tampão *Gel solubilizer S* (para dissolução do gel de agarose) para fragmentos de gel acima de 150 mg, ou 500 μL do tampão para fragmentos de até 150mg.

Esses tubos foram misturados vigorosamente e posteriormente

incubados a 50ºC durante 10 minutos ou até que o gel de agarose fosse completamente dissolvido. Após essa etapa, foi adicionado por amostra 500μL do tampão *Binding Enhancer* para volumes de 1000μL ou 250μL para volumes de 500μL da solução anterior, sendo novamente homogeneizadas; as amostras foram transferidas para um tubo coletor contendo a coluna de retenção com capacidade para 800μL; seguiu-se com centrifugação a 12.000 rpm por um minuto, este passo foi repetido para volumes maiores que 800μL. O material filtrado foi descartado, sendo adicionado 500 μL de tampão de lavagem (*Wash buffer*) aos tubos que em seguida foram novamente centrifugados a 12.000 rpm por 30 segundos; o filtrado foi descartado e este passo foi repetido. Os tubos foram então centrifugados novamente a 14.000 rpm por quatro minutos para remoção do excesso de etanol do tampão de lavagem.

As colunas foram transferidas do interior do tubo coletor para um tubo de 1,5 mL estéril, sendo posteriormente adicionados a cada uma delas um volume de 20 μL de tampão de eluição (*Elution buffer*) e incubados a TA por cinco minutos. Por último, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto para que ocorresse a recuperação do DNA retido nas colunas.

4.4.4 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico dos cDNA purificados foi realizado utilizando o kit ABI PRISM Dye Terminator (Applied Biosystems), cujas reações foram processadas em um sequenciador automático de capilar, modelo ABI PRISM 3130 (Applied Biosystem), pelo emprego do método de terminação de cadeia por

didesoxirribonucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes, que ao contato com raios laser, emitem fluorescência de diferentes comprimentos de ondas correspondentes a cada um dos quatro nucleotídeos que compõem basicamente a molécula de DNA (A, C, T, G) localizados na extremidade 3' (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

O sequenciamento nucleotídico das amostras pelo método automático seguiu as seguintes etapas: Reação de sequenciamento composta pela mistura de 50 ng de DNA, 6 µL de tampão de reação contendo os dideoxinucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (*Terminator reaction mix*), 4 µL dos iniciadores específicos à concentração de 3,2 pmoles e água livre de DNase e RNase para o volume final de 20 µL, tendo as mesmas sido processadas em termociclador automático (GeneAmp PCR Systems 9600, Applied Biosystems) programado para realizar 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 95ºC por 10 segundos, hibridização dos iniciadores (NF e NR) a 55 ºC por 5 segundos e síntese a 60 ºC por 3 minutos.

A precipitação do DNA se deu pela adição de 60µL de Etanol absoluto, ao volume total da reação de sequenciamento. Em seguida as amostras foram submetidas a outras etapas que foram: incubação por 15 minutos a TA, seguida de uma centrifugação por 45 minutos a 14.000 rpm a 8 ºC. Posteriormente, foi feita uma lavagem com 60 µL de etanol a 70% e outra centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 8 ºC . Nesta etapa foi realizada outra incubação, a 95ºC por 2 minutos, para que ocorresse completa evaporação do etanol. A reconstituição do DNA foi feita com a adição de 10 µL com uma solução de formamida Hi-Di (Applied Byosystems).

A finalização ocorreu com a eletroforese por capilaridade no

sequenciador automático, quando então os fragmentos de DNA marcados foram separados de acordo com seus tamanhos e detectados por emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda. A interpretação foi feita pelo sistema computacional do equipamento segundo códigos de cores (azul, vermelho, verde e amarelo) ao terem passado pela região de leitura ótica do sequenciador.

4.4.5 Análise filogenética

As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas entre si e com outras sequências disponíveis no GeneBank, com o auxílio da ferramenta BLAST nucleotídeo (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), afim de confirmar a similaridade com outras cepas do VRab e, posteriormente, analisadas pelo programa SeqMan® II, versão 5.03 (DNASTAR® Lasergene).

O alinhamento das sequências obtidas juntamente com sequências de outras cepas do VRab foi feito pelo programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997), implementado pelo programa BioEdit versão 5.0 (HALL, 2001), sendo feito o ajuste manual, quando necessário.

Para a análise filogenética foram adotados os métodos de Máxima Verossimilhança (MV) implementado pelo programa PHYML (GUINDON; GASCUEL, 2003) e Bayesiano realizada pelo programa MrBayes. O programa Moldtest versão 3.7 (POSADA; CRANDALL, 1998) foi utilizado para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica baseado no critério de informação Akaike (*Akaike Information Criterion*, AIC).

Para a análise pelo método de MV, a matriz de distância foi calculada

a partir das sequências alinhadas usando o modelo escolhido pelo Moldtest. A análise de *bootstrap* foi realizada usando 1.000 pseudoréplicas (valor de confiabilidade de 70%), obtidas a partir do alinhamento original entre as sequências para a obtenção de resultados mais confiáveis (FELSENSTEIN et al., 1985).

A análise Bayesiana foi realizada empregando o modelo de Markov Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*, MCMC) e implementada no programa MrBayes 3.0b4. A análise foi feita para dois milhões de réplicas, sendo a amostragem fixada a cada 1.000 árvores geradas. Os valores Bayesianos foram estimados em 50% das árvores consenso geradas (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). O programa TRACER (www.evolve.zoo.ox.ac.uk) foi utilizado para verificar se a análise realizada pelo programa MrBayes alcançou a convergência apropriada.

O processo de análise filogenética deu-se conjuntamente com sequências de cepas do VRab de variantes antigênicas circulantes no Brasil (VAg2, VAg3, *Callithrix*, *Eptesicus*, *Nyctinomops*) e em outros países das Américas (VAg1, VAg4, VAg6 e VAg7), assim como a VLab, representada pelas cepas de vírus fixos AV01 (X13357) e CVS (D42112). O VMOK representando o genótipo III (NC_006429), e o VDUV (U22848), pertencente ao genótipo IV, foram utilizados como grupo externo.

5 RESULTADOS

No período de janeiro de 2000 a julho de 2009, um total de 22.617 amostras, de encéfalos humanos (n=72) e animais (n=22.545), foi testado para a presença do vírus rábico. Das 72 amostras de humanos examinadas, 35 (48,61%) foram positivas, sendo 26 (74,29%) do Pará, oito (22,87%) de Rondônia e uma (2,87%) do Acre. Das 17.137 amostras de caninos examinadas, 756 (4,41%) foram positivas, assim distribuídas: Acre 171/2.260 (7,57%), Amapá 0/88, Amazonas 6/1.583 (0,38%), Maranhão 11/160 (6,88%), Pará 164/7.436 (2,21%), Rondônia 404/5.610 (7,2%), ou seja, entre os caninos a média de positivos para raiva foi de 4,41% (tabela 1).

Tabela 1. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, de acordo com estado, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

	Positivos / Examinados (%)								
	AC	**AP**	**AM**	**MA**	**PA**	**RO**	**RR**	**TO**	**TOTAL**
Humanos	1/3 (33,33%)	-	0/1	0/1	26/57 (45,61%)	8/9 (88,89%)	0/1	-	**35/72 (48,61%)**
Canino	171/2.260 (7,57%)	0/88	6/1.583 (0,38%)	11/160 (6,88%)	164/7.436 (2,21%)	404/5.610 (7,2%)	-	-	**756/17.137 (4,41%)**
Felino	3/26 (11,54%)	0/1	0/21	0/13	12/407 (2,95%)	23/234 (9,83%)	-	-	**38/702 (5,41%)**
Bovídeos	11/33 (33,33%)	0/4	6/16 (37,5%)	1/3 (33,33%)	46/115 (40%)	10/39 (26,64%)	-	-	**74/210 (35,24%)**
Equídeos	5/6 (83,33%)	0/2	1/3	1/2 (50%)	5/24 (20,83%)	1/7 (14,29%)	-	0/1	**13/45 (28,89%)**
Outros animais Domésticos[1]	-	-	0/1	0/1	2/16 (12,5%)	0/3	-	-	**2/21 (9,52%)**
Quirópteros	0/4	1/88 (1,14%)	0/369	-	13/3.777 (0,34%)	0/91	0/17	-	**14/4.346 (0,32%)**
Outros animais silvestres[2]	0/1	0/2	1/24 (4,17%)	0/2	0/18	0/38	-	-	**1/85 (1,18%)**
TOTAL	**191/2.333 (8,19%)**	**1/184 (0,54%)**	**14/2.018 (0,69%)**	**13/182 (7,14%)**	**268/11.850 (2,26%)**	**446/6.031 (7,4%)**	**0/18**	**0/1**	**933/22.617 (4,13%)**

[1] ovinos, caprinos, suínos e leporinos; [2] capivara, irara, murino, quati, esquilo, preguiça, símio; AC, Acre; AP, Amapá; AM, Amazonas; MA, Maranhão; PA, Pará; RO, Rondônia; RR, Roraima; TO, Tocantins. Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

No estado do Acre, entre janeiro de 2000 e julho de 2009, observou-se que a espécie canina apresentou o maior número de casos, com 171 (90%) casos positivos em animais, seguido pelos bovídeos, com 11 (5,79%) casos registrados. Foi ainda registrado, um (33,33%) caso humano positivo no ano de 2001 (tabela 2).

Tabela 2. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Acre, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

	Humana	Canina	Felina	Bovídea	Equídea	Quiróptera	Outros animais silvestres	Total
2000	0/1	45/605 (7,44%)	1/9 (11,11%)	1/2 (50,00%)				**47/617 (7,62%)**
2001	1/1 (100%)	79/294 (26,87%)	1/9 (11,11%)	3/7 (42,86%)	2/2 (100%)	0/2		**85/314 (27,07%)**
2002	0/1	39/390 (10,00%)	0/2	0/10	0/1			**40/404 (9,9%)**
2003		4/275 (1,45%)	1/2 (50,00%)	1/2 (50,00%)		0/1		**6/280 (2,14%)**
2004		4/546 (0,73%)	0/3	6/12 (50,00%)	3/3 (100%)			**13/565 (2,3%)**
2005								
2006		0/59				0/1		**0/60**
2007		0/1						**0/1**
2008								**0**
2009		0/90	0/1				0/1	**0/92**
	1/3 (33,33%)	**171/2.260 (7,57%)**	**3/26 (11,54%)**	**11/33 (33,33%)**	**5/6 (83,33%)**	**0/4**	**0/1**	**191/2.333 (8,19%)**

Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

No estado do Amapá, entre janeiro de 2000 e julho de 2009, observou-se positividade em somente uma amostra de quiróptero não hematófago da espécie *Artibeus planirostris* ocorrido na capital, Macapá (tabela 3), e diagnosticado no LACEN local do qual chegou ao IEC somente o encéfalo do camundongo para confirmação da PB e caracterização antigênica.

Tabela 3. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Amapá, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

	Canina	Felina	Bovídea	Equídea	Quiróptera	Outros animais silvestres	Total
2000	0/20		0/1		0/11	0/1	**0/33**
2001	0/2				0/1		**0/3**
2002	0/4				0/10		**0/14**
2003	0/3				0/7	0/1	**0/11**
2004	0/25	0/1			0/12		**0/38**
2005	0/12		0/2		0/20		**0/34**
2006	0/22				0/21		**0/43**
2007					0/5		**0/5**
2008					1/1 (100%)		**1/1 (100%)**
2009			0/1	0/1			**0/2**
	0/88	**0/1**	**0/4**	**0/1**	**1/88 (1,36%)**	**0/2**	**1/184 (0,54%)**

Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

No estado do Amazonas, entre janeiro de 2000 e julho de 2009, observou-se que as espécies canina e bovina apresentaram os maiores números de casos, com seis (42,85%) dos casos positivos em cada espécie (tabela 4). Da espécie humana, o estado encaminhou somente uma amostra no ano de 2005 que resultou negativa.

Tabela 4. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Amazonas, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

	Canina	Felina	Bovídea	Equídea	Outros animais Domésticos	Quiróptera	Outros animais Silvestres	Total
2000								**0**
2001	0/5						0/2	**0/7**
2002	1/9 (11,11%)					0/29		**1/38 (2,63%)**
2003	5/5 (100%)		3/3 (100%)			0/125		**8/133 (6,02%)**
2004	0/188	0/3	0/2			0/42	0/16	**0/251**
2005	0/92	0/2	1/1 (100%)		0/1	0/18	0/1	**1/116 (0,86%)**
2006	0/437	0/6	1/3 (33,33%)	1/2 (50%)		0/33	0/1	**2/482 (0,41%)**
2007	0/494	0/1	0/2			0/43	1/1 (100%)	**1/541 (0,18%)**
2008	0/324	0/6	0/2	0/1		0/56	0/1	**0/390**
2009	0/29	0/3	1/3			0/23	0/2	**1/60 (1,67%)**
Total	**6/1.583 (0,38%)**	**0/21**	**6/16 (37,5%)**	**1/3 (33,33%)**	**0/1**	**0/369**	**1/24 (4,17%)**	**14/2.018 (0,69%)**

Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

No estado do Maranhão, entre janeiro de 2000 e julho de 2009, observou-se que a espécie canina apresentou o maior número de casos, com 11 (84,62%) dos 13 casos positivos em animais, seguido pelos bovídeos e equídeos, com um (7,69%) caso registrado para cada (tabela 5). Da espécie humana, o estado do Maranhão encaminhou somente uma amostra no ano de 2002 que resultou negativa.

Tabela 5. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Maranhão, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

	Canina	Felina	Bovídea	Equídea	Outros animais domésticos	Outros animais silvestres	Total
2000	0/1						**0/1**
2001	3/8 (37,5%)						**3/8 (37,5%)**
2002	8/149 (5,37%)	0/13	1/3 (33,33%)	1/2 (50%)	0/1	0/2	**10/171 (5,85%)**
2003	0/1	0	0				**0/1**
2004	0/1	0	0				**0/1**
Total	**11/160 (6,88%)**	**0/13**	**1/3 (33,33%)**	**1/2 (50%)**	**0/1**	**0/2**	**13/182 (7,14%)**

Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

No estado do Pará houve a ocorrência de casos de raiva em todo o período estudado, com a positividade de casos em quase todas as espécies animais examinadas, conforme demonstrado na figura abaixo (figura 10).

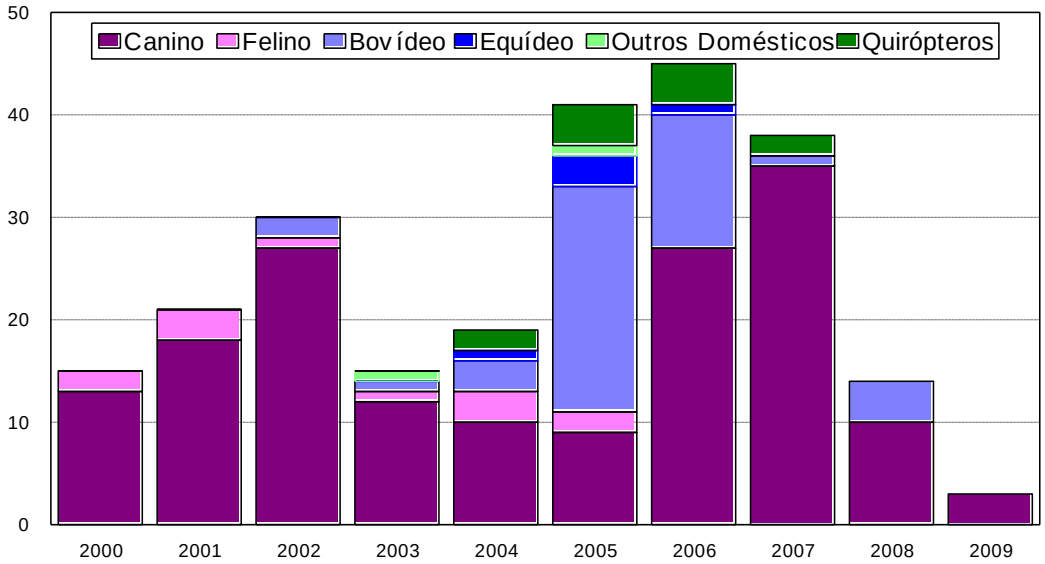


Figura 10. Amostras positivas de animais do estado do Pará diagnosticadas no IEC, entre janeiro de 2000 e julho de 2009.
Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

No estado do Pará, entre janeiro de 2000 e julho de 2009, observou-se que a espécie canina apresentou o maior número de casos, com 164 (68,05%) dos casos positivos em animais, seguido pelos bovídeos, com 46 (19,09%) casos registrados. Da espécie humana, o estado do Pará encaminhou 57 amostras de SNC, das quais 26 (45,57%) resultaram positivas (tabela 6)

Tabela 6. Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado do Pará, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

	Humana	**Canina**	**Felina**	**Bovídea**	**Equídea**	**Outros domésticos**	**Quiróptera**	**Outros silvestres**	**TOTAL**
2000	2/2 (100%)	13/155 (8,39%)	2/42 (4,76%)	0/1	0		0/44	0/1	**17/245 (6,94%)**
2001	1/7 (14,29%)	18/144 (12,5%)	3/38 (7,89%)	0/3			0/146	0/2	**22/340 (6,47%)**
2002	1/3 (33,33%)	27/371 (7,28%)	1/32 (3,13%)	2/5 (40%)	0/4		0/177	0/1	**31/593 (5,23%)**
2003		12/498 (2,41%)	1/45 (2,22%)	1/5 (20%)	0/5	1/5 (20%)	0/215	0/4	**15/777 (1,93%)**
2004	10/22 (45,45%)	10/672 (1,49%)	3/51 (5,88%)	3/12 (25%)	1/4 (25%)	0/1	2/791 (0,25%)		**29/1.553 (1,87%)**
2005	12/18 (66,67%)	9/1.418 (0,63%)	2/70 (2,86%)	22/38 (57,89%)	3/5 (60%)	1/4 (25%)	4/816 (o,49%)	0/6	**53/2.375 (2,23%)**
2006		27/1.558 (1,73%)	0/52	13/30 (43,33%)	1/2 (50%)	0/2	4/670 (0,6%)		**45/2.314 (1,94%)**
2007	0/2	35/1.226 (2,85%)	0/35	1/5 (20%)	0/3	0/1	3/453 (0,66%)	0/2	**39/1.727 (2,26%)**
2008	0/2	10/967 (1,03%)	0/22	4/13 (30,77%)	0/1	0/2	0/318	0/2	**14/1.327 (1,06%)**
2009	0/1	3/427 0,7%)	0/20	0/3		0/1	0/147		**3/599 (0,5%)**
	26/57 (45,61%)	**164/7.436 (2,21%)**	**12/407 (2,95%)**	**46/115 (40%)**	**5/24 (20,83%)**	**2/16 (13%)**	**13/3.777 (0,34%)**	**0/18**	**268/11.850 (2,26%)**

Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

Na espécie felina, os maiores números de casos positivos ocorreram nos anos de 2001 e 2004, com três casos em cada ano. Dos animais silvestres, somente 13 amostras de quirópteros resultaram positivas, correspondendo a oito amostras de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* (um identificado no Instituto Pasteur/SP e os demais pelos Profs. Drs. Wilson Uieda da UNESP e Nelson Ribeiro do IEC) e cinco de não hematófagos das espécies: *Artibeus planirostris* (n=1), *Artibeus obscurus* (n=1), *Myotis nigricans* (n=1); *Eptesicus brasiliensis* (n=1), identificados pelos Drs. Wilson Uieda e Nelson Ribeiro, e *Uroderma bilobatum* (n=1) identificado no Instituto Pasteur/SP (quadro 6).

Quadro 6. Espécies de morcegos com diagnostico positivo de raiva no IEC, provenientes do estado do Pará.

Espécie	Família	Hábito Alimentar	n
Desmodus rotundus (E. Geoffroy, 1810)	P	Hematófago	8
Artibeus planirostris (Spix, 1823)	P	Frugívoro	1
Artibeus obscurus (Schinz, 1821)	P	Frugívoro	1
Myotis nigricans (Schinz, 1821)	V	Insetívoro	1
Eptesicus brasiliensis (Desmarest, 1821)	V	Insetívoro	1
Uroderma bilobatum (Peters, 1821)	P	Frugívoro	1

n: quantidade; P: Phyllostomidae; V: Vespertilionidae.
Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

No estado de Rondônia, entre janeiro de 2000 e julho de 2009, observou-se que a espécie canina apresentou o maior número de casos, com 404 (92,24%) dos casos positivos em animais, seguido pelos felinos, com 23 (5,25%) casos registrados. Da espécie humana, o estado de Rondônia encaminhou nove amostras das quais oito (88,89%) resultaram positivas (tabela 7).

Tabela 7 – Total de amostras positivas, examinadas e percentual de positividade para raiva de humanos e outros animais, do estado de Rondônia, diagnosticadas no IEC no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

	Humana	**Canina**	**Felina**	**Bovídea**	**Equídea**	**Outros domésticos**	**Quiróptera**	**Outros silvestres**	Total
2000	4/4 (100%)	126/621 (20,29%)	11/37 (29,73%)	0/2	0	0/1	0/13		**141/678 (20,8%)**
2001	4/4 (100%)	156/1.206 (12,94%)	9/15 (60%)	4/14 (28,57%)	1/2 (50%)		0/5	0/3	**174/1.249 (13,93%)**
2002	0/1	81/1.071 (7,56%)	3/51 (5,88%)	3/18 (16,67%)	0/2	0/2	0/9		**87/1.154 (7,54%)**
2003		27/1.125 (2,4%)	0/47	3/5 (60%)	0/1		0/4		**30/1.182 (2,54%)**
2004		4/668 (0,6%)	0/33		0/1		0/29		**4/731 (0,55%)**
2005		9/469 (1,93%)	0/19		0/1		0/17	0/35	**9/541 (1,66%)**
2006		1/280 (0,36%)	0/21				0/12		**1/313 (0,32%)**
2007		0/170	0/11				0/2		**0/183**
2008									
2009									
	8/9 (88,89%)	**404/5.610 (7,2%)**	**23/234 (9,83%)**	**10/39 (25,64%)**	**1/7 (14,29%)**	**0/3**	**0/91**	**0/38**	**446/6.031 (7,4%)**

Fonte: Banco de dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva/SAARB/IEC

O estado de Roraima encaminhou somente 18 amostras para diagnóstico, uma de humano em 2004 e 17 de quirópteros em 2007, e todas resultaram negativas nas provas diagnósticas, assim como o estado do Tocantins, que encaminhou somente uma amostra de equídeo, no ano de 2006.

Dos casos ocorridos em carnívoros domésticos no período de estudo, 48 (25,13%) procederam das capitais e 143 (74,87%) de municípios do interior dos

estados; ressalte-se que a raiva em carnívoros domésticos nas capitais não é mais diagnosticada desde o ano de 2004 e, gradualmente, houve redução no número de casos de raiva de carnívoros domésticos no panorama global da doença nas Américas (figura 10).

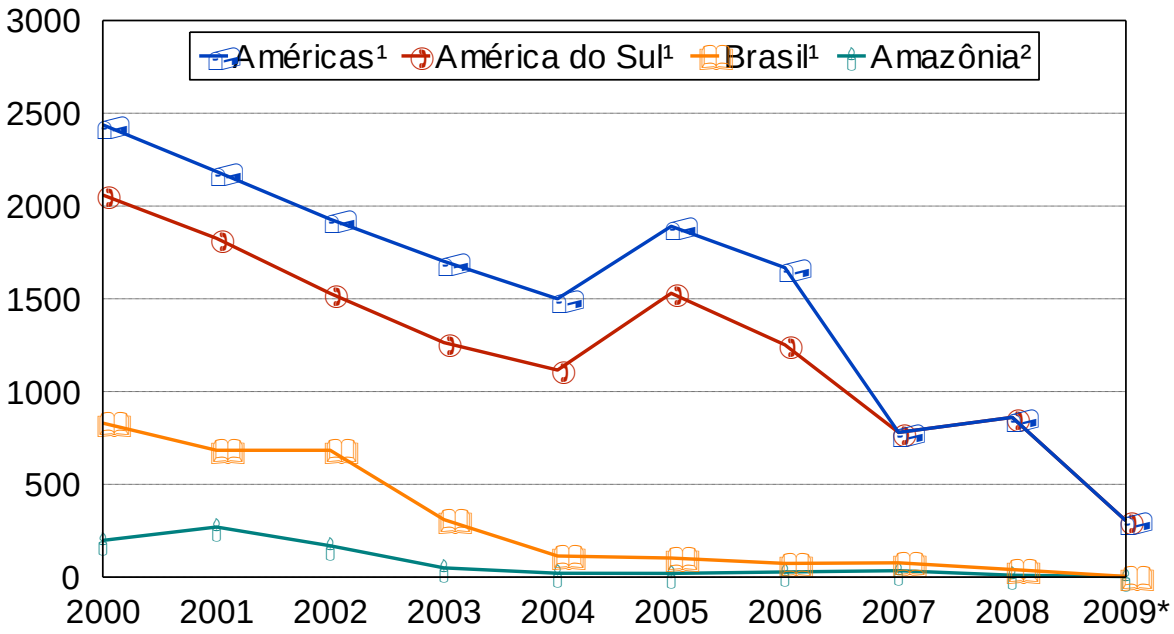


Figura 11. Número de casos de raiva em carnívoros domésticos entre janeiro de 2000 e julho de 2009.
Fonte: ¹PANAFTOSA/OPAS/OMS, Sistema de informação epidemiológica (2009); ²Dados do Laboratório de Diagnóstico de Raiva SAARB/IEC; *até julho.

Das 193 tentativas de re-isolamento das amostras de cães e gatos, 133 (68,91%) foram re-isoladas, mesmo após vários anos de estocagem a -70ºC. Das 133 cepas de VRab re-isoladas, 115 (86,47%) foram da espécie canina e 18 (13,53%) da espécie felina. Dentre os caninos, 74 (64,35%) foram do estado de Rondônia, 27 (23,48%) do Acre, 10 (8,7%) do Pará, duas (1,74%) do Amazonas e duas (1,74%) do Maranhão. Dentre os felinos, 10 (55,56%) procederam de Rondônia, cinco (27,78%) do Pará e três (16,68%) do Acre (apêndice A).

No período do estudo, foram submetidas à caracterização antigênica 232/898 (25,84%) amostras de animais positivas, correspondendo a 96 (41,38%)

do estado do Pará, 95 (40,95%) do estado de Rondônia, 31 (13,36) do Acre, seis (2,59%) do Amazonas, duas (0,86%) do Maranhão e uma (0,43%) do Amapá, das quais sete amostras não foram passíveis de caracterização, por apresentarem padrão de leitura, conforme mostrado no quadro a seguir (quadro 7), não compatível com o painel de anticorpos monoclonais disponível, e quatro resultaram VLab (amostra de vírus fixo, caracterizada por reações em todos os AcM), sendo então submetidas ao estudo genético.

De 265 amostras de humanos e animais submetidas ao teste de IFI com o painel de AcM, para caracterização antigênica (apêndice B), 97,08% (166/171) das cepas virais isoladas a partir de encéfalo de caninos mostraram padrão de leitura compatível para VAg2 (quadro 2) (p<0,0001); 1,75% (3/171) foram caracterizadas como variante laboratorial, ou seja, reagiram com os oito anticorpos monoclonais testados; 0,58% (1/171) mostrou padrão de leitura compatível com VAg3, e em 0,58% (1/171) das cepas virais a de registro número 31.739, não foi possível determinar a variante antigênica, pois não reagiu com nenhum dos oito AcM, a partir de material original, e resultou negativa à PB.

Quadro 7. Perfis de leitura das amostras não compatíveis com o painel de anticorpos monoclonais.

Espécie	Procedência	UF	Registro	Padrão de leitura no painel de AcM							
				C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19
Bovina	Medicilândia	PA	25.480	-	+	+	+	+	-	-	F
Bovina	Tracuateua	PA	26.740	-	F	F	+	+	-	-	F
Bovina	Bragança	PA	26.742	+	+	+	+	+	-	-	F
Quiróptero	Irituia	PA	27.433	F	+	+	+	+	-	-	-
Quiróptero	Senador José Porfirio	PA	29.526	F	+	-	+	+	-	-	F
Canina	Tucuruí	PA	31.739	-	-	-	-	-	-	-	-
Bovina	Apuí	AM	32.965	-	+	+	+	+	+	-	+

Legenda: -, reação negativa; +, reação positiva; F, reação fraca

Para amostras de felinos, 19 (95%) foram compatíveis com VAg2, e uma amostra (5,0%), procedente do município de Augusto Corrêa (PA), mostrou-se positiva com perfil para VAg3 (p<0,0001).

As amostras de animais procedentes do estado do Acre que foram caracterizadas, 23 (74,19%) ocorreram na capital do estado, enquanto oito (25,81%) ocorreram no interior. Do estado do Amazonas, foi caracterizada uma (16,67%) amostra da capital e outras cinco (83,33%) do interior do estado. As amostras de animais procedentes do estado do Maranhão foram caracterizadas e uma (50%) foi do interior e outra (50%) da capital maranhense. Das amostras de animais paraenses, somente duas (2,08%) foram procedentes da capital, enquanto as demais 94 (97,92%) amostras procederam de municípios do interior do estado. No estado de Rondônia, 24 (23,30%) das amostras procederam da capital, Porto Velho, enquanto 79 (76,70%) eram procedentes do interior do estado.

Ao visualizarmos a distribuição das variantes antigênicas em carnívoros domésticos por municípios dos estados da região, observamos a ampla distribuição da VAg2 (figura 12). O município com maior número de cepas da VAg2 foi Marabá (PA) com 32 (17,3%), seguido por Porto Velho (RO) com 24 (12,97%) e Rio Branco (AC) com 23 (12,43%).

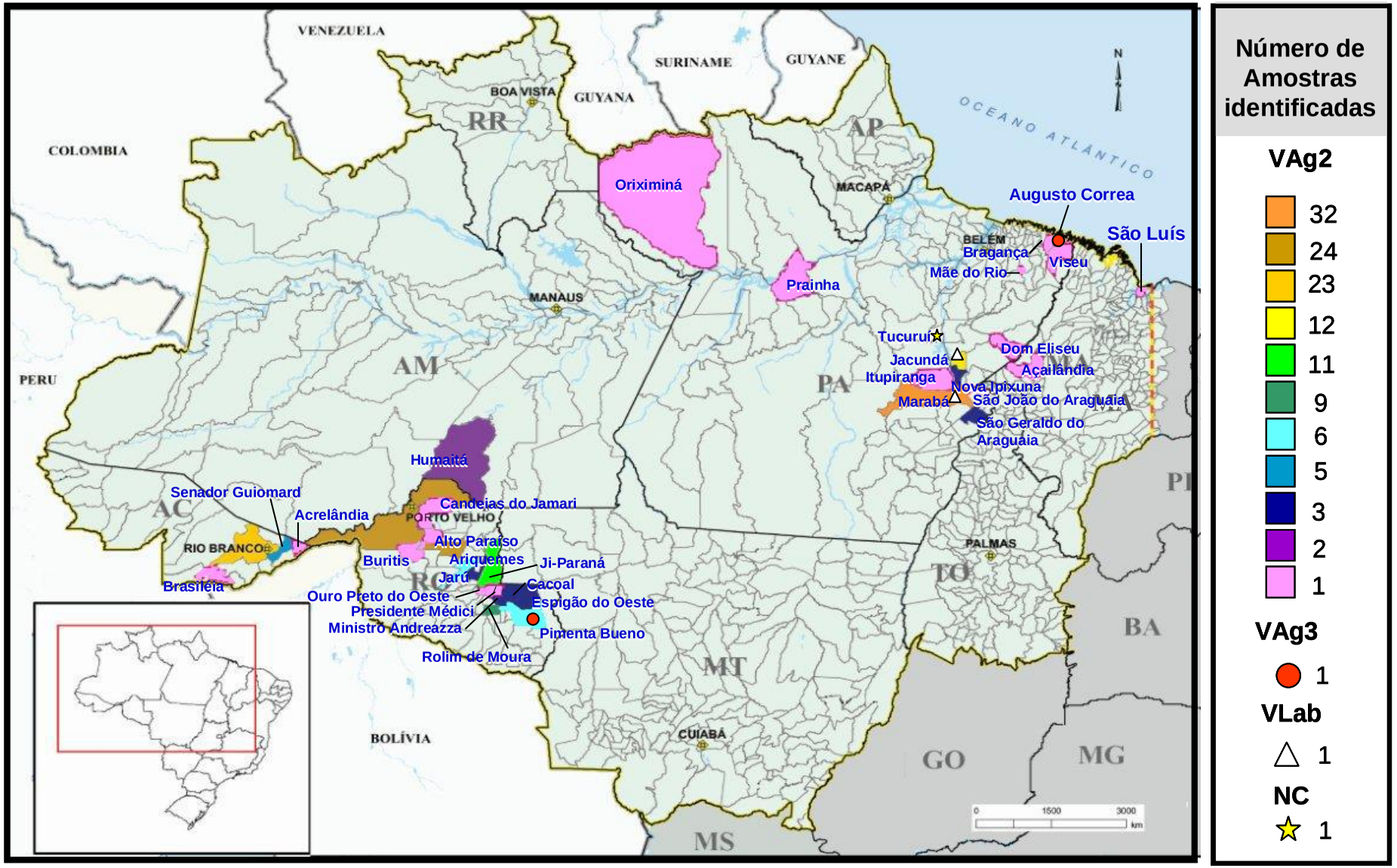


Figura 12. Mapa da região Amazônica, mostrando os estados e municípios de procedência das cepas do VRab isoladas de carnívoros domésticos caracterizadas antigenicamente de acordo com o número de amostras positivas testadas.

Animais do ciclo rural, resultaram positivos para VRab em 32,25% (89/276), sendo 83,15% (74/89) bovídeos, 14,61% (13/89) equídeos e 2,45% (2/89) em outros animais domésticos de produção (suínos). Destas amostras, 25 foram submetidas à caracterização antigênica, sendo 21 de bovídeos, três de equídeos e uma de suíno, das quais 21 (84%) foram VAg3, porém quatro (16%) isolados do VRab de bovídeos não foram possíveis de caracterizar a variante antigênica pelo painel de AcM, pois não mostraram padrões de leitura compatíveis com os das variantes já encontradas nas Américas (quadro 7) (figura 13).

No período do estudo, 14 isolados de quirópteros foram caracterizados antigenicamente, dos quais, dez (71,43%) foram VAg3, um (7,14%) foi VLab, e três (21,43%) quirópteros não puderam ser caracterizados antigenicamente por apresentarem reações muito fracas no painel de AcM, ou por apresentarem perfis de leitura diferentes dos padrões estabelecidos pelo painel dos CDC. Somente um animal silvestre terrestre, uma irara (*Eira barbara*), foi positivo neste período, o qual foi antigenicamente caracterizado como VAg4 (figura 13).

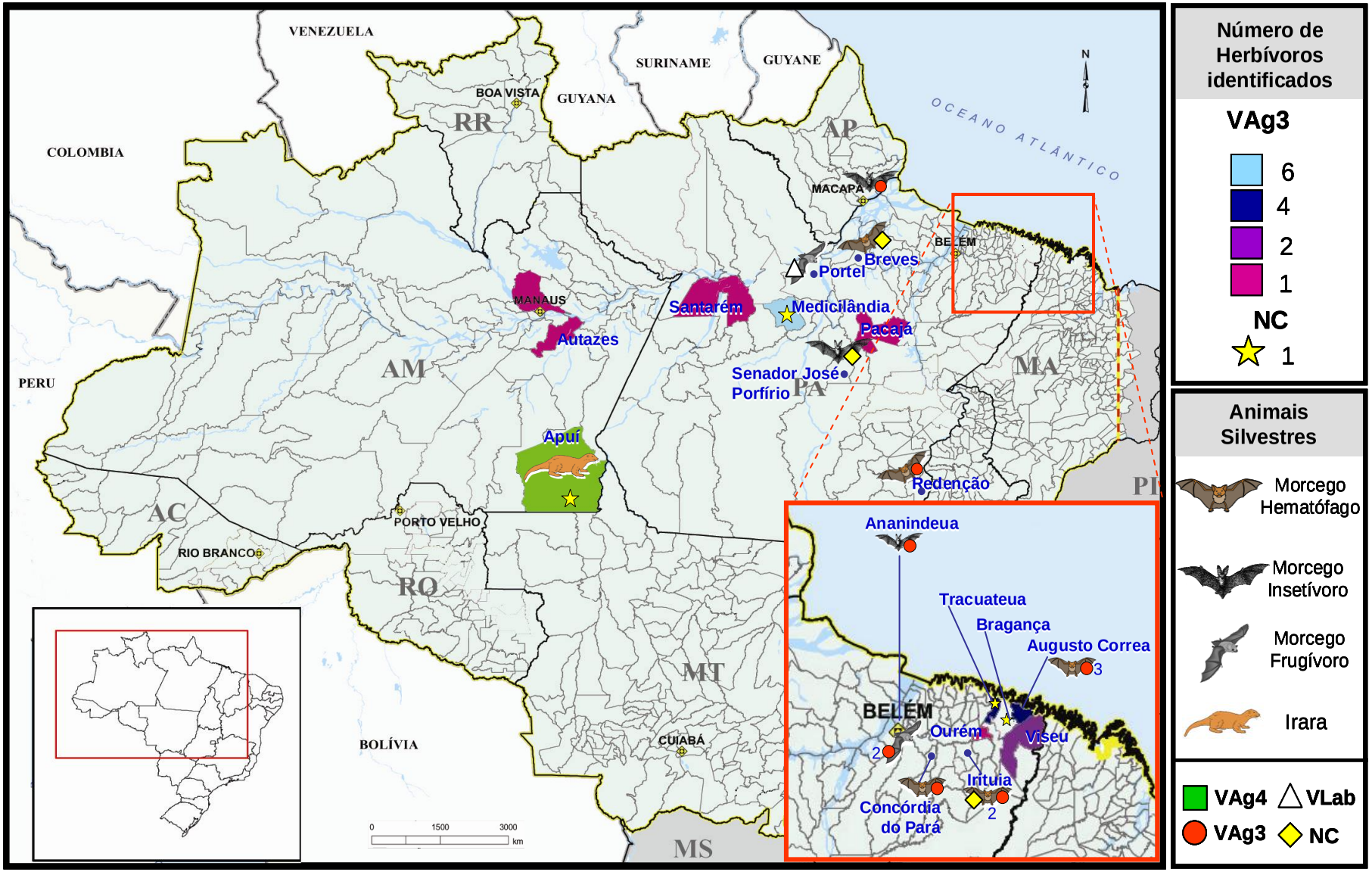


Figura 13. Mapa da região Amazônica, mostrando os estados e municípios de procedência das cepas do VRab isoladas de herbívoros domésticos e animais silvestres caracterizadas antigenicamente de acordo com o número de amostras positivas testadas.

Até o ano de 2004 as amostras humanas e de quirópteros eram remetidas para caracterização antigênica no Instituto Pasteur (São Paulo), que atua como laboratório de referência nacional para o diagnóstico da raiva. Entre os anos de 2000 a 2002, ocorreram 13 casos de raiva humana na Amazônia brasileira diagnosticados no IEC, destes, 12 foram antigenicamente caracterizados como VAg2; e um apresentou perfil compatível com VLab; as cepas de VRab isoladas de humanos a partir de 2004 foram todas identificadas como VAg3 (n=22), sendo dez no ano de 2004 e doze em 2005. Esse fato influenciou na mudança epidemiológica do cenário nacional com relação à raiva humana e seus transmissores, sendo verificado que até o ano de 2003 o cão se mostrava o principal transmissor de raiva humana, estando novamente em evidência nos anos de 2006 e 2007 (figura 14).

Quando partimos para uma análise temporal global da infecção pelo VRab em carnívoros domésticos na Amazônia brasileira, verificamos que o estado de Rondônia era o de maior incidência de raiva até o ano de 2003; nesse mesmo período o estado do Acre assumia o segundo lugar em número de casos de raiva em carnívoros domésticos. A partir do ano de 2003, o estado do Pará assumiu o segundo lugar em número de casos, e a partir de 2004 passou para o primeiro lugar, sendo responsável por 55,56% dos casos de raiva em carnívoros domésticos diagnosticados no IEC. Esta situação é provavelmente reflexo da descentralização do diagnóstico da raiva, com implantação das técnicas de diagnóstico específico em diversos estados da região Amazônica, que resultou em realização local do exame e, na consequente redução de amostras suspeitas recebidas no IEC.

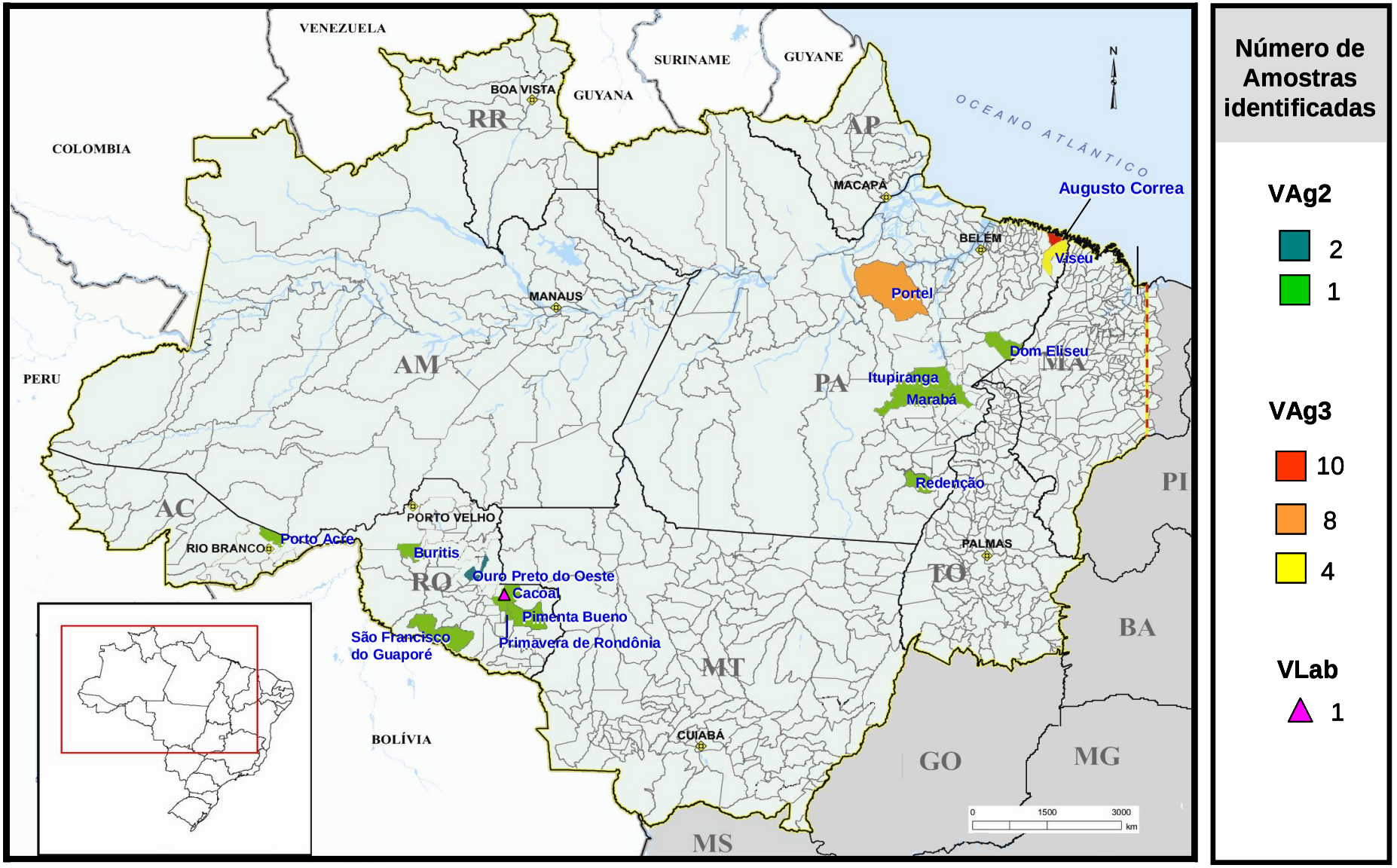


Figura 14. Mapa da região Amazônica, mostrando os estados e municípios de procedência das cepas do VRab isoladas de humanos caracterizadas antigenicamente de acordo com o número de amostras positivas testadas.

Para caracterização genética de cepas do vírus rábico foram selecionadas 21 amostras, dentre estas, as sete cepas do VRab que não foram possíveis determinar a variante antigênica pela técnica de IFI utilizando o painel de AcM e, as cinco que foram compatível com a VLab, e finalmente outras novas cujas variantes antigênicas foram determinadas pela técnica de IFI a fim de se ter um controle na montagem da árvore (quadro 8); dessas, foram obtidos amplicons de 490 pb determinados entre as posições 868 e 1359 da nucleoproteína do VRab (figura 15).

Quadro 8. Amostras selecionadas para caracterização genética.

Ano	Hospedeiro	Espécie	Procedência	UF	Registro	VAg
2000	Humana†	*Homo sapiens*	Cacoal	RO	9.776	VLab
2004	Canina	*Canis familiaris*	Senador Guiomard	AC	18.324	VLab
2004	Canina	*Canis familiaris*	Pimenta Bueno	RO	19.891	VAg3
2004	Quiróptero†	*Desmodus rotundus*	Breves	PA	19.448	VAg3
2005	Canina	*Canis familiaris*	Ariquemes	RO	24.009	VAg2
2005	Canina	*Canis familiaris*	Ariquemes	RO	24.397	VAg2
2006	Bovina	*Bos taurus*	Medicilândia	PA	25.480	NC
2006	Canina	*Canis familiaris*	São João do Araguaia	PA	26.730	VAg2
2006	Bovina	*Bos taurus*	Tracuateua	PA	26.740	NC
2006	Bovina	*Bos taurus*	Bragança	PA	26.742	NC
2006	Canina	*Canis familiaris*	Marabá	PA	27.229	VLab
2006	Canina	*Canis familiaris*	Jacundá	PA	27.235	VLab
2006	Quiróptero	*Desmodus rotundus*	Irituia	PA	27.433	NC
2006	Canina	*Canis familiaris*	Marabá	PA	27.949	VAg2
2007	Irara	*Eira barbara*	Apuí	AM	29.373	VAg4
2007	Quiróptero	*Eptesicus brasiliensis*	Senador José Porfirio	PA	29.526	NC
2007	Quiróptero	*Artibeus obscurus*	Belém	PA	29.787	VAg3
2007	Quiróptero	*Myotis nigricans*	Concórdia do Pará	PA	30.403	VLab
2008	Canina	*Canis familiaris*	Marabá	PA	31.146	VAg2
2008	Canina	*Canis familiaris*	Tucuruí	PA	31.739	NC
2009	Bovina	*Bos taurus*	Apuí	AM	32.965	NC

† Amostra caracterizada antigenicamente no IP/SP; NC = variante antigênica não compatível com painel de AcM; VAg = Variante antigênica.

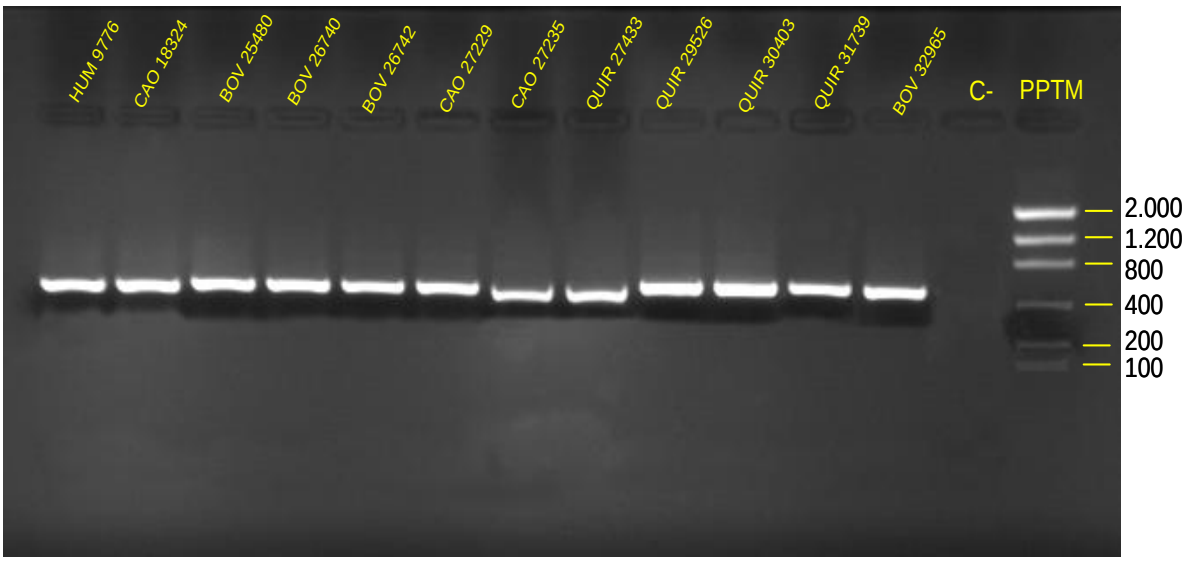


Figura 15. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etidio, mostrando amplicons do gene N do VRab das amostras NC e VLab.
Legenda: PPTM, Padrão de peso e tamanho molecular valores expressos em pares de base; Low DNA Mass Ladder (Invitrogen); C-, controle negativo.

As sequências nucleotídicas parciais do gene N do VRab com aproximadamente 450 nt foram primeiramente analisadas pelo programa BLAST *search* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), e identificadas como cepas do VRab pertencentes ao genótipo I.

Ambos os métodos utilizados, MV e Bayesiano, apresentaram árvores filogenéticas com topologias similares, utilizando o modelo de substituição nucleotídica GTR+G (Base=[0,2880; 0,1899; 0,2487]; Nst=6; Rmat=[1,7507; 7,3084; 0,9473; 0,4698; 9,5367]; Taxa=gama, formato=0,2860 , Pinvar=0) determinado pelo critério de AIC.

De acordo com a análise filogenética, as cepas relacionadas ao genótipo I do VRab foram divididas em dois grupos principais: um relacionado aos vírus circulantes em morcegos (*bootstrap* 83,1%) e outro aos circulantes em carnívoros (*bootstrap* 75,8%). De modo geral as variantes genéticas, representados

como clados, corresponderam às variantes antigênicas, com exceção das variantes VAg4 a qual foi representada por três clados distintos: VAg4 I, VAg4 II e VAg4 III (figura 16).

No grupo relacionado aos morcegos foi possível identificar o clado que agrupa cepas relacionadas à VAg3, própria do quiróptero hematófago *Desmodus rotundus* (*bootstrap* 75,5%); e outras variantes relacionadas aos quirópteros não hematófagos, associados com os clados: da VAg4, que agrupa cepas relacionadas à variante antigênica de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis* isoladas nos EUA (clado VAg4 I: FJ220886, AF351849; *bootstrap* 100%) e da isolada no Chile (clado VAg4 II: AF070450; *bootstrap* 80,3%); o clado que relaciona as cepas isoladas de morcegos do gênero *Eptesicus* (FAVORETTO et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2007) (*bootstrap* de 97,9%); o clado que inclui cepas relacionadas aos morcegos das espécies *Nyctinomops laticaudatus* e *Tadarida laticaudata,* sendo referido como variante genética de *Nyctinomops* (KOBAYASHI et al., 2007) com valores de *bootstrap* de 99,9%; o clado "*Callithrix*", que agrupa cepas isoladas de macacos *Callithrix jacchus* capturados no estado do Ceará (*bootstrap* de 100%); o clado da VAg6, agrupa cepas isoladas nos EUA e Canadá relacionadas à variante antigênica de morcegos *Lasiurus cinereus* (*bootstrap* de 99,7%); o clado que relaciona cepas isoladas no Brasil de morcegos do gênero *Molossus*; e o clado da VAg4 III de cepa isolada de *Eira barbara* no estado do Amazonas (figura 16, quadro 9).

No grupo relacionado aos carnívoros foi possível identificar quatro clados, representados pelas seguintes variantes: o clado da VAg2 (*bootstrap* 93,4%), que foi subdividido em dois subclados, um relacionado a *Canis familiaris* (*bootstrap* 91,7%) e outro relacionado ao *Cerdocyon thous* (*bootstrap* 99,3%); o

clado da VLab (AV01 e CVS) (*bootstrap* 100%); o clado que agrupa as cepas relacionadas à VAg7 (Raposa do Arizona-EUA; *bootstrap* 100%); e o clado da VAg1, variante de Cão e Mangusto isoladas no México (*bootstrap* 92,6%), (figura 16, quadro 9).

As 21 amostras do VRab selecionadas para caracterização molecular foram distribuídas entre as variantes do clado da VAg3, *Eptesicus*, VAg4 III e VAg2 (subclado *Canis familiaris*). No clado VAg3 agrupam-se as cepas isoladas de bovino (Bov 25.480, Bov 26.740, Bov 26.742, Bov 32.965), de caninos (Cao 19.891, Cao 31.379) e de quirópteros das espécies de *Artibeus obscurus* (Quir 29.787), *Desmodus rotundus* (Quir 19.488, Quir 27.433) e *Myotis nigricans* (Quir 30.403), e as cepas isoladas dos casos humanos procedentes do surto de Portel/PA (EF363742; EF363743) e Viseu/PA (EF363757).

Quanto às cepas de VRab relacionadas às variantes de quirópteros não hematófagos, pode-se observar a inserção da cepa isolada de *Eptesicus brasiliensis* procedente de Senador José Porfírio, estado do Pará (Quir 29.526) ao suclado da variante genética relacionada às amostras de morcegos do gênero *Eptesicus*. A cepa isolada da irara (*Eira barbara*), Ira 29.373, procedente de Apuí, estado do Amazonas foi identificada como variante genética VAg4 III, sendo que esta apresentou uma topologia distante das demais cepas de VAg4 e mais próximo da variante de *Molossus*.

No grupo dos carnívoros, no clado da VAg2 relacionada aos cães domésticos (subclado *Canis familiares*) foram agrupadas: Hum 9.776, Cao 18.324, Cao 24.009, Cao 24.397, Cao 26.730, Cao 27.229, Cao 27.235, Cao 27.949, Cao 31.146, juntamente com as cepas: EF152276 procedente do Pará e EF152239 procedente da Paraíba (figura 16, quadro 9).

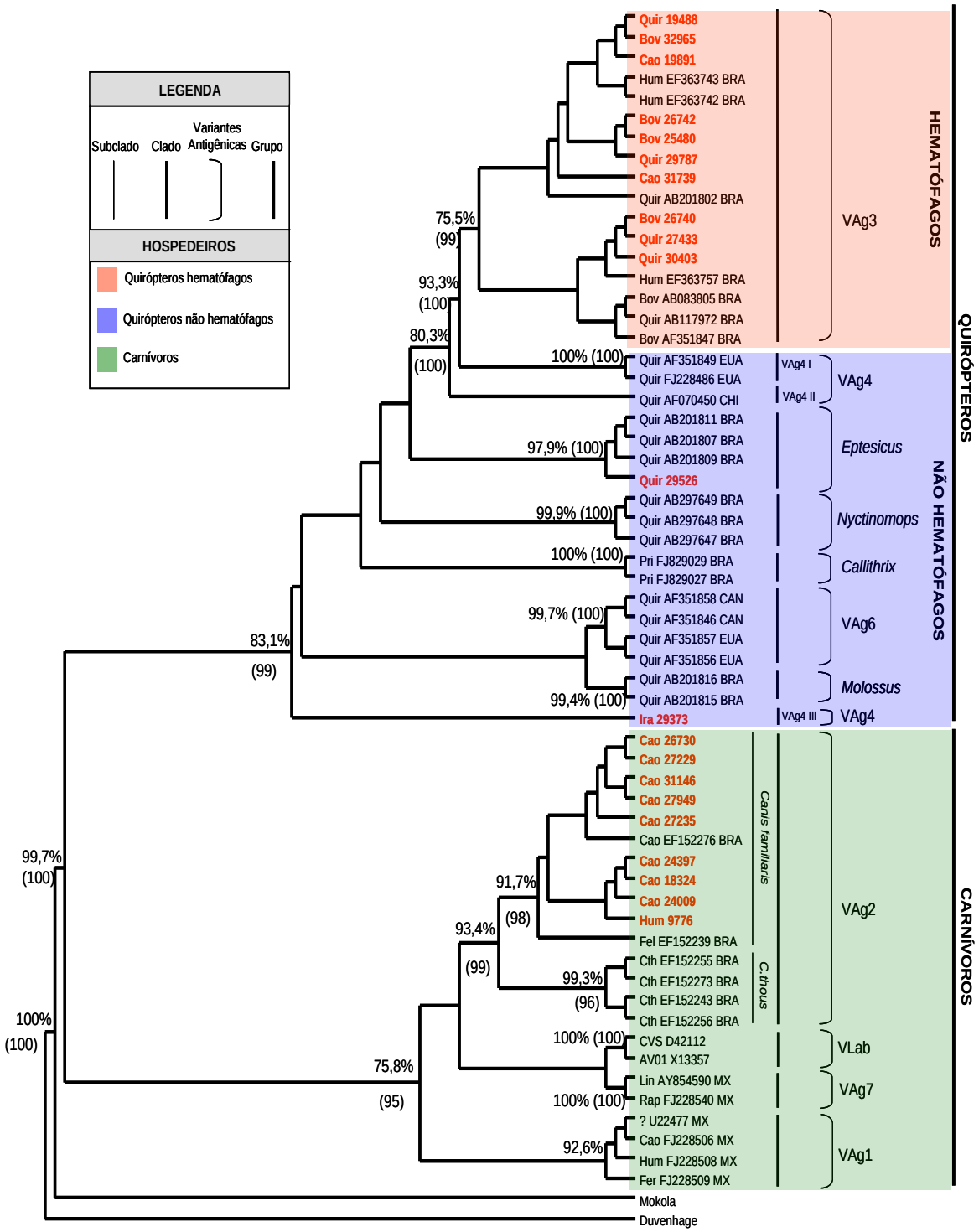


Figura 16. Árvore filogenética com sequências parciais do gene N (450 nt) do *vírus da Raiva* (VRab) pelo método de MV com cálculo de *Bootstrap* baseado em 1.000 pseudoréplicas. Dentro dos parênteses estão representados os valores do método Bayesiano. Observa-se a formação de dois grupos principais, Quirópteros e Carnívoros, e subdivisão em clados relacionado ás variantes antigênicas, sendo os *vírus Duvenhage* e *vírus Mokola* utilizados como grupo externo. Em vermelho, destacam-se as amostras deste estudo. As demais cepas do VRab estão denominadas de acordo com o hospedeiro, número de acesso do GenBank e país de isolamento, respectivamente.

Legenda: ? – sem informação; Bov – bovino; BRA – Brasil; CAN – Canadá; Cao – canino; CHI – Chile; Cth – *Cerdocyon thous*; Eq – equino; EQD – Equador; EUA – Estados Unidos da América; Fel – felino; Fer- ferret; GFR – Guiana Francesa; Hum – Humano; Ira – irara; Lin – Lince; MX – México; Pri – primata; Quir – quiróptero; Rap – raposa; AV – avirulenta; CVS - *Challenger Virus Standard*.

Quadro 9. Cepas do VRab utilizadas na análise filogenética de acordo com os hospedeiro, origem geográfica, ano de isolamento e variantes antigênicas.

Cepa do Vrab	Hospedeiro	Local (País, município/UF)	Ano	VAg	GeneBank	Referência
GI:55770806	*Vírus Mokola*	França, Paris	-	-	NC_006429	Le Mercier; Jacob; Tordo, 1997
86132AF	*vírus Duvenhage*	África, República da áfrica do Sul	1986	-	U22848	Kissi; Tordo; Bourhy, 1995
IP6609sg/05CE	*Callithrix jacchus*	Brasil, CE	2005	*Callithrix*	FJ829027	Kotait; Carrieri; Castilho
IP6648sg/08CE	*Callithrix jacchus*	Brasil, CE	2008	*Callithrix*	FJ829029	Kotait; Carrieri; Castilho
BR-NL2	*Nyctinomops laticaudatus*	Brasil, São José do Rio Preto/SP	1999	*Eptesicus*	AB201807	Kobayashi et al., 2005
BR-EA1	*Eumops auripendulus*	Brasil, Américo de Campos/SP	1998	Eptesicus	AB201809	Kobayashi et al., 2005
BR-EF1	*Eptesicus furinalis*	Brasil, São José do Rio Preto/SP	-	Eptesicus	AB201811	Kobayashi et al., 2005
BR-MM1	*Molossus molossus*	Brasil, Jales/SP	2002	*Molossus*	AB201815	Kobayashi et al., 2005
BR-MM2	*Molossus molossus*	Brasil, Ilha Solteira/SP	2002	*Molossus*	AB201816	Kobayashi et al., 2005
BR-NL4	*Nyctinomops laticaudatus*	Brasil, Rio de Janeiro/RJ	2004	*Nyctinomops*	AB297647	Kobayashi et al., 2007
BR-TL-1	*Tadarida laticaudata*	Brasil, Rio de Janeiro/RJ	1999	*Nyctinomops*	AB297648	Kobayashi et al., 2007
BR-TL-2	*Tadarida laticaudata*	Brasil, Rio de Janeiro/RJ	1999	*Nyctinomops*	AB297649	Kobayashi et al., 2007
440Mxgrodg99	Cão	Mexico, Guerrero	1999	VAg1	FJ228506	Velasco-Villa; Orciari; Rupprecht
3121Mxdfhm91	Humano	Mexico, Distrito Federal	1991	VAg1	FJ228508	Velasco-Villa; Orciari; Rupprecht
3142Mxdffer90	Ferret	Mexico, Distrito Federal	990	VAg1	FJ228509	Velasco-Villa; Orciari; Rupprecht
9126MEX	-	México	-	VAg1	U22477	Kissi; Tordo; Bourhy, 1995
10564ctPB	Gato	Brasil	2003	VAg2	EF152239	Carnieli Jr. et al., 2008
4372CthPI	*Cerdocyon thous*	Brasil	2005	VAg2	EF152243	Carnieli Jr. et al., 2008
6970CthPE	*Cerdocyon thous*	Brasil	2005	VAg2	EF152255	Carnieli Jr. et al., 2008
6973CthPE	*Cerdocyon thous*	Brasil	2005	VAg2	EF152256	Carnieli Jr. et al., 2008
7578CthBA	*Cerdocyon thous*	Brasil	2005	VAg2	EF152273	Carnieli Jr. et al., 2008
8575dgPA	Cão	Brasil	2005	VAg2	EF152276	Carnieli Jr. et al., 2008
BRbv32	Bovino	Brasil, São Roque/SP	1994	VAg3	AB083805	Ito et al., 2003
BR-AP1	*Artibeus planirostris*	Brasil, São José do Rio Preto/SP	1998	VAg3	AB117972	Shoji et al., 2004
BR-AL4	*Artibeus lituratus*	Brasil, Dracena/SP	2002	VAg3	AB201802	Kobayashi et al., 2005
BR-DR3	*Desmodus rotundus*	Brasil, São José do Rio Preto/SP	2001	VAg3	AB201805	Kobayashi et al., 2005
DR.Braz	Bovino	Brasil	1986	VAg3	AF351847	Nadin-Davis et al., 2001
IP3066M	Humano	Brasil, Portel/PA	2004	VAg3	EF363742	Travassos da Rosa et al., 2006
IP3067M	Humano	Brasil, Portel/PA	2004	VAg3	EF363743	Travassos da Rosa et al., 2006
IP7541	Humano	Brasil, Viseu/PA	2004	VAg3	EF363757	Travassos da Rosa et al., 2006
TB70450	*Tadarida brasiliensis*	Chile	-	VAg4	AF070450	Warner et al., 1999
TB1	*Tadarida brasiliensis*	EUA, Texas	-	Vag4	AF351849	Nadin-Davis et al., 2001
NMBATDic2007	*Tadarida brasiliensis*	EUA, Novo México	2007	VAg4	FJ228486	Velasco-Villa; Orciari; Rupprecht
93RABN6220	*Lasiurus cinereus*	Canadá, Ontario	1993	VAg6	AF351846	Nadin-Davis et al., 2001
91RABN6832	*Lasiurus borealis*	Canadá, Ontario	1991	VAg6	AF351856	Nadin-Davis et al., 2001
LB7; V583	*Lasiurus borealis*	EUA, Connecticut	1998	VAg6	AF351857	Nadin-Davis et al., 2001
96RABN4502	*Lasiurus cinereus*	Canadá, Ontario	1996	VAg6	AF351858	Nadin-Davis et al., 2001
V680	Lince (*Lynx rufus*)	Mexico, Chihuahua	1991	VAg7	AY854590	Nadin-Davis; Loza-Rubio, 2006
3907Mxsonbct	Raposa do Arizona	Mexico, Sonora	2002	VAg7	FJ228540	Velasco-Villa; Orciari; Rupprecht
CVS	vírus fixo	-	-	VLab	D42112	Tordo et al., 1986
AV01(avirulenta)	vírus fixo	-	-	VLab	X13357	Poch; Tordo; Keith, 1988

6 DISCUSSÃO

A raiva continua sendo um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento, tanto em áreas urbanas quanto rurais. E, para esses países, principalmente, mas também para países desenvolvidos, a raiva representa uma sobrecarga econômica, face aos onerosos gastos com tratamento pós-exposição, diagnóstico e levantamentos epidemiológicos, imunizações de animais domésticos e controle da população de animais silvestres (REZENDE et al., 1997; BELOTTO, 2000). Entretanto, a maior importância da doença é o seu impacto em saúde pública, decorrente dos óbitos humanos, e econômico, pela grande quantidade de óbitos em animais de produção (BELOTTO, 2001; RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; KNOBEL et al., 2005).

A falta de adaptação do VRab a seus hospedeiros vertebrados transforma a raiva em uma das doenças mais temidas que afetam a espécie humana por sua inexorável evolução letal. Por que o VRab, durante milhares de anos, desde as primeiras descrições da doença não foi capaz de se adaptar a seus hospedeiros naturais e, quais mecanismos íntimos que o VRab desencadeia para provocar a morte de pessoas e animais doentes, são perguntas que ainda não foram completamente esclarecidas (BELOTTO, 2000).

Estimativas conservadoras indicam que a cada 10 a 15 minutos uma pessoa morre de Raiva e, a cada hora, 1.000 pessoas recebem tratamento pós-exposição no mundo, com o número anual de mortes pela raiva situando-se entre 40.000 e 70.000 e, mais, cerca de 10 milhões de pessoas recebem tratamento pós-exposição a cada ano (OMS, 2005). O cão é a principal espécie transmissora da raiva ao homem e responsável pelas mordeduras, que resultam em tratamento pós-exposição, tanto nos países em desenvolvimento como nos países mais

desenvolvidos, sendo portanto o ciclo urbano o responsável pela ocorrência da maioria dos casos (BELOTTO, 2000; CORTEZ, 2006; KOTAIT et al., 2007; OPS, 2007).

Na América Latina a maioria das grandes cidades, estados ou províncias e, mesmo diversos países, conseguiram eliminar ou reduzir significativamente a incidência da raiva transmitida pelo cão (BELOTTO, 2000). A título de exemplo cite-se o caso no Brasil, que conseguiu reduzir o coeficiente de mortalidade por 100.000 habitantes de 0,143 em 1980 (REZENDE et al., 1997), para 0,002 em 2008, devido principalmente à redução da transmissão urbana da raiva (COVEV, 2009).

Apesar da raiva humana transmitida por cães estar reduzindo no decorrer dos anos, a ocorrência de casos de raiva humana transmitida por animais silvestres surge como um novo desafio para o Brasil (MS, 2009). De fato, no período compreendido entre os anos de 2004 e 2005, foram diagnosticados muitos casos de óbitos por raiva humana causados pela VAg3, própria de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, enquanto os casos ocorridos em anos anteriores foram causados pela VAg2, própria do cão, originária do ciclo urbano.

Por isso, o genótipo I do vírus rábico continua sendo objeto de vários estudos, com realização de pesquisas que resultaram na melhoria do entendimento científico sobre esse agente viral (BELOTTO, 2000; RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; WADA et al., 2004; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005; 2006; BARBOSA, 2007; BARBOSA et al., 2008). De fato, vários aspectos do ciclo biológico, modo de transmissão, caracterização molecular, epidemiologia, produção de vacinas, dentre outros tem sido amplamente descritos e revistos (BELOTTO, 2000; RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; BARBOSA et al., 2008).

A epidemiologia da raiva baseada em técnicas moleculares tem permitido uma abordagem mais ampla da caracterização viral, seu relacionamento com as espécies hospedeiras e sua distribuição geográfica (KISSI; TORDO; BOURHY, 1995; NADIN-DAVIS, 1998; BADRANE et al*.,* 2001; LACKAY; KUANG; FU, 2008). Com o advento da utilização dos AcM, a classificação antigênica do VRab pode ser estabelecida, visto que com o uso do painel de AcM pode-se definir as variantes virais associadas com os focos de raiva em todo o mundo, bem como as espécies que atuam como reservatórios do vírus nos diferentes ciclos (FAVORETTO et al., 2002). De fato, os ciclos de manutenção do VRab envolvem hospedeiros distintos que ocupam estratos definidos no ecossistema, e que estão relacionados à variantes antigênicas específicas (DIAZ et al., 1994; FAVORETTO et al., 2002).

Em 1996, o Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP) implantou a técnica IFI usando um painel reduzido de oito AcM (C1; C4; C9; C10; C12; C15; C18, e C19) contra a nucleoproteína viral, produzidos pelos CDC/Estados Unidos, e estabelecido pela Organização Panamericana da Saúde (OPAS), com o objetivo de estudar as cepas de VRab isoladas nas Américas (FAVORETTO et al., 2002); posteriormente essa técnica foi implantada no IEC em 2004, em decorrência da necessidade de descentralização dessa metodologia no Brasil. Isso resultou em um maior número de caracterização antigênica dos isolamentos virais da raiva de diversas regiões do país, havendo portanto, uma melhor compreensão da epidemiologia da raiva no país.

No Brasil, reconhecidamente circulavam apenas cinco variantes antigênicas (VAg) do genótipo I do VRab, quais sejam VAg2, VAg3, VAg4, VAg5 e VAg6 (FAVORETTO et al*.,* 2002; KOTAIT et al., 2007). Na espécie canina (*Canis*

familiaris) é comumente identificada a VAg2 (FAVORETTO et al*.,* 2002), porém no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul (estado de fronteira com a Bolívia e Paraguai) já foi diagnosticado um canino portador da VAg1 (MORI et al., 2006). Neste trabalho, observamos que até o momento em estados da região Amazônica circularam as variantes antigênicas VAg2, VAg3 e VAg4.

Já a distribuição da raiva animal é variável de acordo com o continente, país e dentro de um país, nas regiões tanto em termos geográficos quanto de espécies afetadas. Desse modo, a raiva canina é predominante na Ásia, África e América Latina e a raiva em animais silvestres, principalmente, carnívoros, apresentam maior prevalência em países da Europa e América do Norte. A raiva em quirópteros é registrada desde países desenvolvidos até os mais pobres, com crescente expansão inclusive para áreas urbanas; vem aumentando também a importância dos morcegos hematófagos como transmissores diretos de raiva ao homem (BELOTTO, 2000; SHOJI et al., 2006; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005; 2006; BARBOSA, 2007; BARBOSA et al., 2008; BRITO, 2008).

Campanhas eficientes de vacinação tem conseguido praticamente eliminar a presença do VRab em ambientes urbanos, já que evitam a manutenção da cadeia de transmissão; essas ações associadas com medidas complementares, tais como captura e eliminação de cães e gatos de rua e de animais abandonados reduziram drasticamente o número de casos urbanos de raiva transmitida por cães e gatos (GREENE, DREESEN, 1990; LACKAY; KUANG; FU, 2008). Com efeito, isto é o que vem sendo observado com o fortalecimento dos programas de controle da raiva em vários países (China, Tailândia, Sri- Lanka, Tunísia) e regiões, em que a vacinação maciça de cães e gatos, combinada com a melhoria da atenção às pessoas agredidas por animais (tratamento pós-exposição), tem possibilitado a

redução do número de casos humanos de raiva transmitida no ciclo urbano (BELOTTO, 2000). Os achados deste estudo, corroboram com essas informações, pois também observamos na Amazônia brasileira importante redução do número de casos de raiva humana e animal no ciclo urbano.

Em todo o continente americano observa-se a gradual redução de casos de raiva em carnívoros domésticos, que tradicionalmente sempre apresentaram contribuição expressiva no número de casos da doença nos países da América do Sul; no Brasil, em particular, essa redução também pode ser observada (PANAFTOSA, 2009). Neste estudo, mesmo representando uma amostragem de demanda passiva, foi observado que a região com maior número de casos no Brasil em carnívoros domésticos é a amazônica, tendo contribuído com quase metade dos casos nacionais de raiva no ano de 2007 (figura 11) (MS, 2008, 2009).

Porém, é importante ressaltar que, baseado no diagnóstico do IEC, o ciclo urbano da raiva vem sendo paulatinamente controlado, com a redução dos casos de raiva em carnívoros domésticos; de fato, com exceção do estado do Pará, os demais estados da região, não apresentaram mais casos positivos desde 2004. O estado do Pará, no entanto, apresentou grande redução na incidência de casos urbanos até o ano de 2005, tendo aumentado a ocorrência nos anos de 2006 e 2007, voltando a reduzir em 2008, e até julho de 2009, somente três casos de raiva em carnívoros domésticos foram diagnosticados (IEC, dados não publicados).

Dos casos confirmados em carnívoros domésticos no período de estudo, a grande maioria foi proveniente do interior dos estados, e a raiva em carnívoros domésticos procedentes das capitais não foi mais diagnosticada desde o ano de 2004 (BARBOSA et al., 2007). Essa situação certamente deve estar relacionada com as ações de vigilância mais ativas nas capitais a partir de

campanhas eficientes de vacinação dos animais domésticos (cães e gatos), e possivelmente também, ao fato da grande distância na Amazônia entre a sede dos municípios e suas comunidades, o que dificulta uma cobertura vacinal homogênea de canídeos e felídeos nos municípios do interior dos estados da região Amazônica.

Em estados como Acre, Pará e Rondônia observou-se um maior percentual de raiva felina, o que deve ser decorrente de uma deficiência no processo de vacinação dos mesmos, pois esses animais são de difícil contenção; esses dados reforçam a necessidade de um maior controle da doença nessa espécie animal como já relatado por outros autores (GREENE; DREESEN, 1990).

A recuperação viral por meio de re-isolamento a partir de amostras conservadas por longos períodos em baixas temperaturas (-70°C), na ausência de processo de liofilização dos isolados, é essencial para a realização de estudos retrospectivos. Porém, o tempo de conservação, associado a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, promovem uma perda significativa na viabilidade do vírus (LOPES, 2008), fato que foi observado neste estudo, onde 31,09% das cepas inoculadas para re-isolamento não foram recuperadas, resultado muito semelhante ao encontrado em estudo realizado por Brito (2008), no qual 35,2% das amostras não foram re-isoladas; esse fato pode dificultar futuros estudos que necessitem do re-isolamento viral, mas a alternativa de liofilizar as cepas de VRab isoladas provavelmente contornará esse problema.

No período do estudo, todas as amostras de humanos foram antigenicamente caracterizadas e cerca de 25% das amostras de animais positivas no IEC foram também submetidas à caracterização antigênica. Dentre estas, a grande maioria foi dos estados de Rondônia e Pará, que juntos somaram mais de 80% das cepas virais caracterizadas, das quais somente pouco mais de 6% não

foram passíveis de caracterização, por serem incompatíveis com o painel de AcM usado ou por terem reagido com todos os AcM.

Ressalta-se, porém, que a variante viral VAg3, vem sendo também identificada em cães no estado de São Paulo desde 1998 (TAKAOKA, 2000; CARRIERI, et al., 2000; KOTAIT et al., 2007), assim como em Santa Catarina (OPORTO, 2008, informação verbal[3]), Minas Gerais em 2007 (GAMA, 2008, informação verbal[4]), e felinos no Espírito Santo (BARBOSA, L. 2008, informação verbal[5]) e Maranhão (BRITO, 2008); a VAg4 também já foi diagnosticada em um canino do Rio Grande do Sul (CALDAS et al., 2007). Esses achados, portanto, diferem das amostras da Amazônia onde predominou a variante viral VAg2 em carnívoros domésticos, mostrando que na região Amazônica ainda não está havendo grande interferência do ciclo silvestre aéreo da raiva no ciclo urbano.

O ciclo rural da raiva pode ser pouco avaliado nesse estudo, devido a baixa demanda de amostras ao IEC, o que provavelmente se deve ao fato de no estado do Pará haver um laboratório vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MAPA), para o qual mais frequentemente são enviadas as amostras de herbívoros domésticos. No entanto no Brasil, é importante ressaltar, que os rebanhos de bovinos e equinos do país tem sido gravemente afetados por essa zoonose, o que tem resultado em aumento na investigação de casos suspeitos e na confirmação de casos de raiva (BRASIL, 2005b).

A resposta imunológica deficiente de animais (herbívoros domésticos) é uma consequência da negligência dos proprietários dos rebanhos quanto à forma

[3] Apresentação oral realizada por Jaime Salvatierra Oporto na Oficina de Monitoramento da rede de laboratórios de Diagnóstico de Raiva, realizada de 03 a 05/06/2008 em Brasília/DF.
[4] Apresentação oral realizada por Francisco Elias Nogueira Gama na Oficina de Monitoramento da rede de laboratórios de Diagnóstico de Raiva, realizada de 03 a 05/06/2008 em Brasília/DF.
[5] Apresentação oral realizada por, Luiz Carlos Tavares Barbosa na Oficina de Monitoramento da rede de laboratórios de Diagnóstico de Raiva, realizada de 03 a 05/06/2008 em Brasília/DF.

correta de vacinação (DANTAS JUNIOR, 2006). Isso resulta em graves perdas econômicas, como por exemplo, tem sido observado no Estado de Santa Catarina, onde o rebanho bovino tem tido uma perda de 30.000 animais/ano, causando um prejuízo anual de quase meio milhão de dólares (BORDIGNON et al., 2005).

A raiva em herbívoros domésticos é amplamente difundida no Brasil, sendo diagnosticada nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste (KIMURA, 2006) e Norte, nesta última, como documentado por este estudo, com mais de 32% dos animais do ciclo rural resultando positivos para VRab, predominando a positividade em bovídeos e equídeos. Cerca de 23% dessas amostras foram submetidas à caracterização antigênica e, somente em poucos casos não foi possível determinar a variante antigênica do isolado, sendo todos os demais antigenicamente caracterizados como VAg3, mostrando que no ciclo rural a principal variante antigênica circulante é a comumente encontrada em morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus.*

Essa variante, também tem sido amplamente encontrada em animais de produção (bovino, equino, suíno, caprino, etc.), em decorrência do morcego *Desmodus rotundus* apresentar um hábito alimentar eletivo, obtendo preferencialmente sangue desses animais (FAVORETTO et al*.,* 2002; TAKAOKA et al., 2003; KIMURA, 2006; KOTAIT et al., 2007).

A raiva silvestre vem surgindo nos últimos anos como um novo desafio para a vigilância desse agravo no Brasil, principalmente devido à transmissão por morcegos não hematófagos em áreas urbanas, morcegos hematófagos em áreas rurais e canídeos silvestres no Nordeste. Em 2008 vinte morcegos hematófagos, 108 morcegos não hematófagos, 26 canídeos silvestres e três primatas não humanos tiveram o diagnóstico laboratorial de raiva confirmado no Brasil (MS, 2009).

O primeiro caso de raiva em quiróptero diagnosticado na região amazônica, pelo IEC, foi documentado em 1998, a partir do encéfalo e glândulas salivares de um morcego da espécie *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) encontrado caído na sede do IEC em Belém (TRAVASSOS DA ROSA, 2009, informação verbal[6]), e somente a partir do ano de 2004 outras ocorrências em quirópteros foram registradas. Os quirópteros com diagnostico positivo no estado do Pará, no período do estudo, na maioria das vezes foi de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus,* os demais foram de morcegos insetívoros e frugívoros.

Em 2008, foi registrada a primeira ocorrência de caso de raiva em quiróptero na capital do estado do Amapá (Macapá), em morcego frugívoro da espécie *Artibeus planirostris*, tendo sido o isolado caracterizado como VAg3. Autores de vários estudos ressaltam que o diagnóstico de raiva em morcegos, reforça a importância da vigilância epidemiológica, em relação à raiva animal e, principalmente, do ciclo aéreo, com controle de quirópteros, na tentativa de diminuir a circulação do VRab e a possibilidade da ocorrência de casos de raiva humana (LANGONI et al., 2005; 2008; SOUZA et al., 2005).

Alguns estudos tem mostrado que a variante VAg5, originária da Venezuela também de *Desmodus rotundus*, vem sendo diagnosticada no Brasil em raposa (*Cerdociyon thous*), morcegos e gatos no estado de São Paulo (FAVORETTO et al., 2002), assim como a VAg6 é originária de *Lasiurus cinereus,* a VAg4 tem sido isolada de morcegos *Tadarida brasiliensis,* e ambas são espécies de morcegos insetívoros (FAVORETTO et al*.,* 2002; KOTAIT et al., 2007); a VAg4, contudo já foi diagnosticada em cão no Rio Grande do Sul (CALDAS et al., 2007).

[6] Informação fornecida por Drª. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa, responsável pelo Laboratório de Diagnóstico de Raiva do IEC.

Neste estudo, entre os demais animais silvestres analisados, somente uma irara, *Eira barbara* (Linnaeus, 1758), procedente do estado do Amazonas foi positiva para raiva nas técnicas de IFD e PB, tendo sido a cepa isolada caracterizada antigenicamente como VAg4. Como é sabido, o morcego *Tadarida brasiliensis* não circula na região Amazônica (FABIAN; GREGORIN, 2007), o que obriga a levantar a hipótese da circulação desta variante em outra(s) espécie(s) animal(is), muito provavelmente outra espécie de morcego, que mais facilmente estaria fazendo a disseminação da referida variante na região Amazônica. Outro fator importante a ser lembrado é o caráter subjetivo da prova de IFI, com o painel reduzido de AcM, visto que pequenos erros de interpretação de uma reação positiva ou negativa com os AcM, podem proporcionar um padrão antigênico diferente, o que poderia conduzir à identificação incorreta de um reservatório ou de um novo padrão de reação (BRASIL, 2008).

Sabe-se que, no Chile, desde 1990 na maioria dos isolamentos do VRab a partir de amostras de animais domésticos tem sido identificada a VAg4, inclusive há relatos da ocorrência de caso humano e em outros gêneros de morcegos, como *Lasiurus, Histiotus,* e da espécie *Myotis chiloensis* (BREVIS, 2001a, 2001b; CORTÉS, 2001); o mesmo padrão de transmissão da raiva foi observado na Argentina (VULKELIC, 2001).

O homem e os felinos domésticos são considerados hospedeiros acidentais do VRab, podendo ser infectados pelas variantes VAg2 e VAg3, sendo que cães e morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são os principais transmissores dessas variantes, respectivamente (KOBAYASHI et al*.,* 2006). Estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2008) com amostras de VRab isoladas no estado do Pará comprovou a circulação da variante VAg2 entre humanos, caninos e

felinos domésticos, e da variante VAg3 nas espécies humana, felina, bovina, equina e suína. Por outro lado, os resultados deste estudo comprovam a circulação exclusiva da VAg2 em cães da região amazônica, sendo que em felinos houve circulação da VAg3, em uma amostra oriunda do município de Augusto Corrêa (Pará), mas deve-se ressaltar que esse fato coincidiu temporalmente com a ocorrência de um surto de raiva humana transmitida por quirópteros hematófagos no ano de 2005 (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005; 2006). Das cepas virais obtidas a partir de amostras isoladas de humanos, dezenove (doze no IEC e sete no IP/SP) foram antigenicamente caracterizadas como VAg3. É interessante observar que todas as cepas virais isoladas de humanos foram VAg3 a partir do ano de 2004, e foram isoladas no decorrer dos surtos de raiva humana transmitida por morcegos (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005; 2006), as demais cepas virais anteriores a 2004 isoladas de humanos na Amazônia brasileira, foram caracterizadas antigenicamente no Instituto Pasteur de São Paulo, e todas identificadas como VAg2.

De acordo com dados coletados pela OPAS, estudo realizado por Belotto (2003) faz referência de que entre os anos de 1995 e 2000, os morcegos hematófagos ocuparam o segundo lugar na transmissão da raiva humana na América Latina, até então ocupado pelos felinos, sendo superados apenas pelos cães e, ainda esse autor mostrou que, nesse período, foram notificados 105 casos de raiva humana transmitida por *Desmodus rotundus* nas Américas, representando 20% do total de casos humanos notificados na região das Américas.

A emergência dos casos de raiva transmitida por morcegos deve-se em parte à melhoria das ações dos programas de controle da raiva de animais domésticos, o que resultou na redução progressiva do número de casos positivos,

principalmente de cães. Em decorrência desse controle do ciclo urbano, o morcego tem emergido como o mais importante transmissor da raiva reconhecido atualmente na América Latina, como tem sido descrito para os países que controlam a raiva transmitida pelos animais domésticos, assumindo portanto, o ciclo aéreo, grande importância para a transmissão do VRab (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; TOPOROVSKI et al*.,* 2005); porém, a presença do VRab em quirópteros de áreas urbanas, reforça a importância da manutenção ou mesmo ampliação das campanhas de vacinação anti-rábica em cães e gatos, nas áreas urbana e rural (LANGONI et al., 2007), nesta última a vacinação dos rebanhos de criação de suínos, bovinos, equídeos, caprinos, etc. é também muito importante (BRITO, 2008).

Com base nesse levantamento foi demonstrado que no Brasil, e em particular, no estado do Pará, houve importante diminuição do número de casos de raiva humana associada aos carnívoros domésticos e, aumento considerável de casos com transmissão por morcegos. Tal situação decorreu dos surtos notificados nos municípios paraenses de Viseu e Portel em 2004 (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006), e Augusto Correa em 2005 (BARBOSA et al., 2008), bem como nos municípios maranhenses de Godofredo Viana, Carutapera, Cândido Mendes e Turiaçu (BRITO, 2008), o que serviu para demonstrar a grande importância dos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* na epidemiologia da raiva.

Em termos de sintomatologia, os casos relacionados com morcegos foram de raiva paralítica, semelhante ao que ocorreu em Trinidad & Tobago nas décadas de 1920 e 1930, indicando que a variante do VRab específica de morcegos seja responsável por sintomatologia de raiva paralítica (JACKSON, WUNNER, 2007), o que já fora observado em animais, em que os animais de produção normalmente acometidos pela VAg3, desenvolvem a raiva paralítica, enquanto os

canídeos, normalmente infectados pela VAg2, evoluem para o quadro de raiva furiosa (CORRÊA, CORRÊA, 1992).

No Brasil, com base no estudo das caracterizações antigênicas usando anticorpos monoclonais (painel dos CDC) têm sido sugeridas possíveis novas variantes do VRab. De fato, uma nova variante foi identificada para uma amostra de sagui *Callithrix jacchus* isolada no estado do Ceará (MORAIS et al., 2000; FAVORETTO et al., 2001; 2002); outras cinco possíveis novas variantes circulantes foram isoladas em amostras procedentes de morcegos não hematófagos dos gêneros *Histiotus, Lasiurus, Myotis, Nyctinomops, Eptesicus* e *Eumops*, visto que resultaram em perfis de leitura diferentes dos estabelecidos pelo painel dos CDC (FAVORETTO et al., 2002); e, mais recentemente, uma outra provável nova variante foi descrita a partir de isolado do VRab de morcego não hematófago da espécie *Uroderma bilobatum* na Ilha de Marajó no estado do Pará (BARBOSA, 2007; BARBOSA et al., 2007).

Neste estudo, ficou evidente que, na Amazônia brasileira, ocorreu a circulação do vírus rábico em todos os seus quatro ciclos, mantendo-se ativo até a presente data o ciclo urbano, porém o número de isolamentos de VRab de animais de produção e animais silvestres, excetuando o morcego, foi muito baixo. Mas, é possível deduzir que será necessário um maior número de amostras de animais silvestres para uma melhor avaliação, principalmente em regiões onde estão ocorrendo casos de raiva animal e/ou humana, visto que animais silvestres podem ser importantes reservatórios do vírus (ACHA; SZYFRES, 1986; FERNANDES, 2001; FAVORETTO et al., 2001); finalmente, nos casos de raiva canina ocorridos no município de Marabá (PA) sugere-se um estudo genético a fim de melhor avaliar a caracterização de VRab circulante.

A caracterização molecular deve ser realizada em conjunto com uma análise geográfica da região onde o vírus foi isolado, pois, a emergência de novas variantes pode ser influenciada simultaneamente por fatores genéticos e ecológicos (OMS, 2004). Geneticamente, observou-se o agrupamento das cepas do VRab associados às variantes antigênicas. Assim como observado em outros trabalhos (WARNE et al., 1999; NADIN-DAVIS et al., 2001; SHOJI et al.; 2004; 2006; KOBAYASHI et al.; 2005; 2006; 2007; NADIN-DAVIS; LOZA-RUBIO, 2006; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006; CARNIELI JR. et al, 2008; DELMAS et al., 2008), forma reconhecidos dois grupos principais de VRab, os grupos de carnívoros e de quirópteros.

Este estudo, realizado com amostras isoladas nos estados da Amazônia brasileira corrobora com os dados da literatura, verificando a circulação das variantes VAg2 e VAg3 do VRab (BELOTTO, 2001; FAVORETTO et al., 2002; RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). Como comprovado por Barbosa (2007), em estudo realizado no estado do Pará, há independência entre os ciclos de manutenção das variantes em questão, pois apresentam transmissores distintos.

Com relação ao estudo genético, observou-se um indicativo da circulação na Amazônia das variantes VAg4 e "*Eptesicus*" em ambiente silvestre. É interessante notar a inserção de cepas de *Callithrix* e da Irara (*Eira barbara*) no grupo de morcegos não hematófagos, o que provavelmente se deve à transmissão das referidas variantes ocorrerem a partir de morcegos não hematófagos. Note-se ainda que o VRab da Irara apesar de ser compatível com VAg4 pelo painel de AcM, geneticamente mostrou-se diferente das cepas VAg4 circulantes no Chile (GenBank: AF70450) e EUA (GenBank: AF351849; FJ228486), mas diferenças como essa também foram observadas em estudo realizado por Yung, Favi e Fernández (2002),

no qual, cepas VAg4 circulantes no Brasil, Chile, América do Norte (EUA e Canadá) foram geneticamente diferentes, agrupando-se em diferentes clados pelo método de NJ, que, assim como o método da MV, é um método filogenético de anáise de distância (SCHNEIDER, 2007). Porém não foi possível comparar a sequência da cepa obtida neste estudo com outras circulantes no Brasil, devido à indisponibilidade de artigos nacionais com estudo genético acerca da VAg4, sendo, portanto, sugerido o sequenciamento completo do genoma dessa cepa do VRab, afim de esclarecer melhor sua origem genética.

Observou-se também a inserção do isolado Quir 29.526 proveniente de morcego da espécie *Eptesicus brasiliensis*, procedente do município de Senador José Porfírio/PA, no grupo de cepas associadas às variantes de morcegos do gênero *Eptesicus* circulantes no Brasil (GenBank: AB201811; AB201807; AB201809), como descritos por Kobayashi e colaboradores (2007); ressalte-se que o perfil de leitura dessa amostra no painel de AcM mostrou-se semelhante ao descrito por Favoretto e colaboradores (2002), diferindo apenas nos AcM C1 e C19, nos quais esses autores relatam a ausência de reação, porém essa amostra apresentou reação fraca (uma cruz) para os referidos AcM.

No caso das amostras caracterizadas antigenicamente como NC (Bov 25.480; Bov 26.740; Bov 26.742; Quir 27.433; Quir 29.526; Cao 31.739; e Bov 32.965) e VLab (Hum 9.776; Cao 18.324; Cao 27.229; Cao 27.235; e Quir 30.403) que se enquadraram geneticamente como VAg2 e VAg3, a explicação mais provável é que podem ter ocorrido substituições nucleotídicas pontuais em alguns epítopos relacionados aos AcM utilizados.

Com base neste estudo foi possível observar a circulação de VAg3 em carnívoros domésticos nos municípios de Pimenta Bueno/RO (Cao 19.891) e

Tucuruí/PA (Cao 31.739), registrando ainda que em Tucuruí/PA somente este diagnóstico de raiva animal foi registrado no município no ano de 2008, não havendo outro caso em animais no período do estudo (janeiro de 2000 a julho de 2009) (SESPA, 2009; dados não publicados). Fica, portanto, a evidência da circulação de VAg3 em carnívoros domésticos nos estados do Pará e Rondônia, e que requer uma investigação mais robusta para entender os mecanismos de transmissão da VAg3 nessas áreas.

Travassos da Rosa e colaboradores (2006), descreveram previamente a distinção das cepas VAg3 de Portel com relação a outras cepas VAg3 do restante do país, bem como a cepa VAg3 de Viseu; este trabalho também identificou diferenças genéticas significativas entre as amostras de Portel com outras amostras VAg3 do estado do Pará, e sua associação com a amostra proveniente do município de Breves (Bov 19.671), na Ilha do Marajó, o que sugere a circulação de uma linhagem distinta de VAg3 do VRab na mesoregião do Marajó, definindo-a como uma região singular para a manutenção do ciclo silvestre aéreo do VRab como observado anteriormente (BARBOSA, 2007).

A emergência dos casos de raiva transmitida por morcegos, pode ser decorrente de diversos fatores, tais como: melhoria das ações dos programas de controle da raiva de animais domésticos, uso de novas ferramentas para o diagnóstico, alterações ambientais devidas às ações antrópicas, que interferem nos *habitats* dos morcegos, resultando em contato mais frequente com animais domésticos e seres humanos (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDIA, 2002; ALMEIDA et al., 2005; TOPOROVSKI et al*.,* 2005), devido aos hábitos sinantrópicos dos morcegos que alcançaram áreas urbanas ou de transição (KOTAIT et al., 2007).

A raiva em morcegos hematófagos representa uma ameaça à saúde pública, porém, várias outras espécies de morcegos, principalmente os não hematófagos (insetívoros e frugívoros), podem estar desempenhando um papel importante como reservatórios de VRab permanecendo até imperceptíveis ou silenciosos (VELASCO-VILLA et al., 2006). À exemplo do que já foi relatado no Chile, onde, desde a década de 1980 os morcegos tem se mantido como os mais importantes reservatórios silvestres e potenciais transmissores de raiva naquele país (DE MATTOS et al., 2000), é possível que na Amazônia venha ocorrer o mesmo.

As cepas de carnívoros domésticos e silvestres agruparam-se em subclados distintos, como já observado em estudos realizados por Carnieli e colaboradores (2008). Esses autores sugeriram que no Brasil, por causa do cão e populações de *Cerdocyon thous* constituírem subpopulações interconectadas que funcionam como uma unidade demográfica, a persistência da raiva é facilitada (BINGHAM, 2005). Como observado neste estudo e demonstrado por outros, o ciclo da raiva na região não foi interrompido pela imunização em massa de animais domésticos, e os casos de raiva em cães e canídeos silvestres são constantemente relatados; a longa relação temporal que existe entre subpopulações de VRab que circulam nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, se refletiu na formação dos subgrupos do cão e canídeos silvestres que foram também divididos por grupos regionais (CARNIELI et al., 2008); essa organização espacial das linhagens de VRab pode ser explicada pela evolução neutra conjugada com a dispersão e mistura de linhagens do VRAb, assim como, os agrupamentos dessas sequências indicam subdivisões ecológicas da população de vírus (REAL et al., 2005)

A causa mais comum de emergência da Raiva tem sido surtos da doença em canídeos silvestres em todo o mundo (OMS, 2004); resultados de

estudos no Nordeste mostram que a raiva em cães, está associada com a raiva na raposa *Cerdocyon thous*, que é a principal espécie de carnívoro silvestre envolvida na epidemiologia da raiva na região Nordeste do Brasil. As linhagens de VRab são características em ambas as espécies e se sobrepõem espacialmente, mas estão separadas, provavelmente como resultado das diferentes formas dessas espécies explorarem nichos ecológicos. Essa constatação significa que a população de *Cerdocyon thous* pode ser caracterizada como a raiva biótipo regional de espécies entre os carnívoros terrestres no Nordeste do Brasil. Carnieli e colaboradores (2008), observaram ainda que a subpopulação do VRab de *Cerdocyon thous* apresentou maior diversidade genética do que a subpopulação do vírus de cães, sugerindo que a estirpe selvagem tem se expandido geograficamente. Além de ser um importante problema de saúde púbica, a raiva canina é uma ameaça para as espécies selvagens.

Com efeito, todas as amostras de VAg2 do estado do Pará estudadas, são estritamente relacionadas entre si e com amostras VAg2 da região Nordeste (GenBank: EF152239), o que provavelmente, se deve, segundo Barbosa (2007), à proximidade geográfica do estado do Pará com o estado nordestino do Maranhão e o intenso fluxo de imigrantes e seus animais domésticos entre as duas regiões, principalmente no sentido do Nordeste para o Norte.

Finalmente, é importante assinalar que os dados da epidemiologia do VRab na Amazônia brasileira mostraram o aumento da transmissão de casos relacionados a morcegos em detrimento dos casos relacionados a cães, e que os estudos antigênicos e a análise filogenética mostraram uma grande prevalência nas amostras analisadas relacionadas às VAg2 e VAg3, e que, em geral, os resultados da análise antigênica corrobora e se correlaciona aos obtidos no estudo genético.

Comparando-se os dados obtidos em ambas as análises, observa-se que eles corroboram com o perfil epidemiológico e molecular atual demonstrado para o VRab, onde o morcego emerge como o grande transmissor de raiva nas Américas. Também, o relato de morcego cuja variante foi compatível com a de "*Eptesicus*", e da irara (*Eira barbara*), cujo perfil antigênico foi compatível com VAg4 e confirmado no estudo molecular. O grande desafio agora da vigilância epidemiológica e dos programas de controle da Raiva é, portanto, controlar a transmissão do VRab por esses hospedeiros.

7 CONCLUSÕES

O estudo desenvolvido para análise epidemiológica do VRab circulante na Amazônia brasileira no período de janeiro de 2000 a julho de 2009, permitiu as seguintes conclusões:

1. Houve diminuição significativa na transmissão do ciclo urbano da raiva na região Amazônica, com redução na transmissão de raiva cão-homem aumento, porém da transmissão morcego-homem;
2. Observou-se a ocorrência dos ciclos rural e silvestre do VRab em estados da região Amazônica;
3. A circulação da VAg2 se mantém predominante em relação a VAg3 em infecções de caninos e felinos domésticos,;
4. Verificou-se a maior ocorrência da VAg2 no interior do estado do Pará e nas capitais dos estados do Acre (Rio Branco) e Rondônia (Porto Velho);
5. A detecção da VAg4, originalmente isolada em morcego *Tadarida brasiliensis*, na espécie de carnívoro silvestre *Eira barbara* (Linnaeus 1758) no estado do Amazonas, demonstra a circulação desta variante do VRab;
6. A detecção da variante *"Eptesicus*" em quiróptero da espécie *Eptesicus brasiliensis*, demonstra, como descrito em outras regiões brasileiras, que há circulação dessa nova variante de morcegos insetívoros na região Amazônica;
7. A análise filogenética do clado VAg2 se encontra dividido em dois subclados, um de cão doméstico e outro da raposa *Cerdocyon thous*;
8. Que o grupo de morcegos apresenta maior diversidade genética em relação aos carnívoros;

9. Ocorreu a identificação da variante VAg3 em morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e de seis outras variantes VAg4, VAg6, "*Eptesicus*", "*Nyctinomops*", "*Molossus*" e "*Callithrix*" em morcegos não hematófagos;
10. Que a variante *Callithrix*, embora isolada de primatas não humanos é geneticamente relacionada aos morcegos não hematófagos, sugerindo que esses são responsáveis pela infecção dos calitricídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Immunity to microbies. In:_____. **Cellular and molecular immunology**. 4.ed. Estados Unidos da América: Saunders Company, 2000. cap 15, seção V, p. 343-362.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermidades transmissibles comunes al Hombre y a los Animales**. 2ª ed.Washington, E.U.A.: Organizacion Panamericana de la Salud, 1984. p.174-185.

ALMEIDA, M. F.; FAVORETTO, S. R.; AMATUZZI, E.; MARTORELLI, L. F. A.; TREZZA NETO, J.; CAMPOS, A. C. A.; OZAHATA, C. H.; SILVA, A. L. C.; SODRÉ, M.; DURIGON, E. L. Rabies virus isolated from bat colony of insectivorous bats, *Eptesicus furinalis*–Virus characterization and epidemiological study. **Virus. Reviews & Research.** XVI National Meeting of Virology, 10 (Suppl 1):113, 2005.

ARAÚJO, D. B.; LANGONI, H.; ALMEIDA, M.F.; MEGID, J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples**. BMC** Research Notes, 1:17, 2008.

AYRES, M., AYRES, J.R.M., AYRES, D.L, SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0-Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: sociedade civil mamirauá; Brasília CNPq, 2007. 290p.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, O.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology.** v. 75, n. 7, p. 3268 - 3276, 2001.

BARBOSA, T. F. S., MEDEIROS, D. B. A., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., CASSEB, L. M. N., MEDEIROS, R., PEREIRA, A. S., VALLINOTO, A. C. R., BEGOT, A. L., LIMA, J. S., VASCONCELOS, P. F. C., NUNES, M. R. T. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. **Virology**, **370(2)**:228-36, 2008

BARBOSA, T.F.S. Caracterização molecular de cepas de vírus da raiva isoladas no estado do Pará. 2007, 109 p. Dissertação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Programa de Pós-graduação em biologia de agentes infecciosos e parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Belém. 2007

BARBOSA, T.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; MEDEIROS, D.B.A.; CASSEB, L.M.N.; PEREIRA, A.S.; BEGOT, A.L.; LIMA, R.J.S.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C.. Epidemiologia molecular do vírus da raiva no estado do Pará no período de 2000 a 2005: emergência e transmissão por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*). **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, 15 (3): 329 - 348, 2007

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**. 2007. 35(2): 125-144.

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. **Programa e Resumos...** São Paulo: Instituto Pasteur, p. 24-25. 2001. Disponível em: <http://www.pateur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2001.pdf>, Acesso em 20 de janeiro de 2009.

BELOTTO, A.J. Situação da raiva no mundo e perspectivas de eliminação da raiva transmitida pelo cão na América latina. Livro de resumos do Seminário Internacional de Raiva. São Paulo – SP, 22 a 24 de agosto de 2000. Disponível em <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informações/anais/seminario_internacional/default.htm>, Acesso em 20 de janeiro de 2009.

BELOTTO, A. J. Raiva transmitida por morcegos nas Américas. **Boletim do Instituto Pasteur,** 7: 2, 2003.

BINGHAM, J. Canine rabies ecology in southern Africa. **Emerging Infectious Disease**. 11 (9), 1337–1342, 2005.

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A.; HADOSTITS, O. M. Raiva. In: _____. **Clínica veterinária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 667-671.

BONEVA, R.S; FOLKS, T.M.; CHAPMAN, L.E. Infectious Disease issues in xenotransplantation. **Clinical Microbiology Reviews**, Jan. 2001, Vol. 14, n°01 p.1-14.

BORDIGNON, J.; BRASIL DOS ANJOS, G.; BUENO, C. R.; OPORTO, J. S.; DÁVILA, A. M. R.; GRISARD, E. C.; ZANETTI,C. R. Detection and characterization of rabies virus in southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Archives of Virology**. v. 150, n 4, p. 695-708, 2005.

BOTVINKIN, A. D.; POLESCHUK, E. M.; KUZMIN, I. V.; BORISOVA, T. I.; GAZARYAN, S. V.; YAGER, P.; RUPPRECHT, C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p.1623-1625, 2003.

BOURHY, H.; KISSI, B.; LAFON, M.; SACRAMENTO, D.; TORDO, N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, 30 (9): 2419-2426, 1992

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da Raiva dos Herbívoros – Manual Técnico 2005**. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2005b. 104 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão sobre raiva dos herbívoros.** Brasília, 2005c. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 12 mar. 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Raiva. In: _____. **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica**. 4.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde – Centro Nacional de Epidemiologia, 1998. cap.5.26, p.1-15

BRASIL, Ministério da Saúde. Raiva. In: _____. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005a. p.603-632.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Série A. Normas e manuais técnicos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008, 108p.

BREVIS, C.P. Rabia em animales domésticos urbanos transmitida por *Tadarida brasiliensis* en Chile. In: Seminário internacional morcegos como transmissores da raiva. Programa de Resumos, 03 a 06/12/2001. Livro de Resumos, p.49-50, 2001a Disponível em <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2001.pdf>, acesso em 02 de janeiro de 2009.

BREVIS, C.P. Rabia humana provocada por *Tadarida brasiliensis* en Chile. In: Seminário internacional morcegos como transmissores da raiva. Programa de Resumos, 03 a 06/12/2001. Livro de Resumos, p.62-63, 2001b. Disponível em <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2001.pdf>, acesso em 02 de janeiro de 2009.

BRITO, C.J.C.Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos e de seres humanos no estado do Maranhão. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo/SP, 2008. 103 p.

BURTON, E. C.; BURNS, D. K.; OPATOWSKY, M. J.; EL-FEKY, W. H.; FISCHBACH, B.; MELTON, L.; SANCHEZ, E.; RANDALL, H.; WATKINS, D. L.; CHANG, J.; KLINTMALM, G. Rabies Encephalomyelitis. Clinical, Neuroradiological, and Pathological Findings in 4 Transplant Recipients. **Archives of Neurologicals**, **62**: 873-882, 2005.

CALDAS, E. PREDEBON, J.; DIEDRICH, G.; FARINATTI, A.; BARRETO, N.; CAMPIELO, P.; KESSLER, S.; MAGOGA, E.; IRIGARAY, G.; CARRIERI, M.L.; BATISTA, H.; ROSA, J.; FERREIRA, J.C.; ROEHE, P. Descrição do achado de raiva canina por vírus rábico de origem em morcego não hematófago *Tadarida brrasiliensis*. **Boletim epidemiológico**. Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS)/RS. v. 9, n. 2, junho 2007.

CARNIELI JR, P.; FAHL W. O.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C.I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R.S.; MORATO, R.G.; SPINDOLA, R.O.; MACHADO, L.M.; UNGAR DE SA, J.E.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research.** 131 (1), 33-46, 2008.

CARRIERI, M.L.; FAVORETTO, S.R.L.; CARNIELI, P.; QUEIROZ, L.H.; SOUZA, M. C. A. M.; PANACHÃO, M.R.I.; TAKAOKA, N.Y.; HARMANI, N.M.S.; KOTAIT, I. *Desmodus rotundus* como transmissor da raiva canina e felina, no estado de São Paulo, 1998-2000. Livro de resumos do Seminário Internacional de Raiva. São Paulo – SP, 22 a 24 de agosto de 2000. Disponível em <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informações/anais/seminário_internacional/default.htm>, Acesso em 20 de janeiro de 2009.

CARRIERI, M.L.; MATTOS, C.A.; CARNIELI Jr, P.; MATTOS, C.; FAVORETTO, S.R.; KOTAIT, I. Canine and feline rabies transmitted by variant 3 - *Desmodus rotundus* – in the state of São Paulo, Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE MORCEGOS COMO TRANSMISSORES DE RAIVA, 2001, São Paulo. Programa e Resumos... São Paulo: Instituto Pasteur, 2001, p.51-52.

CASSEB, L. M. N.; BARBOSA, T. F. S.; PEREIRA, A. S.; PEIXOTO, H. C.; BEGOT, A. L.; LIMA, R. J. S.; SOUZA, M. M.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Antigenic characterization of rabid animal isolates, Northern Brazil, 2005/2006. In: XVII Rabies in the Americas, 2006, Brasília. Proceedings XVII Rabies in the Americas, 2006, p. 78.

CASTILHO, J.G.; CARNIELI, P. JR.; OLIVEIRA, R.N.; MACEDO, C.I.; DURYMANOVA, E.; FAHL, W.O.; MANTILLA, A.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Human rabies transmitted by vampire bats: antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Ecuador and Brazil, não publicado.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.M. Raiva. In: _____. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. cap. 68, p. 609-628.

CORTÉS, M.F. Caracterización antigênica y genética de cepas aisladas de murciélagos en Chile. In: Seminário internacional morcegos como transmissores da

raiva. Programa de Resumos, 03 a 06/12/2001. Livro de Resumos, p.44-45, 2001. Disponível em <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2001.pdf>, acesso em 02 de janeiro de 2009.

CORTEZ, T.L. Raiva urbana: epidemiologia e controle. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006, 61p.

COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Programa Nacional de Vigilância, Controle e Profilaxia da Raiva. 2009. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva_apresentacao05062009.pdf>, Acesso em 20 de agosto de 2009.

COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS Tratamento de caso de raiva humana em Floresta – Pernambuco. **NOTA TÉCNICA.** 11 de novembro de 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_raiva_humana_11_08.pdf>. Acesso em 05/01/2009.

DANTAS JÚNIOR, J.V. Análise molecular de vírus da raiva circulante no estado do Rio de Janeiro, entre 1999 e 2004. Tese (Doutorado em Ciências) Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ, 2006, 88 p.

DE LUCA, R. R., ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L..; MERUSSE, J.L.B.; NEVES, S.P. Manual para Técnicos em Bioterismo. 2ª ed. COBEA , São Paulo: Winner Graph. 1996.

DE MATTOS, C.; FAVI, M.; YUNG, V.; PAVLETIC, C.; DE MATTOS, C. C. Bat Rabies in urban centers in Chile. **Journal of Wildlife Diseases,** 36**:** 231-240, 2000.

DELMAS, O.; HOLMES, E.C.; TALBI, C.; LARROUS, F.; DACHEUX, L.; BOUCHIER, C.; BOURHY, H. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. **PLoS ONE** 3 (4), E2057, 2008.

DIAZ, A. M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic analysis of rabiesvírus isolates from Latin America and the Caribean. **Journal of Veterinary Medical Biological.** v. 41, p. 153 - 160, 1994.

DINIZ, J.A.P.; NUNES, M.R.T.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; CRUZ, A.C.R.; SOUZA, W.; MEDEIROS, D.B.A.; CHIANG, J.O.; VASCONCELOS, P.F.C. Characterization of two new rhabdoviruses isolated from midges (*Culicoides* SPP) in the Brazilian Amazon: proposed members of a new genus, Bracorhabdovirus. **Archives of Virology.** 151: 2519–2527, 2006;

DINIZ, J.A.P.; SANTOS, Z.A.; BRAGA, M.A.G; DIAS, A.L.B.; SILVA, D.E.A.; MEDEIROS, D.B.A.; BARROS, V.L.R.S.; CHIANG, J.O.; ZOGHBI, K.E.F.; QUARESMA, J.A.S.; TAKIYA, C.M.; MOURA NETO, V.; SOUZA, W.; VASCONCELOS, P.F.C. Early and Late Pathogenic Events of Newborn Mice Encephalitis Experimentally Induced by Itacaiunas and Curiono´ polis Bracorhabdoviruses Infection. **Plos One.** March 2008, Volume 3, Issue 3, e1733, p. 1-12.

FABIAN, M. E.; GREGORIN, R. Família Molossidae. In: DOS REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; DE LIMA, I.P. (editores). **Morcegos do Brasil.** Londrina: Nélio R. dos Reis, 2007, cap. 13, p. 149-166.

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

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ARAÚJO, F. A. A.; DE MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (*Calithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Disease.** v. 7, p. 1062 - 1065, 2001.

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

FERNANDES, C.G. Raiva. In: RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.del C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos.** 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 2v. v. 1, p. 149-162.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. In: _____. **Sorologia**: importância e parâmetros. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 1996, p.1-28.

GOTO, H.; MINAMOTO, N.; ITO, H.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; KINJO, T.; KAWAI, A. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. **Journal of General Virology**, v.81, n.1, p.119-27, 2000

GREENE, Graig E.; DREESEN, David W. Rabies. In: GREENE, Graig E. **Infections diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1990. cap.31, p.365-383.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, 52 (5): 696-704, 2003.

HALL, T.A. **BioEdit**. Departamento de Micorbiologia, Estado da Carolina do Norte, Universidade, Raleigh, NC. 2001.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C.; FISHER, B.D. Diagnóstico Microbiológico. In: _____. **Microbiologia ilustrada**. 2 ed. Porto Aalegre; Artmed, 2008, p.19-32.

HEALTH PROTECTION AGENCY (HPA). **Rabies in patients who received organ transplants in Germany**. The Communicable Disease Report Weekly, Current Issue: news stories. German, 2005. Disponível em: <http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2005/cdr0905.pdf>. Acesso em 17/02/2006.

HEATON, P. R.; JOHNSTONE, P.; MCELHINNEY, L.M.; COWLEY, R.; O'SULLIVAN, E.; WHITBY, J.E.. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Clinical Microbiology.** Vol. 35, n. 11, nov. 1997, p. 2762–2766

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBAYES: Bayesian inference of phylogeny and its im-pact on evolutionary biology. **Science**, 14 (294):2310-2314, 2001.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Amazônia legal. [pdf 2.8MB] Mapa Político-Administrativo. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/pol.php> acesso em 20 de junho de 2009.

ICTV - International Committee on the Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy:** classification and nomenclature of viruses. 8 ed. FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (org.) San Diego: Academic Press, 2005. 1259 p.

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

JACKSON, A.C. Update on rabies diagnosis and treatmente. **Currente Infectious Diseases Reports.** 2009 Jul;11(4):296-301.

JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. Future developments and challenges. In: _____. editors. **Rabies**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007, p. 635-43.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Patology of Domestic Animals.** 4.ed. São Diego: Academic Press, 1993, 3v. v.3, 653 p.

KIMURA, L.M.S. Epidemiologia molecular de vírus da raiva em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil. 2006, 79 p. Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2006.

KISSI, B.; TORDO, N.; BOURHY, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. **Virology**. v. 209, n. 2, p. 526 - 537, 1995.

KNOBEL, K.L.; CLEAVELAND, S.; COLEMAN, P.G.; FÈVRE, E.M.; MELTZER, M.I.; MIRANDA, M.E.G.; SHAW, A.; ZINSSTAG, J.; MESLIN, R.X. Re-evaluating the

burden of rabies in Africa and Asia. **Bulletin of the World Health Organization**. Maio, 2005, 83 (5), p. 360-68

KOBAYASHI, Y.; OGAWA, A.; SATO, G.; SATO, T.; ITOU, T.; SAMARA. S. I.; CARVALHO, A. A.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science.** v. 68, n. 10, p. 1097 - 1100. 2006.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; KATO, M.; ITOU, T.; CUNHA, E.M.; SILVA, M.V.; MOTA, C.S.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. **Archives of Virology.** 152 (11), 1995-2004, 2007.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E.M.S.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science** 67 (7), 647-652, 2005.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. Diagnóstico das infecções causadas por virus, *Chlamydia*, *Rickettisia* e microrganismos relacionados. In:_____. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. cap.21, p.1187-1302.

KOOGAN, A.; HOUAISS, A. **Enciclopédia e dicionário ilustrado.** 4 ed. Rio de Janeiro: Edições Delta, 1808 p. 2000.

KOPROWSKY, H. The mouse inoculation test. In: **Laboratories Techniques in Rabies.** MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. (eds). Geneva, World Health Organization, 1996, p. 80-87.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; CARNIELI Jr, P.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C.I.; FERREIRA, C.C.S.; ACHKAR, S.M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA).** Volume 4, Número 40, Abril, 2007. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40_raiva.htm> Acesso em 10 de janeiro de 2009

KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; CASTILHO, J.G. Re-emergence of Rabies in Non-human Primates in Brazil. não publicado.

KUZMIN, I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T.; SMITH, J. S.; HANLON, C. A. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. **Virus Research**, v. 97, n. 2, p. 65-79, 2003.

KUZMIN, I.V.; HUGHES, G.J.; BOTVINKIN, A.D., ORCIARI, L.A.; RUPPRECHT, C.E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. **Virus Research.** 8 abril 2005;111 p. 28-43.

LACKAY, S. N.; KUANG, Y.; FU, Z. F. Rabies in Small Animals. **Veterinary Clinics:** small animal practice. 38, 2008, p. 851–861.

LAFON, M. Immunology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H., editors. **Rabies**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007, 489-504

LANGONI, H.; HOFFMANN, J. L.; MENOZZI, B. D.; SILVA, R. C. Morcegos não-hematófagos na cadeia epidemiológica de transmissão da raiva. **Veterinária e Zootecnia.** v.14, n.1, jun., p. 43-46, 2007.

LANGONI, H.; LIMA, K.; MENOZZI, B.D.; SILVA, R.C. Rabies in the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* from Botucatu, southeastern Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2005, 11, 84-7.

LANGONI, H.; SOUZA, L.C.; ZETUN, C.B.; SILVA, T.C.C.; HOFFMANN, J.L.; SILVA, R.C. Serological survey for rabies in serum samples from vampire bats (*Desmodus rotundus)* in Botucatu region, SP, Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2008, 14, 4, p. 657

LARGHI, O. P. **Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia**. Ramos Mejia, Argentina, CEPANZO - Centro Panamericano de Zoonoses OPS/OMS. Nota técnica N° 8. Rev. 2. Set. 1975.

LE MERCIER,P.; JACOB, Y.; TORDO, N. The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependent RNA polymerase. **The Journal of General Virolology**. 78 (Pt 7), 1571-1576, 1997.

LOPES, M.C. Comparação entre as tecnicas de RT-PCR e inoculação intracerebral em camundongos para deteccao do virus da raiva em amostras mantidas por longos períodos em diferentes estados de conservação. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal) Faculdade de Odontologia – UNESP, Campus de Araçatuba/SP, 55p.

LOZA-RUBIO, E.; ROJAS, A.E.; BANDA, R.V.M.; NADIN-DAVIS, S.A.; CORTEZ, G.B. Detection of Rabies virus RNA using primers specifically designed for a rabies strain circulating in an aerial host. não publicado.

LOZA-RUBIO, E.; VARGAS, R.; HERNÁNDEZ, E.; BATALLA, D.; AGUILAR-SETIÉN, A. Evaluación de una serie de anticuerpos monoclonales para tipificar *Lyssavirus* in México. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, 119**(5): 391-395, 1995

LOZA-RUBIO, E.; VARGAS, R.; HERNÁNDEZ, E.; BATALLA, D.; AGUILAR-SETIÉN, A. Investigation of rabies virus strains in México With a panel of monoclonal antibodies used to classify *Lyssavirus*. **Bulletin of PAHO**, 30 (1): 31-35, 1996

LUO, M.; GREEN, T.J.; ZHANG, X.; TSAO, J.; QIU, S. Conserved characteristics of the rhabdovirus nucleoprotein. **Virus Research**, v. 129, n.2, p.246-51, 2007

LYLES, D. S.; RUPPRECHT, C. E. *Rhabdoviridae*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (ed.). **Fields Virology**, 5ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2007 Cap. 39; p. 1364 a 1408

MACHADO, J.M. Raiva. In: MEIRA, D.A. **Terapêutica de doenças infecciosas e parasitárias.** 2.ed. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. cap.10. p.103-106.

MARSTON, D.A.; MCELHINNEY, L.M.; JOHNSON, N.; MULLER, T.; CONZELMANN, K.K.; TORDO, N.; FOOKS, A.R. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other

lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. **Journal of General Virology**. 88 (PT 4), 1302-1314, 2007.

MATTOS, C. MATTOS, C. Tecnicas moleculares para caracterización del virus rabico. **Organización Panamericana de la Salud**. Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. University of California. 1998, 12p.

MATTOS, C.A.; MATTOS, C.C.; SMITH, J.S.; MILLER, E.T.; PAPO, S.; UTRERA, A.; OSBURN, B.I. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, 34 (6): 1553-1558, 1996

MEZADRI, T. J., TOMAZ, V. A., AMARAL, V. L. L. Animais de Laboratório: Cuidados na iniciação experimental. Editora da UFSC. COBEA. Cap. 4, p. 78-80. 2004.

MIRANDA, C.F.J.; SILVA, J.A; MOREIRA, É.C. Human rabies transmitted by dogs: risk areas in Minas Gerais, Brazil, 1991-1999. **Caderno de Saúde Pública**., Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, 2003.

MORAIS, N. B.; ROLIM, B. N.; CHAVES, H. H. M.; NETO, J. B.; SILVA, L. M. Rabies in Tamarins (*Callithrix jacchus*) in the State of Ceará, Brazil, a Distinct Viral Variant? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, n. 5, p. 609 - 610, 2000.

MORI, A. E.; DAS NEVES, D. A.; BRANDÃO, G.C.; LOUVET-CORTADA, V. M. C.; CARRIERI, M. L.. Relato de un caso de rabia canina, en el município de Corumbá, MS, Brasil, en 2006. In: RITA XVII - Rabies in the Americas, 2006, Brasília - DF. RITA XVII - Rabies in the Americas, 2006, Brasília., 2006. v. XVII. p. 126.

MS - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos confirmados de Raiva Humana, segundo UF de residência. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2008** 1 p.

MS - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Relatório da Reunião para Coordenadores Estaduais do Programa da Raiva,** 2009. Realizada em Brasília-DF no período de 11 a 15 de maio de 2009, 6 p.

MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON, J.R. Rabdovirus, Filovirus e Bornavirus. **Microbiologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 61, 1992. p.619 a 626.

NADIN-DAVIS, S. A. Molecular epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H., editors. **Rabies**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007, p.69-122.

NADIN-DAVIS, S. A. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. **Journal of Virological Methods**. 1998, v. 75, n. 1, p. 1 - 8.

NADIN-DAVIS, S.A.; HUANG, W.; ARMSTRONG, J.; CASEY, G.A.; BAHLOUL, C.; TORDO, N.; WANDELER, A.I. Antigenic and genetic divergence of rabies viruses from bat species indigenous to Canada. **Virus Research**. 74 (1-2), 139-156, 2001.

NADIN-DAVIS, S.A.; LOZA-RUBIO, E. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. **Virus Research**. 117 (2), 215-226, 2006.

NATARAJAN, M.; MUKUNDAN, P.; JOHN, T.J. Immune response to purified chick embryo cell culture rabies vaccine manufactured in India. **Indian Journal Medical Research**, **95**:51-3, 1992.

NOVA, A.V.; RENGELL, F.S.; HINRICHSEN, S.L. Raiva. In: VERONESI, Ricardo e FOCACCIA, Roberto. **Tratado de Infectologia.** 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 2v. v.1, cap.33, p.498-510

OMS –Organização Mundial da Saúde.. Expert Consultation on Rabies. First Report (Technical Report Series, 931), World Health Organization, Geneva, 2004.

OPS/OMS, 2007: Organización Panamericana de la Salud. Plan de acción para la prevención y el control de la rabia em lãs Américas Etapa 2005-2009. Rio de Janeiro, 2007

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Rabies;** Fact Sheet n° 99. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/index.html> Acesso em 15 janeiro 2009.

PANAFTOSA - Centro Panamericano de Febre Aftosa. América contra la rabia. Plan de accion para la prevencion y el control de la rabia em las Américas: etapa 2005-2009. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - Organização Panamericana de Saúde / Organização Mundial da Saúde, 2007.

PANAFTOSA- Centro Panamericano de Febre Aftosa/OPAS/OMS. Sistema de informação Epidemiológica, 2009. Dispoível em <http://siepi.panaftosa.org.br/Anuais.aspx>, acesso em 15 de setembro de 2009.

POCH, O., TORDO, N.; KEITH, G. Sequence of the 3386 3' nucleotides of the genome of the AVO1 strain rabies virus: structural similarities in the protein regions involved in transcription. **Biochimie** 70 (8), 1019-1029, 1988.

PORTALAMAZONIA. Amazônia Brasileira. Geografia. **Amazônia de A a Z**. 2006. Disponível em: http://portalamazonia.globo.com/artigo_amazonia_az.php?idAz=134. Acesso em:12 mar. 2008.

POSADA, D.; CRANDALL, K .A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, 14 (9):817-818, 1998.

POUNDER, D. J. Rabies, lyssaviruses and bats. **Scottish Medical Journal**., v. 48, n. 4, p. 99-101, 2003

REAL, L.A., HENDERSON, J.C., BIEK, R., SNAMAN, J., JACK, T.L., CHILDS, J.E., STAHL, E., WALLER, L., TINLINE, R., NADIN-DAVIS, S. Unifying the spatial population dynamics and molecular evolution of epidemic rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 102 (34), 12107–12111, 2005.

REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end-points. **American Journal of Hygiene**, 1938, 27, p. 493-497.

REICHMANN, M. L. A. B. Educação e promoção da saúde no programa de controle da raiva. **Manual Técnico do Instituto Pasteur**. São Paulo, 2000.

REZENDE, M.B.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; REZENDE JÚNIOR, M.B. Raiva. In: LEÃO, R.N.Q. **Doenças Infecciosas e**

Parasitárias: enfoque amazônico. Belém: Cejup/UEPA/IEC, 1997. cap.24, P.377-395.

ROHDE, R.E.; NEILL, S.U.; CLARCK, K.A.; SMITH, J.S. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Texas. **Clinical and Diagnostic Virology, 8:** 209-217, 1997

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Disease.** v. 2, n. 6, p. 327 - 343, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, 74:** 5463-5467, 1977.

SCHEFFER, K.C. Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. 2005, 111 p. Dissertação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade de São Paulo. 2005.

SCHEFFER, K.C.; CARRIERI, M.L.; ALBAS, A.; PIRES DOS SANTOS, H.C.; KOTAIT, I.; ITO, F.H. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. 2007, 41 (3); 389-95.

SCHNEIDER, H. **Metodos de Analise Filogenética**: um guia pratico. 3 ed. Ribeirão Preto: SBG & Hollos, 2007. v. 1, 200p.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; GOMES, A.A.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraiba, Brazil. **Acta Virologica**. 50 (1), 33-37, 2006

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; CUNHA, E.M.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.; NOCITTI, D.P.; ITO, F.H.; KURANE, I.; SAKAI, T. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (Artibeus spp.) in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science** 66 (10), 1271-1273, 2004.

SOUZA, L.C.; LANGONI, H.; SILVA, R.C.; LUCHEIS, S.B. Vigilância epidemiológica da raiva na região de Botucatu-SP: importância dos quirópteros na manutenção do vírus na natureza. **Ars Veterinária**, 2005, 21, 62-8.

SRINIVASAN, A.; BURTON, E. C.; KUEHNERT, M. J. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **New England Journal of Medicine,** 2005, 352, p. 1103-1111.

SWANGO, L.J. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, E.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**: moléstias do cão e do gato. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 69, 2v. v. 1, p.573-588.

TAKAOKA, N. Y. Alteração no perfil epidemiológico da raiva no estado de São Paulo. Livro de resumos do Seminário Internacional de Raiva. São Paulo – SP, 22 a 24 de agosto de 2000. Disponível em <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informações/anais/seminario_internacional/default.htm>, Acesso em 20 de janeiro de 2009.

TAKAOKA, N.Y.. Raiva. In: MARCONDES, E.; VAZ, F.A.C.; RAMOS, J.L.A.; OKAY, Y. **Pediatria Básica**: pediatria clínica geral. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2003. cap. 16, 2v.v.2, p.167-177.

TAKAOKA, N.Y.; KOTAIT, I.; REICHMANN, M.L.A.B.; CARRIERI, M.L.; PANACHÃO, M.R.I.; HARMANI, N.M.S.; CUNHA, R.S.; OMOTO, T.M.; BOLZAN, V.L.; COSTA, W.A.. **Raiva - Controle e profilaxia humana**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. Disponível em <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/calendario.pdf>. Acesso em 07 de abril de 2005.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25 (24):4876-82, 1997.

TOPOROVSKI, R. Z.; FAVORETTO, S. R.; SOARES, S. L.; CAMPOS, A. C. A.; LOPES, M. C.; MARTORELLI, L. F. A.; SACRAMENTO, D. R. V.; DURIGON, E. L. Antigenic studies of rabies virus isolates from different animal species and humans.

In: National Meeting of Virology. 2005. 16., **Virus Reviews & Research**, v. 10, Supl 1, p. 112, 2005.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 83 (11), 3914-3918, 1986.

TRAVASSOS DA ROSA, E. S., BARBOSA, T. F. S., PEREIRA, A. S., MEDEIROS, D. B. A., CASSEB, L. M. N., BEGOT, A. L., LIMA, R. J. S.,MEDEIROS, R., WADA, M. Y., BELO, L. M., DANTAS,M. C. S., VASCONCELOS, P. F. C. Human rabies outbreak transmitted by hematophagous bats in Augusto Corrêa Municipality in Pará State: Laboratory Findings. **Virus Reviews & Research.** XVI National Meeting of Virology, 10 (Suppl 1): 186, 2005.

TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDAO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; DE OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; DA SILVA LIMA, R. J.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUZA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. C. Bat-transmitted human rabies outbreaks, brazilian Amazon. **Emerging Infection Disease.** v. 12, n. 8, p. 1197 - 1202, 2006.

TRIMARCHI, C.V.; NADIN-DAVIS, S.A. Diagnostic evaluation. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H., editors. **Rabies**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007. p. 411-69.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy**: **Classification and Nomenclature of Viruses**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. California: Academic Press, San Diego, 2000. p. 563-583.

VELASCO-VILLA, A.; GÓMEZ-SIERRA, M.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, G.; JUÁREZ-ISLAS, V.; MELÉNDEZ-FÉLIX, A.; VARGAS-PINO, F.; VELÁZQUEZ-MONROY, O.; FLISSER, A. Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology, 40** (3)**:** 951-958, 2002.

VELASCO-VILLA, A.; ORCIARI, L. A.; JUÁREZ-ISLAS, V.; GÓMEZ-SIERRA, M.; PADILLA-MEDINA, I.; FLISSER, A.; SOUZA, V.; CASTILLO, A.; FRANKA, R.; ESCALANTE-MAÑE, M.; SAURI-GONZÁLEZ, I.; RUPPRECHT, C. E. Molecular Diversity of rabies virases associated with bats in Mexico and others countries of the Americas. **Journal of Clinical Microbiology, 44** (5)**:** 1697-1710, 2006.

VELASCO-VILLA, A.; ORCIARI, L.A.; RUPPRECHT, C.E. Elimination of enzootic dog rabies in the United States and its re-emergence in wild terrestrial carnivores. não publicado.

VULKELIC, S.P. Identificacion de la variante 3 del virus rabico aislado en muestras de perros y gatos de America del Sur. In: Seminário internacional morcegos como transmissores da raiva. Programa de Resumos, 03 a 06/12/2001. Livro de Resumos, p.47-49, 2001. Disponível em <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2001.pdf>, acesso em 02 de janeiro de 2009.

VULKELIC, S.P. IDENTIFICACION DE LA VARIANTE 3 DEL VIRUS RABICO AISLADO EM MUESTRAS DE PERROS Y GATOS DE AMERICA DEL SUR. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE MORCEGOS COMO TRANSMISSORES DE RAIVA, 2001, São Paulo. Programa e Resumos... São Paulo: Instituto Pasteur, 2001, p. 47-49.

WADA, M.Y.; BEGOT, A.L.; NORONHA, S.L.B.; ALMEIDA, I.F.; LIMA, R.J.S.; SANTOS, L.B.C.; MONTEIRO, A.; CRUZ, R.S.; SILVA, I.N.O.; SOARES, D.S.; PINHEIRO, A.S.; MORAES, J.R.F.; TENÓRIO, A.S.; PEREIRA, A.G.G.; PENHA, T.C.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; BARROS, V.L.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; BARBOSA, T.F.S.; KOTAIT, I.; SOUZA, J.C.P.; GITTI, C.B.; UIEDA, W.; CARMO, E.H.; OLIVEIRA, R.C.; HATCH, D.L.; SILVA, E.D.; MUNHOZ, E. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no Município de Portel-Pará, março/abril de 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, 06, 2004. Disponível em <http://www.saude.gov.br/svs>. Acesso em 10/10/2007.

WARNER, C.K.; ZAKI, S.R.; SHIEH, W.J.; WHITFIELD, S.G.; SMITH, J.S.; ORCIARI, L.A.; SHADDOCK, J.H.; NIEZGODA, M.; WRIGHT, C.W.; GOLDSMITH,

C.S.; SANDERLIN, D.W.; YAGER, P.A.; RUPPRECHT, C.E. Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 60 (3), 502-507, 1999.

WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. 1978, v. 75, p. 3938-42.

WUNNER, W.H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H., editors. **Rabies**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007. p.27-68.

WUNNER, W.H.; LARSON, J.K.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C.L. The molecular biology of rabies viruses. **Reviews of Infectious Diseases**, 10:S771-84, 1988.

YUNG, V.; FAVI, M.; FERNÁNDEZ, J. Genetic and antigenic typing of rabies virus in Chile: brief report. **Archives of virology.** 2002, 147: 2197-2205.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Lista de re-isolamentos de cepas do VRab obtidos e utilizados nesse trabalho de acordo com ano de obtenção, município e estado de origem.

(continua)

Ordem	Ano	Registro	Espécie	Procedência	UF
1	2000	9.593	Canina	Rio Branco	AC
2	2000	9.632	Canina	Porto Velho	RO
3	2000	9.672	Canina	Presidente Médici	RO
4	2000	10.002	Canina	Prainha	PA
5	2000	10.014	Canina	Ji-Paraná	RO
6	2000	10.016	Canina	Jarú	RO
7	2000	10.019	Felina	Jarú	RO
8	2000	10.051	Felina	Ji-Paraná	RO
9	2000	10.083	Felina	Oriximiná	PA
10	2000	10.090	Canina	Jarú	RO
11	2000	10.100	Canina	Porto Velho	RO
12	2000	10.106	Canina	Ji-Paraná	RO
13	2000	10.149	Canina	Rio Branco	AC
14	2000	10.167	Canina	Brasiléia	AC
15	2000	10.185	Canina	Ji-Paraná	RO
16	2000	10.190	Canina	Porto Velho	RO
17	2000	10.214	Felina	Jarú	RO
18	2000	10.303	Felina	Rio Branco	AC
19	2000	10.336	Canina	Porto Velho	RO
20	2000	10.348	Canina	Ariquemes	RO
21	2000	10.349	Felina	Ji-Paraná	RO
22	2000	10.387	Canina	Rio Branco	AC
23	2000	10.495	Felina	Porto Velho	RO
24	2000	10.505	Canina	Ariquemes	RO
25	2000	10.539	Canina	Porto Velho	RO
26	2000	10.592	Canina	Rio Branco	AC
27	2000	10.628	Canina	Ariquemes	RO
28	2000	10.629	Canina	Ariquemes	RO
29	2000	10.632	Felina	Candeias do Jamari	RO
30	2000	10.641	Canina	Porto Velho	RO
31	2000	10.690	Canina	Rio Branco	AC
32	2000	10.720	Canina	Ariquemes	RO
33	2000	10.733	Canina	Ariquemes	RO
34	2000	10.807	Canina	Rio Branco	AC
35	2000	10.833	Canina	Rio Branco	AC

(continua)

Ordem	Ano	Registro	Espécie	Procedência	UF
36	2000	10.848	Canina	Pimenta Bueno	RO
37	2000	10.851	Canina	Ji-Paraná	RO
38	2000	10.865	Canina	Ariquemes	RO
39	2000	10.866	Canina	Ariquemes	RO
40	2000	10.867	Felina	Ariquemes	RO
41	2000	10.872	Canina	Porto Velho	RO
42	2000	10.954	Canina	Porto Velho	RO
43	2000	10.956	Canina	Jí-Paraná	RO
44	2000	10.982	Canina	Ariquemes	RO
45	2000	11.050	Canina	Pimenta Bueno	RO
46	2000	11.053	Canina	Alto Paraíso	RO
47	2000	11.083	Canina	Rio Branco	AC
48	2000	11.086	Canina	Rio Branco	AC
49	2000	11.087	Canina	Rio Branco	AC
50	2000	11.092	Canina	Rio Branco	AC
51	2000	11.122	Canina	Pimenta Bueno	RO
52	2000	11.149	Canina	Ariquemes	RO
53	2000	11.156	Canina	Ouro Preto do Oeste	RO
54	2000	11.160	Canina	Ouro Preto do Oeste	RO
55	2000	11.162	Canina	Porto Velho	RO
56	2001	11.218	Canina	Senador Guiomard	AC
57	2001	11.291	Canina	Porto Velho	RO
58	2001	11.334	Canina	Rio Branco	AC
59	2001	11.375	Canina	Porto Velho	RO
60	2001	11.669	Felina	Dom Eliseu	PA
61	2001	11.703	Canina	Porto Velho	RO
62	2001	11.762	Canina	Senador Guiomard	AC
63	2001	11.861	Canina	Rio Branco	AC
64	2001	12.040	Canina	Pimenta Bueno	RO
65	2001	12.041	Canina	Pimenta Bueno	RO
66	2001	12.078	Canina	Ouro Preto do Oeste	RO
67	2001	12.247	Canina	Jí-Paraná	RO
68	2001	12.249	Canina	Rio Branco	AC
69	2001	12.280	Canina	Rio Branco	AC
70	2001	12.377	Canina	Jí-Paraná	RO
71	2001	12.431	Canina	São Geraldo do Araguaia	PA
72	2001	12.510	Canina	Açailândia	MA
73	2001	12.523	Canina	Porto Velho	RO
74	2001	12.535	Canina	Porto Velho	RO
75	2001	12.538	Canina	Ariquemes	RO
76	2001	12.546	Canina	Ministro Andreazza	RO

(continua)

Ordem	Ano	Registro	Espécie	Procedência	UF
77	2001	12.589	Canina	Rio Branco	AC
78	2001	12.596	Felina	Rio Branco	AC
79	2001	12.598	Canina	Senador Guiomard	AC
80	2001	12.623	Canina	Porto Velho	RO
81	2001	12.628	Canina	Rolim de Moura	RO
82	2001	12.629	Canina	Ariquemes	RO
83	2001	12.732	Felina	Jí-Paraná	RO
84	2001	12.798	Canina	Buritis	RO
85	2001	12.803	Canina	Jarú	RO
86	2001	13.005	Canina	Pimenta Bueno	RO
87	2001	13.050	Canina	Marabá	PA
88	2001	13.163	Canina	Senador Guiomard	AC
89	2001	13.181	Canina	Rio Branco	AC
90	2001	13.343	Canina	Porto Velho	RO
91	2001	13.375	Canina	Rolim de Moura	RO
92	2001	13.377	Canina	Rolim de Moura	RO
93	2001	13.390	Felina	Jí-Paraná	RO
94	2001	13.399	Canina	Ariquemes	RO
95	2002	13.536	Canina	Porto Velho	RO
96	2002	13.607	Canina	Rio Branco	AC
97	2002	13.747	Canina	Rio Branco	AC
98	2002	13.839	Canina	São Luiz	MA
99	2002	13.853	Canina	Itupiranga	PA
100	2002	14.133	Felina	Marabá	PA
101	2002	14.187	Canina	Rolim de Moura	RO
102	2002	14.301	Canina	Humaitá	AM
103	2002	14.734	Felina	Rolim de Moura	RO
104	2002	15.089	Canina	Espigão do Oeste	RO
105	2002	15.121	Canina	Cacoal	RO
106	2002	15.157	Canina	Rolim de Moura	RO
107	2002	15.158	Canina	Rolim de Moura	RO
108	2002	15.162	Canina	Rolim de Moura	RO
109	2002	15.226	Canina	Senador Guiomard	AC
110	2002	15.286	Canina	Cacoal	RO
111	2002	15.287	Canina	Espigão do Oeste	RO
112	2002	15.289	Canina	Espigão do Oeste	RO
113	2002	15.590	Canina	Rolim de Moura	RO
114	2002	15.622	Canina	Marabá	PA
115	2003	16.220	Canina	Porto velho	RO
116	2003	16.257	Felina	Mãe do Rio	PA
117	2003	16.560	Canina	Porto Velho	RO

(conclusão)

Ordem	Ano	Registro	Espécie	Procedência	UF
118	2003	16.620	Canina	Bragança	PA
119	2003	16.932	Canina	Humaitá	AM
120	2003	16.967	Felina	Rio Branco	AC
121	2003	17.153	Canina	Cacoal	RO
122	2003	17.231	Canina	Porto Velho	RO
123	2003	17.246	Canina	Porto Velho	RO
124	2003	17.268	Canina	Porto Velho	RO
125	2003	17.378	Canina	Porto Velho	RO
126	2003	17.411	Canina	Nova Ipixuna	PA
127	2003	17.584	Canina	Rio Branco	AC
128	2003	18.095	Canina	Nova Ipixuna	PA
129	2004	18.306	Felina	Jacundá	PA
130	2004	18.384	Canina	Nova Ipixuna	PA
131	2004	18.831	Canina	Acrelândia	AC
132	2004	18.920	Canina	Jacundá	PA
133	2004	20.013	Canina	Jarú	RO

APÊNDICE B - Resultados obtidos pela caracterização antigênica utilizando o painel de AcM de cepas do VRab isoladas na Amazônia brasileira pelo IEC, no período de janeiro de 2000 a julho de 2009.

(continua)

Ano	Espécie	Procedência	UF	Registro	AcM	Sequenciamento
2000	Humana†	Cacoal	RO	9.776	VLab	Neste Estudo
2000	Canina	Rio Branco	AC	9.593	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	9.632	VAg2	
2000	Canina	Presidente Médici	RO	9.672	VAg2	
2000	Canina	Prainha	PA	10.002	VAg2	
2000	Canina	Ji-Paraná	RO	10.014	VAg2	
2000	Canina	Jarú	RO	10.016	VAg2	
2000	Felina	Jarú	RO	10.019	VAg2	
2000	Felina	Ji-Paraná	RO	10.051	VAg2	
2000	Felina	Oriximiná	PA	10.083	VAg2	VAg2 (BARBOSA, 2007)
2000	Canina	Jarú	RO	10.090	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	10.100	VAg2	
2000	Canina	Ji-Paraná	RO	10.106	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	10.149	VAg2	
2000	Canina	Brasiléia	AC	10.167	VAg2	
2000	Canina	Ji-Paraná	RO	10.185	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	10.190	VAg2	
2000	Felina	Jarú	RO	10.214	VAg2	
2000	Felina	Rio Branco	AC	10.303	VAg2	
2000	Humana†	Cacoal	RO	10.315	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	10.336	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.348	VAg2	
2000	Felina	Ji-Paraná	RO	10.349	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	10.387	VAg2	
2000	Felina	Porto Velho	RO	10.495	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.505	VAg2	
2000	Humana†	Redenção	PA	10.507	VAg2	
2000	Humana†	Ouro Preto do Oeste	RO	10.530	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	10.539	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	10.592	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.628	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.629	VAg2	
2000	Felina	Candeias do Jamari	RO	10.632	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	10.641	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	10.690	VAg2	

(continua)

Ano	Espécie	Procedência	UF	Registro	AcM	Sequenciamento
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.720	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.733	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	10.807	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	10.833	VAg2	
2000	Canina	Pimenta Bueno	RO	10.848	VAg2	
2000	Canina	Ji-Paraná	RO	10.851	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.865	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.866	VAg2	
2000	Felina	Ariquemes	RO	10.867	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	10.872	VAg2	
2000	Humana†	Ouro Preto do Oeste	RO	10.951	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	10.954	VAg2	
2000	Canina	Jí-Paraná	RO	10.956	VAg2	
2000	Humana†	Marabá	PA	10.972	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	10.982	VAg2	
2000	Canina	Pimenta Bueno	RO	11.050	VAg2	
2000	Canina	Alto Paraíso	RO	11.053	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	11.083	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	11.086	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	11.087	VAg2	
2000	Canina	Rio Branco	AC	11.092	VAg2	
2000	Canina	Pimenta Bueno	RO	11.122	VAg2	
2000	Canina	Ariquemes	RO	11.149	VAg2	
2000	Canina	Ouro Preto do Oeste	RO	11.156	VAg2	
2000	Canina	Ouro Preto do Oeste	RO	11.160	VAg2	
2000	Canina	Porto Velho	RO	11.162	VAg2	
2001	Canina	Senador Guiomard	AC	11.218	VAg2	
2001	Canina	Porto Velho	RO	11.291	VAg2	
2001	Canina	Rio Branco	AC	11.334	VAg2	
2001	Canina	Porto Velho	RO	11.375	VAg2	
2001	Felina	Dom Eliseu	PA	11.669	VAg2	VAg2 (BARBOSA, 2007)
2001	Canina	Porto Velho	RO	11.703	VAg2	
2001	Canina	Senador Guiomard	AC	11.762	VAg2	
2001	Canina	Rio Branco	AC	11.861	VAg2	
2001	Humana†	Dom Eliseu	PA	11.950	VAg2	
2001	Canina	Pimenta Bueno	RO	12.040	VAg2	
2001	Canina	Pimenta Bueno	RO	12.041	VAg2	
2001	Canina	Ouro Preto do Oeste	RO	12.078	VAg2	
2001	Canina	Jí-Paraná	RO	12.247	VAg2	
2001	Canina	Rio Branco	AC	12.249	VAg2	
2001	Canina	Rio Branco	AC	12.280	VAg2	

(continua)

Ano	Espécie	Procedência	UF	Registro	AcM	Sequenciamento
2001	Humana†	Buritis	RO	12.286	VAg2	
2001	Humana†	Pimenta Bueno	RO	12.358	VAg2	
2001	Canina	Jí-Paraná	RO	12.377	VAg2	
2001	Canina	São Geraldo do Araguaia	PA	12.431	VAg2	
2001	Canina	Açailândia	MA	12.510	VAg2	
2001	Canina	Porto Velho	RO	12.523	VAg2	
2001	Canina	Porto Velho	RO	12.535	VAg2	
2001	Canina	Ariquemes	RO	12.538	VAg2	
2001	Canina	Ministro Andreazza	RO	12.546	VAg2	
2001	Canina	Rio Branco	AC	12.589	VAg2	
2001	Felina	Rio Branco	AC	12.596	VAg2	
2001	Canina	Senador Guiomard	AC	12.598	VAg2	
2001	Canina	Porto Velho	RO	12.623	VAg2	
2001	Canina	Rolim de Moura	RO	12.628	VAg2	
2001	Canina	Ariquemes	RO	12.629	VAg2	
2001	Felina	Jí-Paraná	RO	12.732	VAg2	
2001	Canina	Buritis	RO	12.798	VAg2	
2001	Canina	Jarú	RO	12.803	VAg2	
2001	Canina	Pimenta Bueno	RO	13.005	VAg2	
2001	Canina	Marabá	PA	13.050	VAg2	
2001	Canina	Senador Guiomard	AC	13.163	VAg2	
2001	Canina	Rio Branco	AC	13.181	VAg2	
2001	Humana†	Primavera	RO	13.214	VAg2	
2001	Humana†	São Francisco do Guaporé	RO	13.278	VAg2	
2001	Canina	Porto Velho	RO	13.343	VAg2	
2001	Canina	Rolim de Moura	RO	13.375	VAg2	
2001	Canina	Rolim de Moura	RO	13.377	VAg2	
2001	Felina	Jí-Paraná	RO	13.390	VAg2	
2001	Canina	Ariquemes	RO	13.399	VAg2	
2002	Canina	Porto Velho	RO	13.536	VAg2	
2002	Humana†	Itupiranga	PA	13.597	VAg2	
2002	Canina	Rio Branco	AC	13.607	VAg2	
2002	Canina	Rio Branco	AC	13.747	VAg2	
2002	Canina	São Luiz	MA	13.839	VAg2	
2002	Canina	Itupiranga	PA	13.853	VAg2	
2002	Felina	Marabá	PA	14.133	VAg2	VAg2 (BARBOSA, 2007)
2002	Canina	Rolim de Moura	RO	14.187	VAg2	
2002	Canina	Humaitá	AM	14.301	VAg2	
2002	Felina	Rolim de Moura	RO	14.734	VAg2	
2002	Humana†	Porto Acre	AC	14.759	VAg2	

(continua)

Ano	Espécie	Procedência	UF	Registro	AcM	Sequenciamento
2002	Canina	Espigão do Oeste	RO	15.089	VAg2	
2002	Canina	Cacoal	RO	15.121	VAg2	
2002	Canina	Rolim de Moura	RO	15.157	VAg2	
2002	Canina	Rolim de Moura	RO	15.158	VAg2	
2002	Canina	Rolim de Moura	RO	15.162	VAg2	
2002	Canina	Senador Guiomard	AC	15.226	VAg2	
2002	Canina	Cacoal	RO	15.286	VAg2	
2002	Canina	Espigão do Oeste	RO	15.287	VAg2	
2002	Canina	Espigão do Oeste	RO	15.289	VAg2	
2002	Canina	Rolim de Moura	RO	15.590	VAg2	
2002	Canina	Marabá	PA	15.622	VAg2	
2003	Canina	Porto velho	RO	16.220	VAg2	
2003	Felina	Mãe do Rio	PA	16.257	VAg2	VAg2 (BARBOSA, 2007)
2003	Canina	Porto Velho	RO	16.560	VAg2	
2003	Canina	Bragança	PA	16.620	VAg2	
2003	Canina	Humaitá	AM	16.932	VAg2	
2003	Felina	Rio Branco	AC	16.967	VAg2	
2003	Canina	Cacoal	RO	17.153	VAg2	
2003	Canina	Porto Velho	RO	17.231	VAg2	
2003	Canina	Porto Velho	RO	17.246	VAg2	
2003	Canina	Porto Velho	RO	17.268	VAg2	
2003	Canina	Porto Velho	RO	17.378	VAg2	
2003	Canina	Nova Ipixuna	PA	17.411	VAg2	
2003	Canina	Rio Branco	AC	17.584	VAg2	
2003	Canina	Nova Ipixuna	PA	18.095	VAg2	
2004	Felina	Jacundá	PA	18.306	VAg2	
2004	Canina	Senador Guiomard	AC	18.324	VLab	Neste Estudo
2004	Canina	Nova Ipixuna	PA	18.384	VAg2	
2004	Humana†	Portel	PA	18.742	VAg3	
2004	Humana†	Portel	PA	18.781	VAg3	
2004	Humana†	Portel	PA	18.782	VAg3	
2004	Humana†	Portel	PA	18.784	VAg3	
2004	Canina	Acrelândia	AC	18.831	VAg2	
2004	Humana†	Portel	PA	18.852	VAg3	
2004	Humana†	Portel	PA	18.853	VAg3	
2004	Humana†	Portel	PA	18.857	VAg3	
2004	Quiróptero†1	Portel	PA	18.867	VLab	Nova Variante (BARBOSA, 2007)
2004	Humana†	Portel	PA	18.884	VAg3	
2004	Canina	Jacundá	PA	18.920	VAg2	

(continua)

Ano	Espécie	Procedência	UF	Registro	AcM	Sequenciamento
2004	Humana†	Viseu	PA	19.233	VAg3	
2004	Canina	Pimenta Bueno	RO	19.891	VAg3	Neste Estudo
2004	Quiróptero†2	Breves	PA	19.448	VAg3	Neste Estudo
2004	Canina	Jarú	RO	20.013	VAg2	
2005	Canina	Ariquemes	RO	21.718	VAg2	
2005	Canina	Ariquemes	RO	21.720	VAg2	
2005	Bovina	Viseu	PA	21.760	VAg3	
2005	Bovina	Autazes	AM	21.766	VAg3	
2005	Canina	Jacundá	PA	22.023	VAg2	VAg2 (BARBOSA, 2007)
2005	Canina	Viseu	PA	22.186	VAg2	VAg2 (BARBOSA, 2007)
2005	Canina	Ariquemes	RO	22.245	VAg2	
2005	Canina	Jacundá	PA	22.422	VAg2	VAg2 (BARBOSA, 2007)
2005	Canina	Jacundá	PA	22.723	VAg2	
2005	Canina	Jacundá	PA	22.772	VAg2	
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.881	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.895	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.896	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.897	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.899	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.901	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.902	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.903	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	22.931	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Canina	Ariquemes	RO	23.033	VAg2	
2005	Humana	Augusto Corrêa	PA	23.047	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Felina	Augusto Corrêa	PA	23.167	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Quiróptero2	Augusto Corrêa	PA	23.187	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Bovina	Viseu	PA	23.188	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Canina	Jacundá	PA	23.271	VAg2	
2005	Bovina	Augusto Corrêa	PA	23.284	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Equídea	Augusto Corrêa	PA	23.285	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Quiróptero2	Augusto Corrêa	PA	23.286	VAg3	
2005	Canina	Jacundá	PA	23.385	VAg2	
2005	Quiróptero2	Augusto Corrêa	PA	23.425	VAg3	
2005	Suína	Augusto Corrêa	PA	23.430	VAg3	VAg3 (BARBOSA, 2007)
2005	Humana	Viseu	PA	23.433	VAg3	
2005	Quiróptero3	Ananindeua	PA	23.630	VAg3	
2005	Canina	Ariquemes	RO	23.744	VAg2	
2005	Humana	Viseu	PA	23.755	VAg3	
2005	Felina	Jacundá	PA	23.846	VAg2	

(continua)

Ano	Espécie	Procedência	UF	Registro	AcM	Sequenciamento
2005	Canina	Ariquemes	RO	24.009	VAg2	Neste Estudo
2005	Canina	Marabá	PA	24.040	VAg2	
2005	Canina	Ariquemes	RO	24.397	VAg2	Neste Estudo
2005	Canina	Ariquemes	RO	24.401	VAg2	
2005	Canina	Ariquemes	RO	24.402	VAg2	
2006	Quiróptero[2]	Redenção	PA	24.809	VAg3	
2006	Bovina	Medicilândia	PA	25.106	VAg3	
2006	Bovina	Medicilândia	PA	25.107	VAg3	
2006	Bovina	Medicilândia	PA	25.437	VAg3	
2006	Bovina	Medicilândia	PA	25.438	VAg3	
2006	Bovina	Medicilândia	PA	25.480	NC	Neste Estudo
2006	Bovina	Medicilândia	PA	25.481	VAg3	
2006	Bovina	Medicilândia	PA	25.482	VAg3	
2006	Canina	Jacundá	PA	25.612	VAg2	
2006	Equídea	Manaus	AM	25.756	VAg3	
2006	Quiróptero[4]	Belém	PA	26.452	VAg3	
2006	Equídea	Pacajá	PA	26.486	VAg3	
2006	Canina	Marabá	PA	26.617	VAg2	
2006	Canina	Jacundá	PA	26.729	VAg2	
2006	Canina	São João do Araguaia	PA	26.730	VAg2	Neste Estudo
2006	Canina	Marabá	PA	26.733	VAg2	
2006	Bovina	Tracuateua	PA	26.740	NC	Neste Estudo
2006	Bovina	Augusto Correa	PA	26.741	VAg3	
2006	Bovina	Bragança	PA	26.742	NC	Neste Estudo
2006	Bovina	Tracuateua	PA	26.759	VAg3	
2006	Bovina	Tracuateua	PA	27.010	VAg3	
2006	Canina	Marabá	PA	27.229	VLab	Neste Estudo
2006	Canina	Jacundá	PA	27.235	VLab	Neste Estudo
2006	Canina	Marabá	PA	27.387	VAg2	
2006	Canina	Marabá	PA	27.414	VAg2	
2006	Quiróptero[2]	Irituia	PA	27.433	NC	Neste Estudo
2006	Canina	Ariquemes	RO	27.454	VAg2	
2006	Quiróptero[2]	Irituia	PA	27.519	VAg3	
2006	Canina	Marabá	PA	27.574	VAg2	
2006	Canina	Marabá	PA	27.580	VAg2	
2006	Canina	Marabá	PA	27.737	VAg2	
2006	Canina	Marabá	PA	27.944	VAg2	
2006	Canina	Marabá	PA	27.945	VAg2	
2006	Canina	Marabá	PA	27.946	VAg2	
2006	Canina	Marabá	PA	27.949	VAg2	Neste Estudo
2007	Canina	Marabá	PA	28.056	VAg2	

(conclusão)

Ano	Espécie	Procedência	UF	Registro	AcM	Sequenciamento
2007	Canina	Marabá	PA	28.222	VAg2	
2007	Canina	Marabá	PA	28.471	VAg2	
2007	Canina	Marabá	PA	28.472	VAg2	
2007	Canina	Marabá	PA	29.323	VAg2	
2007	Irara	Apuí	AM	29.373	VAg4	Neste Estudo
2007	Quiróptero[5]	Senador José Porfirio	PA	29.526	NC	Neste Estudo
2007	Quiróptero[6]	Belém	PA	29.787	VAg3	Neste Estudo
2007	Canina	Marabá	PA	30.060	VAg2	
2007	Canina	Marabá	PA	30.251	VAg2	
2007	Quiróptero[3]	Concórdia do Pará	PA	30.403	NC	Neste Estudo
2008	Canina	Marabá	PA	30.571	VAg2	
2008	Canina	Marabá	PA	30.573	VAg2	
2008	Bovina	Tracuateua	PA	31.001	VAg3	
2008	Bovina	Tracuateua	PA	31.008	VAg3	
2008	Canina	Marabá	PA	31.145	VAg2	
2008	Canina	Marabá	PA	31.146	VAg2	Neste Estudo
2008	Canina	Marabá	PA	31.394	VAg2	
2008	Canina	Marabá	PA	31.603	VAg2	
2008	Quiróptero[4]	Macapá	AP	31.738	VAg3	
2008	Canina	Tucuruí	PA	31.739	NC	Neste Estudo
2008	Canina	Marabá	PA	31.848	VAg2	
2008	Canina	São Geraldo do Araguaia	PA	31.853	VAg2	
2008	Bovina	Santarém	PA	31.910	VAg3	
2008	Bovina	Ourém	PA	31.970	VAg3	
2008	Canina	Marabá	PA	32.077	VAg2	
2009	Canina	São Geraldo do Araguaia	PA	32.221	VAg2	
2009	Canina	Marabá	PA	32.682	VAg2	
2009	Canina	Marabá	PA	32.690	VAg2	
2009	Bovina	Apuí	AM	32.965	NC	Neste Estudo

† Caracterização antigênica realizada no IP/SP; [1] *Uroderma bilobatum;* [2] *Desmodus rotundus;* [3] *Myotis nigricans.* [4] *Artibeus planirostris;* [5] *Eptesicus brasiliensis;* [6] *Artibeus obscurus;* NC: Não compatível com o painel de AcM.

ANEXOS

ANEXO A - Procedimentos da técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) (LARGHI, 1975) utilizada no laboratório de diagnóstico de raiva da SEARB/IEC/MS/SVS.

No teste de IFD, uma impressão de amostra suspeita em lâmina e com anticorpo policlonal específico marcado com isotiocianato de fluoresceína, produzido pelo Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP), o anticorpo marcado, conjugado, quando ligado ao microrganismo e excitado por luz ultravioleta do micriscópio de fluorescência emite uma fluorescência visível que pode ser detectada pelo olho humano (FERREIRA; ÁVILA, 1996; HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

A. IMPRESSÃO EM LÂMINA PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

- Colocar separadamente fragmentos de Corno de Amon, córtex cerebral e/ou cerebelo da amostra em exame, sobre espátula de madeira envolvida com papel toalha.
- Fazer duas impressões por lâmina (extensão de aproximadamente 1,5cm^2) tocando delicadamente com a lâmina em distintos locais.
- Deixar as impressões secarem a temperatura ambiente em torno de 15-30 minutos.
- Fixar as impressões durante quatro horas em acetona à temperatura de -20º C contida em um copo de Coplin.

Obs^1: Em casos de urgência a fixação pode ser reduzida até 30 minutos.
Obs^2: O copo de Coplin com a acetona pode ser mantido em um congelador

- Tirar as lâminas da acetona e escorrer o excesso para dar prosseguimento na técnica ou guardar a -20º C até a realização do teste.

B. TÉCNICA DE IFD

- Retirar a lâmina da acetona P.A. ou do porta lâminas contido no freezer -20°C e deixar secar.
- Cobrir a impressão mais próxima da identificação com a diluição **A** (cérebro de camundongo normal + conjugado previamente titulado) e, a impressão mais distante, com a diluição **B** (CVS + conjugado previamente titulado).
- Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida.
- Enxaguar as lâminas com SST, pH 7,2 a 7,5, deixando-as por 2 vezes submersas em salina, durante 10 minutos.
- Enxaguar com água destilada, para evitar a formação de cristais durante a secagem.
- Secar as lâminas.
- Adicionar uma gota de glicerina tamponada, pH >7,0.
- - Colocar lamínulas nas duas impressões, A e B.
- Este mesmo procedimento deve ser feito com as lâminas dos controles (material positivo e negativo para raiva).
- Realizar a leitura das lâminas em microscópio de fluorescência (objetiva 20x, 40x e ocular de 10x)
- Lançar os resultados em protocolo de IFD, no banco de dados (Microsoft excel®) e no ofício correspondente a amostra.

C. LEITURA DAS LÂMINAS

A leitura das lâminas é feita para observar a presença do antígeno rábico, onde poderão ser evidenciadas estruturas de cor verde-maçã, dotadas de brilho intenso. O tamanho destas estruturas pode ser variado: algumas são pequenas, chamadas de areia ou poeira antigênica, e outras se apresentam como inclusões comparáveis aos Corpúsculos de Negri.

Obs.: Não deverá ser observada fluorescência nas impressões com a diluição B (CVS+conjugado); este procedimento é importante para determinar a especificidade do teste evitando o falso-positivo.

D. CONJUGADO ANTI-RÁBICO

D.1. DILUIÇÃO

Diluir duas alíquotas de conjugado, de acordo com o seu título, em:

A) Suspensão de cérebro de camundongo normal (CCN)

B) Suspensão de cérebro de camundongo infectado com vírus “standart” de confrontação (CVS)

- Descongelar as suspensões de CVS e CCN (-70°C);
- Identificar dois tubos plásticos de 1,5 mL, um com a sigla **CVS** e outro **CCN**;
- Diluir o conjugado em SST conforme o título;
- Distribuir CVS e CCN nos respectivos micro tubos
- Incubar em estufa a 37°C por 10 minutos

D.1.1. Cálculo para diluição

Serão feitas uma diluição inicial em SST e uma final de 1:5 em CVS e CCN, de maneira que fique na diluição do título do conjugado, ou seja, se o título é 1:150 devemos diluir primeiramente 1:30 em SST e depois 1:5 em CVS e CCN ficando então 1:150, diluindo os volumes mínimos necessários. Caso seja preciso (se não houver um bom bloqueio pelo CVS) podemos deixar o conjugado, após diluí-lo, uns 10 min. a 37º C.

Exemplo:

Se o trabalho é com um título final 1:150, para preencher 20 lâminas, sabendo que cada lâmina necessita de aproximadamente 0,03 mL por impressão, portanto:

0,03 mL x 20 lâminas = 0,6 ml de Sol. A **e 0,6 ml de Sol.** B

Parte 1	**Parte 2**
1:30	1:5
1+29	1+4
Conjugado +SST=Sol.**C**	Sol.**C** + CCN=Sol.**A**
0,008 mL + 0,232 mL=0,24mL	0,12mL + 0,48mL=0,60mL
	Sol.C + CVS=Sol.**B**
	0,12mL + 0,48mL=0,60mL

D.2. TITULAÇÃO

- Preparar lâminas dos controles positivo (vírus de rua VR*) e negativo (CCN), para cada diluição a ser testada;
- Identificar nas lâminas de VR e CCN a diluição a ser utilizada;
- Diluir o conjugado, conforme o recomendado pelo laboratório produtor, sendo duas diluições acima e duas abaixo do título recomendado; preparando diluições duplas do conjugado com CVS e CCN, separadamente;
- Prosseguir com o teste de IFD;
- Fazer a leitura das lâminas em microscópio de fluorescência (objetiva 20x, 40x e ocular de 10x)
- Determinar a diluição ideal, observando a presença de antígenos, sua intensidade de coloração e inexistência de coloração inespecífica, no campo com CCN+conjugado e total ausência de antígenos, no campo com CVS+conjugado. Esta diluição ideal corresponde ao título que deve ser utilizado no laboratório.

E. CRITÉRIOS PARA REPETIÇÃO DE TESTE

- Quando não houver reação na lâmina do controle positivo
- Sempre que houver dúvidas quanto ao resultado, a amostra deve ser submetida a um novo teste de IFD.

* Vírus de rua (VR) é dito daquele isolado a partir de casos naturais da doença (BRASIL, 2005c).

ANEXO B - Procedimentos da prova biológica (KOPROWSKY, 1996) utilizada no laboratório de diagnóstico de raiva da SEARB/IEC/MS/SVS.

- Separar um fragmento de tecido nervoso (aproximadamente 1g) com tesoura e pinça
- Colocar em um gral e macerar bem com o pistilo
- Acrescentar a solução diluente (que está em um tubo de ensaio mantido sob refrigeração (cuba com gelo), a fim de preparar uma suspensão a 20% de tecido nervoso (cérebro, cerebelo ou Corno de Amon) ou glândula salivar (morcego) em diluente[†]
- Centrifugar a 2.000 a 3.000 g por 15 minutos.
- Decantar para um tubo de ensaio rotulado
- Inocular ou guardar em freezer -20 C até a inoculação.
- Realizar a identificação das gaiolas no infectório com o auxílio de rótulos, mostrando o número de registro do material, a identificação do animal, o tipo de material a ser inoculado e o número da gaiola;
- Preparar cartões de leitura das amostras inoculadas;
- Realizar as inoculações em camundongos lactentes de 3 dias de vida, 0,02mL por camundongo, ou jovens (21 dias), 0,03mL;
- Utilizar 6 camundongos por amostra;
- Observar os camundongos inoculados e fazer anotações nos cartões de leitura, diariamente por um período de 21 dias para amostras provenientes de cães e gatos. No caso de amostras oriundas de herbívoros e animais silvestres a observação deve ser realizada por um período de 30 dias.

Obs.: Anotar nos cartões de leitura, os animais estragados, desaparecidos, doentes, moribundos, coletados.

[†] Solução de albumina bovina a 0,75% em Solução Salina Tamponada (SST) ou Soro de equino a 2% em água destilada com antibióticos (1.000 U de penicilina e 2 mg de estreptomicina por mL).

ANEXO C - Cópia da autorização da diretoria do IEC, para o processamento das amostras utilizadas neste trabalho.

MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

AUTORIZAÇÃO

Autorizamos a utilização das amostras de vírus da Raiva isoladas de encéfalos de humanos e animais pertencentes à Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas a fim de desenvolver a dissertação de mestrado intitulada "**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E GENÉTICA DE CEPAS DO VÍRUS DA RAIVA ISOLADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**" pela aula de pós-graduação **Livia Medeiros Neves Casseb**, sob a orientação do pesquisador Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos e co-orientação da Drª. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa.

Ananindeua, Pará, 20 de Agosto de 2007

ELISABETH C. DE OLIVEIRA SANTOS
Diretora da Instituto Evandro Chagas
Secretaria de Vigilância em Saúde / MS

AV. ALMIRANTE BARROSO, 492 – BAIRRO: MARCO – CEP:66090-000 – BELÉM-PA – CNPJ: 26.989.350/0489-09 FONE: (091) 242-6422 – FAX (091) 3214-2000
HTTP:// WWW.iec.pa.gov.br

ANEXO D - Cópia do parecer de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisas com Animais (CEPAN)/IEC/SVS/MS.

MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

Parecer de Aprovação Nº 0013/2008/CEPAN/IEC/SVS/MS

Registro CEPAN - Nº 0014/2008

Ananindeua/PA, 02 de setembro de 2008.

Projeto: "**Caracterização antigênica de cepas de vírus da raiva isoladas de encéfalos de carnívoros domésticos na Amazônia Brasileira.**

Pesquisador Responsável: PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, em sua reunião realizada no dia 27/08/2008, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado.**

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este CEPAN, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,

Nelson Antonio Bailão Ribeiro

NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO

Coordenador do CEPAN/IEC

AV. ALMIRANTE BARROSO, 492 – BAIRRO: MARCO – CEP: 66090-000 – BELÉM-PA – C.N.P.J.: 26.989.350/0489-09 FONE: (091) 246-6422 – FAX: (091)664669RODOVIA BR 316 – KM 07, SNº - BAIRRO - LEVILÂNDIA – CEP: 67.030-000 – ANANINDEUA-PA – FONE: (091) 214-2000
http://www.iec.pa.gov.br

ANEXO E - Modelo de protocolo para testes de IFI (utilizado no laboratório de diagnóstico de raiva da SEARB/IEC/MS/SVS)

Data:____/____/_____

TIPIFICAÇÃO ANTIGÊNICA DE ISOLAMENTOS DE VÍRUS DA RAIVA PELA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos monoclonais

Identificação	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	Resultado
Reg: Nome: Gaiola/Cam.: Dia de coleta/Data:									
Reg: Nome: Gaiola/Cam.: Dia de coleta/Data:									
Reg: Nome: Gaiola/Cam.: Dia de coleta/Data:									
Reg: Nome: Gaiola/Cam.: Dia de coleta/Data:									
CVS									

Procedimento da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)

1. Anticorpos monoclonais anti-rábicos CDC diluídos a 1:3.000 em SST pH 7,4-7,6 e incubados a 37° por 30 minutos em câmara úmida;
2. Conjugado anti-mouse. Lote:_____. Diluição: _____, incubado a 37° por 30 minutos em câmara úmida;
3. Montagem com glicerina tamponada.

Teste realizado por: _____

Observações:

ANEXO F - Soluções e reagentes utilizados nas técnicas de diagnóstico, utilizados no laboratório de diagnóstico de raiva da SEARB/IEC/MS/SVS

A SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA COM FOSFATOS (SST) pH 7.4

- É utilizado 51g de cloreto de sódio (NaCl), 8,72g de fosfato dipotássico (K_2HPO_4), 1,36g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e 6000mL de água destilada qsp[‡].
- Os sais são colocados na proveta e adicionados aproximadamente 2000mL de água destilada para diluir os sais. Após essa etapa, a mistura é colocada em um erlenmeyer, onde são acrescentados mais 4000mL de água destilada.
- Continuamos a homogeneização, a fim de estabilizar o pH da solução, onde em seguida, faremos a medição do pH com o auxílio de um medidor de pH. Para posteriormente ser armazenado em geladeira a 4°C.

B GLICERINA TAMPONADA

- É preparada uma primeira solução (solução A) a 0,85% com 200mL de água destilada e 1,7g de Cloreto de Sódio (NaCl), que será o diluente para as soluções seguintes. Reservamos.
- Em seguida preparamos uma solução M/15 de Fosfato Dipotássico (K_2HPO_4) em solução de cloreto de sódio 0,85% (solução A), denominada de solução B, utilizando a seguinte fórmula:

PA.: 78+1+31+64=174g → Soma dos Pesos Moleculares

174g----1000mL----1M

Xg----1000mL----1/15M

[‡] q.s.p.: quantidade suficiente para

Xg= (174x1/15)/1=11,6g

M/15= 11,6g----1000mL

Xg----100mL= **1,16g**

- Homogeneizar 1,16g de Fosfato Monopotássico em 100mL da solução A;
- Em seguida preparamos uma solução M/15 de Fosfato Monopotássico (KH_2PO_4) em solução de cloreto de sódio 0,85% (solução A), denominada de solução C, utilizando a seguinte fórmula:

PA.: 39+2+31+64=136g → Soma dos Pesos Moleculares

136g----1000mL----1M

Xg----1000mL----1/15M

Xg= (136x1/15)/1=9,06g

M/15= 9,06g----1000mL

Xg----100mL= **0,906g**

- Homogeneizamos 0,906g de Fosfato Dipotássico em 100mL de solução de Cloreto de Sódio;
- Preparamos uma solução SST pH 8,5 misturando as soluções B e C na proporção de 100B:1C, medimos o pH;
- Misturamos uma parte de SST pH 8,5 em nove partes de glicerina neutra P.A., ou seja, 90 mL de glicerina neutra em 10mL de SST;
- Homogeneizamos e deixamos repousando até que as bolhas se separem. Por último medimos o pH.

C SOLUÇÃO DE ALBUMINA BOVINA A 0,75% EM SST

- Preparar uma solução de Fosfato Monopotássico (KH_2PO4) com;

KH_2PO4----------2g

Água desmineralizada---------100mL

- Preparar uma solução de Fosfato Dissódico ($Na_2HPO_4.7H_2O$) com;

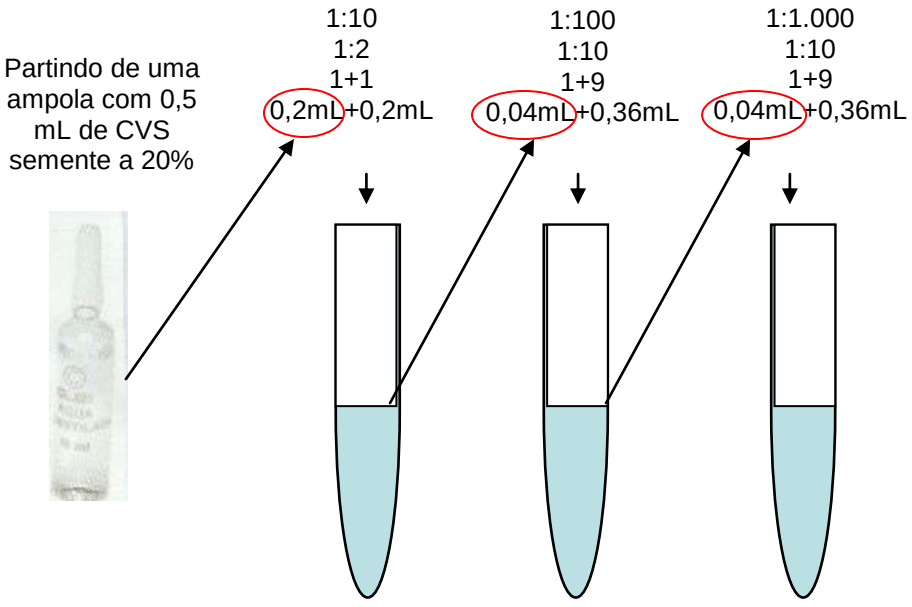
  $Na_2HPO_4.7H_2O$----------25.667g

  H_2O desmineralizada----------100mL

- Adicionar 10mL de cada uma das soluções acima descritas em 980mL de água desmineralizada, contendo 7g de Cloreto de Sódio (NaCl);
- Dissolve-se 7,5g de albumina bovina nesta solução tamponada;
- Filtra-se esta solução,e verifica-se o pH que deve estar ente 6.8 -7.0;
- Acrescentar 2mg de estreptomicina/mL da solução;
- Acrescentar 1.000 U de penicilina/mL da solução.

D SUSPENSÃO DE “CHALLENGE VIRUS STANDARD” (CVS)

- Preparar uma diluição que contenha 1000 DL50/mL do vírus-semente em tubos de ensaio obedecendo aos seguintes passos:



Obs: O primeiro volume de cada diluição corresponde ao volume de CVS da diluição anterior e o segundo volume corresponde ao diluente (solução de albumina bovina 0,75%)

- Inocular 0,02 mL, via intracerebral da diluição 10^{-3}, em camundongos lactentes de 3 dias
- Coletar os camundongos, quando a maioria deles estiver em fase final de paralisia (5 a 6 dias).
- Sedar os camundongos com éter sulfúrico, sangrar e coletar o sistema nervoso central, mantendo os encéfalos sob refrigeração.
- Pesar os encéfalos em balança de precisão analítica, macerar em gral com pistilo;
- Preparar uma suspensão a 20% com o diluente (solução de albumina bovina a 0,75%);
- Centrifugar, em condições de refrigeração, a 2.500 g, durante 10 minutos;
- Decantar o sobrenadante e preparar alíquotas de 2 mL cada, em tubos Cryovial Sterile PK100® com capacidade para 5 mL identificados;
- Armazenar em freezer a –70^{o}C.

OBS: O título do CVS produzido não deverá ser inferior a $10^{5,0}$ DL_{50} / 0,03 mL , lembrando que o título de um $10^{5,0}$ DL_{50} / 0,03 mL significa que nesta diluição (1:100 000) temos 1 $DL_{50.}$

D.1 Titulação do CVS ("trabalho")

Todo lote de CVS trabalho produzido deverá ser titulado, para verificar a viabilidade do produto.

Exemplo:

- A partir da suspensão 1:5 (20%) do lote de CVS trabalho produzido, fazer uma diluição 1:2, e depois diluições sucessivas de 1:10;

- Inocular 10 camundongos recém-nascidos por diluição, a partir da diluição 10^{-5} a 10^{-8};

- Observar os animais inoculados por 15 dias, anotando o número de animais mortos;

- Calcular o título do vírus através do método de Reed e Muench (1938).

E SUSPENSÃO DE CÉREBROS DE CAMUNDONGOS NORMAIS (CCN)

- Coletar os camundongos sadios.
- Sedar os camundongos com éter sulfúrico, sangrar e retirar o sistema nervoso central, mantendo os encéfalos sob refrigeração.
- Pesar os encéfalos em balança de precisão analítica, macerar em gral com pistilo;
- Preparar uma suspensão a 20% com o diluente (solução de albumina bovina a 0,75%);
- Centrifugar, em condições de refrigeração, a 2.500 g, durante 10 minutos;
- Decantar o sobrenadante e preparar alíquotas de 2 mL cada, em tubos Cryovial Sterile PK100® com capacidade para 5 mL identificados;
- Armazenar em freezer a –70^{o}C.
- Preparar uma suspensão a 20% com o diluente de vírus.
- Centrifugar, em condições de refrigeração, a 2.500 g, durante 10 minutos.
- Decantar o sobrenadante e preparar alíquotas de 2 mL cada, em tubos Cryovial Sterile PK100® com capacidade para 5 mL identificados;
- Armazenar em freezer a –70^{o}C.