



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO *Vírus da raiva*  
(*Lyssavirus*; *Rhabdoviridae*) ISOLADAS NO ESTADO DO PARÁ

TACIANA FERNANDES SOUZA BARBOSA

Belém-Pará  
2007

TACIANA FERNANDES SOUZA BARBOSA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO *Vírus da raiva*  
(*Lyssavirus*; *Rhabdoviridae*) ISOLADAS NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como Requisito para a Obtenção do Grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Belém-Pará  
2007

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

---

Barbosa, Taciana Fernandes Souza

Caracterização molecular de cepas do vírus da raiva (*Lyssavirus*; *Rhabdoviridae*) isoladas no estado do Pará / Taciana Fernandes Souza Barbosa ; orientador, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos. – 2007.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém, 2007.

1. Vírus da hidrofobia. 2. Hidrofobia - Epidemiologia - Pará. I. Título.

CDD – 20. ed. 576.6484

---

TACIANA FERNANDES SOUZA BARBOSA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO *Vírus da raiva*  
(*Lyssavirus*; *Rhabdoviridae*) ISOLADAS NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos  
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do  
Instituto Evandro Chagas

Banca Examinadora: Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes  
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do  
IEC

Prof. Dr. Ricardo Ishak  
Departamento de Virologia – CCB/UFPa

Prof. Dr. Manoel Barbosa de Rezende  
Universidade Federal do Pará - UFPa

Suplente: Antonio Carlos Rosário Vallinoto  
Departamento de Virologia – CCB/UFPa

Belém, 26 de Outubro de 2007.

## EPÍGRAFE

*“...que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor !”*

**Chico Xavier**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação com muito amor e carinho às três pessoas mais importantes da minha vida, que estiveram presentes nos momentos mais especiais e cruciais: meus pais José Fernandes e Maria do Carmo e meu marido Fabiano.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, senhor todo poderoso de infinita bondade e misericórdia. Agradeço a todas as dificuldades enfrentadas na realização deste trabalho, por que com sua graça as superei, e com a fé que tenho em ti Pai, hei de superar outras.

Aos meus amados e queridos pais, José Fernandes Barbosa e Maria do Carmo Souza Barbosa, por dedicarem uma vida inteira a mim, a fim de me conduzir em um caminho correto e de bem, baseado nos ensinamentos de Cristo. As intermináveis orações de minha querida mãe dedicada ao meu bem, e aos zelos incessantes de meu querido pai. As broncas nos momentos de rebeldia e as longas conversas a fim de me orientar. Agradeço a mulher que me tornei e as minhas conquistas, pois estas não teriam o verdadeiro valor sem vocês a meu lado e sem seus ensinamentos.

Ao meu esposo e grande amigo Fabiano dos Santos Coelho, por agüentar meu mau humor e por também agüentar as sucessivas vezes que descontei nele os meus “estresses”, e permanecer sempre a meu lado.

Ao meu orientador Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, agradeço todo apoio e a oportunidade de aprendizado e crescimento profissional, e por acreditar em minha capacidade e por contribuir com meu trabalho no Instituto Evandro Chagas.

À minha mestra Dra. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa, que tanto contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço de todo coração pela dedicação ao me ensinar e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço também a dedicação fraternal demonstrada em nossas conversas e por desejar a minha melhora moral e profissional. Muito obrigada.

Ao meu grande amigo, Armando de Sousa Pereira por ter me ensinado o dia-a-dia do laboratório, obrigado pelos quase dez anos de dedicação a meu aprendizado. Agradeço as conversas, conselhos e broncas, por ter me acolhido em sua vida e compartilhado grandes momentos de minha vida.

À amiga e companheira de trabalho Livia Medeiros Neves Casseb pelo apoio moral e profissional, e pelas diversas vezes que segurou sozinha a rotina do laboratório para eu poder prosseguir este trabalho.

Às grandes amigas que Deus colocou em minha vida, Daniele Barbosa de Almeida Medeiros e Jannifer Chiang, pela ajuda profissional e espiritual que dedicaram a mim.

À minha amiga Helena Baldez Vasconcelos, pelas dicas de Biologia Molecular, que Deus a ilumine e proteja sempre em sua longa e vitoriosa jornada, bem como aos seus familiares.

Ao Samir Mansour Moraes Casseb, que demonstrou ser um grande amigo, que Deus lhe recompense em muitas alegrias e sucesso, em seu caminho.

Jamais poderia deixar de agradecer às amigas Valéria Carvalho, Ana Cecília Cruz, Eliana Pinto, Creuza Carvalho, Ercília Gonçalves e Livia Martins, pelas inúmeras conversas e por diversas vezes não me deixarem cair no desânimo das dificuldades.

Ao grande amigo e também orientador, Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes por ter disponibilizado preciosas horas de seu trabalho para me ensinar às técnicas moleculares utilizadas na execução deste trabalho.

Aos demais amigos da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Sueli Rodrigues, Adriana Carneiro, Darlene Simith e Conceição Vieira, grandes contribuidoras de minha vida profissional.

Às eternas amigas Ingrid Oliveira, Bianca Vasconcelos e Josyanne Conceição, de extrema importância em minha caminhada.

Agradeço àquelas a quem Deus chamou, minha avó querida Maria Albertina Souza e à amada amiga Maíra Conceição, que mesmo em outro plano, continuam auxiliando minha jornada, até quando o Pai permitir.

À UFPA, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos, e aos meus professores que com suas aulas transmitiram o conhecimento para a concretização deste trabalho.

Ao Instituto Evandro Chagas por me receber para estagiar, e até os dias atuais com a realização deste estudo, e espero, que viabilize os muitos outros. Que com eles, eu possa divulgar o trabalho em benefício da sociedade, realizado por esta instituição.

Aos demais funcionários deste Instituto e a todos que contribuíram para o meu êxito profissional e pessoal.

Meu muitíssimo obrigada.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	11
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	14
<b>RESUMO</b>	17
<b>ABSTRACT</b>	18
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1. RAIVA: BREVE HISTÓRICO.....	19
1.2. O VÍRUS DA RAIVA.....	21
1.3. PATOGENIA DA RAIVA.....	23
1.4. CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA E RELACIONAMENTO ANTIGÊNICO.....	26
1.5. EPIDEMIOLOGIA.....	31
<b>1.5.1. Ciclo de Transmissão</b> .....	31
<b>1.5.2. Distribuição Geográfica</b> .....	33
<b>1.5.3. Hospedeiros</b> .....	38
1.6. INFECÇÃO EM HUMANOS E ANIMAIS: ASPECTOS CLÍNICOS.....	41
1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	43
1.8. GENOMA VIRAL.....	45
1.8.1. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	45
1.9. EMPREGO DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE VÍRUS RÁBICO ISOLADAS.....	47
1.10. OBJETIVOS.....	49
<b>1.10.1. Geral</b> .....	49

<b>1.10.2. Específico</b> .....	49
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
2.1. AMOSTRAS.....	50
2.2. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD).....	51
2.3. PROVA BIOLÓGICA (PB).....	53
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
2.5. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEICO PELO MÉTODO DO REAGENTE TRIZOL LS.....	55
2.6. TRANSCRIÇÃO REVERSA REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (RT-PCR).....	56
2.6.1. Iniciadores Específicos.....	56
2.6.2. RT-PCR em dois passos.....	57
2.7. VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DA RT-PCR.....	59
2.8. PURIFICAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA).....	60
2.9. SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	61
2.10. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	63
<b>3. RESULTADOS</b> .....	64
3.1. EPIDEMIOLOGIA DA RAIVA NO ESTADO DO PARÁ NO PERÍODO DE 2000 A 2005.....	64
3.2. DETECÇÃO DO GENOMA E DETECÇÃO ANTIGÊNICA.....	68
3.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA RELACIONADA ÀS VARIANTES ANTIGÊNICAS.....	72
3.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA RELACIONADA À DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	75

<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ilustração esquemática do VR mostrando glicoproteínas de superfície que envolve o complexo RNP .....22
- Figura 2** - Esquema ilustrativo da recepção, entrada, transcrição, tradução, replicação e saída de partículas virais.....24
- Figura 3** - Esquema do ciclo epidemiológico da raiva.....32
- Figura 4** - Ilustração da distribuição geográfica da raiva.....34
- Figura 5** - Mapa ilustrando as áreas com circulação do Vírus da raiva no estado do Pará até o ano de 2005.....36
- Figura 6** - Distribuição geográfica dos mamíferos transmissores da raiva.....39
- Figura 7** - Esquema ilustrativo do genoma do *Vírus da raiva*.....45

<b>Figura 8</b> – Figura ilustrando as mesoregiões paraenses.....	47
<b>Figura 9</b> – Esquema da técnica de IFD. (A) Antígenos ligados ao anticorpo marcado e impressões de cérebro com antígenos livres. (B) Antiorpos livres e posterior ligação dos mesmos aos antígenos da impressão de tecido nervoso.....	52
<b>Figura 10</b> - Camundongos albinos suíços recém-nascidos utilizados para as tentativas de isolamento do VR. (I) Família de camundongos mantidos em gaiolas. (II) Inoculação da suspensão viral via i.c.....	54
<b>Figura 11</b> - Total de casos positivos para raiva e distribuídos por espécie no período de 2000 a 2003.....	65
<b>Figura 12</b> - Total de casos positivos para raiva e distribuídos por espécie no período de 2004 a 2005.....	67
<b>Figura 13</b> - Casos de raiva humanos e animais ocorridos no Estado do Pará entre os anos de 2000 a 2005, sendo valor de (p) para VAg2 0,0037 a para VAg3 0,0265.....	68

**Figura 14** - Análise filogenética das seqüências nucleotídicas parciais do gene N do *Vírus da raiva* isolados no estado do Pará entre 2000 a 2005. Cor verde representa amostras relacionadas a variante antigênica 3 (VAg3) e cor amarela amostras relacionadas a variante antigênica 2 (VAg2).....71

**Figura 15** - Análise filogenética das seqüências nucleotídicas parciais do gene N do *Vírus da raiva* isolados no estado do Pará entre 2000 a 2005. As análises Bayesianas e de MV foram empregadas para a construção da árvore. Valores Bayesianos e de bootstrap para o método de MV (no interior de parênteses) encontram-se acima do nó de cada grupo principal. O comprimento total da barra corresponde a 10% (0,10) de divergência nucleotídica com escala de divergência fixada para 2% (0,02).....71

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{M}$  – micromolar

A – adenina

a.C. – antes de Cristo

aa – aminoácidos

ABLV – *Australian bat lyssavirus*

AcM – anticorpos monocloais

AIC – Akaike

ARAV – *Vírus aravan*

C – citosina

CCN – cérebro de camundongo normal

CDC – Centro para Controle e Prevenção de Doenças

cDNA – DNA complementar

CVS – *Challenger Virus Standard*

Da – dáltons

ddATP – dideoxynucleotídeo adenosina trifosfato

ddCTP - dideoxynucleotídeo citosina trifosfato

ddGTP - dideoxynucleotídeo guanidina trifosfato

ddTTP – dinucleotídeo timidina trifosfato

dNTP – dinucleotídeos trifosfato

DUVV – *Vírus duvenhage*

EBLV-1 – *European bat lyssavirus tipo-1*

EBLV-2 - *European bat lyssavirus* tipo-2

EDTA – etilenodiamino ácido tetra acético

Gp – glicoproteínas

G – guanina

i.c. – intracerebral

IFD – imunofluorescência direta

IRKV – *Vírus irkut*

KHUV – *Vírus khujand*

L - RNA-polimerase

LBV – *Vírus lagos bat*

LCR – líquido céfalo raquidiano

M – proteína matriz

mA – miliamper

MCMC – Markov Chain Monte Carlo

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mm – micrômetros

mM – milimolar

MOKV – *Vírus mokola*

MP – Máxima parcimônia

MV – Máxima verossimilhança

N – nucleoproteína

NaCl – cloreto de sódio

Ng – nanogramas

NJ – *Neighbor Joining*

nm – nanômetros

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

P – fosfoproteína

p.i. – período de incubação

pb – pares de bases

PB – prova biológica

PM – peso molecular

r.p.m – rotações por minuto

RNP – ribonucleocapsídio helicoidal

RT-PCR – Transcrição Reversa-Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase

SESPA – Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará

SNC – sistema nervoso central

SST – solução salina tamponada

T – timina

TA – temperatura ambiente

TE – tris EDTA

Tris-HCL – tris ácido clorídrico

V – volts

VAg – variantes antigênicas

VR – *Vírus da raiva*

WCBV – *Vírus west caucasian bat*

Ψ – pseudogenes

## RESUMO

A raiva é uma das zoonoses mais antigas e temidas pelo homem devido a seu desfecho fatal. Os cães ainda são considerados os principais responsáveis pela manutenção e transmissão da raiva para o homem. Porém, nos últimos anos os morcegos hematófagos têm ganhado destaque como potenciais transmissores de raiva para animais e humanos nas Américas. Recentemente, várias epidemias de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos foram relatados no estado do Pará, o que mostra uma grande alteração no ambiente natural destes animais. A amplificação parcial do gene N pela técnica de RT-PCR foi aplicada em 62 amostras positivas para o *Vírus da raiva*, pela imunofluorescência direta e prova biológica. As seqüências nucleotídicas obtidas foram comparadas entre si e com outras amostras de vírus rábico isoladas no Brasil, utilizando os métodos de análise filogenética máxima verossimilhança e Bayesiano. Estas análises permitiram traçar o perfil epidemiológico molecular das variantes virais circulantes no estado do Pará, observando a emergência da transmissão de casos associados à variante antigênica 3 (VAg3), comumente encontrada em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* em detrimento dos casos relacionados à variante antigênica 2 (VAg2) associada a cães domésticos, bem como a identificação de três linhagens genéticas relacionadas a VAg3 e uma relacionada a VAg2 e uma possível nova variante isolada de morcego frugívoro *Uroderma bilobatum*.

**Palavras chave:** Vírus da Raiva. Caracterização Molecular

## ABSTRACT

Rabies is the oldest zoonosis that has an important impact in public health due its high mortality. The dogs are main responsible for the rabies maintenance cycle and transmission for the humans, however, in the last years, the hematophagous bats have been winning prominence as potential transmitters of rabies for vertebrate animals and humans in the American continent. Recently, several outbreaks of human rabies transmitted by hematophagous bats were notified in the Para State showing an increased alteration of the natural environment of those animals. Partial amplification of gene N by RT-PCR technique of 62 positives samples for rabies virus diagnosed by direct fluorescence assay and viral isolation from different cities of Para State was performed. Nucleotide sequences were obtained and compared among themselves and with other rabies virus strains isolated in Brazil, using maximum likelihood and Bayesian method. The phylogenetic analysis furnished the molecular epidemiologic profile of rabies virus variants found in Para State, in which was observed the emergence of cases associated to the antigenic variant 3 (AgV3) that is commonly found in the vampire bats *Desmodus rotundus* and low member of cases related to the antigenic variant 2 associated to domestic dogs, as well as it was recognized three different genetic lineages of AgV3, one lineage of AgV2 and a possible new rabies virus variant isolated from a frugivorous bat *Uroderma bilobatum*.

**Key words:** Rabies Virus. Molecular Characterization

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. RAIVA: BREVE HISTÓRICO

A raiva é uma doença conhecida em animais e humanos desde a antiguidade, sendo atribuída nesta época à fenômenos sobrenaturais. As primeiras referências conhecidas da doença datam do século X antes de Cristo (a. C). A raiva em cães e animais domésticos foi descrita por Demócrito há cerca de 500 anos a.c. e Aristóteles 322 anos a.c., que demonstraram que, cães sadios mordidos por um cão raivoso ficavam “loucos”, além da possível transmissão da “raiva de animais furiosos” para o ser humano, fazendo referência ao termo “Lyssa”, o que significa raiva em grego. (Schneider & Santos-Burgoa, 1994; Hinrichsen *et al.*, 2005; Rezende *et al.*, 1997; Costa, 1998).

Galeno no ano 200 a.c., recomendava a remoção cirúrgica das lesões causadas pelas mordeduras de cães raivosos, como forma de prevenir o desenvolvimento da doença. Coube, no entanto ao médico romano Cornélio Celsus, no ano 100 a.c., talvez a primeira descrição precisa da doença, denominando-a de hidrofobia, bem como vincular a transmissão entre cães e seres humanos. Zinke, no ano de 1804, demonstrou a transmissão da raiva por meio da saliva (Corrêa & Corrêa, 1992; Costa, 1998; Hinrichsen *et al.*, 2005; Rezende, *et al.*, 1997; Gonçalves, J. L. S, *et al.*, 2002).

Deve-se ao eminente cientista Louis Pasteur e seus colaboradores Roux, Chamberland e Thuillier o crédito das descobertas da

vacina anti-rábica. No ano de 1881, Pasteur e sua equipe descobriram que o sistema nervoso central é o principal local de replicação do vírus (Corrêa & Corrêa, 1992; Costa, 1998). Foi Roux quem observou a redução gradativa da virulência do *Vírus da raiva* (VR) na medula espinhal de animais infectados até a ausência total após 15 dias, quando a medula era exposta ao ar seco para ser desidratada. Especificamente a técnica consistia em conservar a medula em um recipiente com potassa cáustica, para prevenir a putrefação, permitindo a entrada de oxigênio para atenuar a virulência (Costa, 1998).

Desta observação Pasteur desenvolveu o método prático da vacinação. Injeções subcutâneas de suspensão de fragmentos de medula espinhal infectada, secos por tempo suficiente para perderem a virulência, foram aplicadas sucessivamente em cães que se tornavam resistentes. Assim 50 animais foram protegidos por esse método (Costa, 1998).

O tratamento preventivo da raiva para humanos, empregado pela primeira vez por Pasteur, constituiu um dos primeiros processos de imunização registrada na história da medicina. O esquema foi realizado em sete de julho de 1885, em Joseph Meister, um garoto de nove anos de idade, que havia sido agredido 14 vezes por um cão raivoso nas mãos, pernas e coxas, caso considerado de extrema gravidade (Azevedo, 1981; Costa, 1998).

Pasteur fez a inoculação subcutânea da suspensão de medula espinhal de coelhos raivosos mantida em ar seco. O paciente recebeu 12 inoculações sucessivas diárias de medula cada vez menos atenuada e, por último, uma inoculação de medula espinhal totalmente virulenta, removida de coelho um dia antes. O paciente sobreviveu e, anos depois, trabalhou como

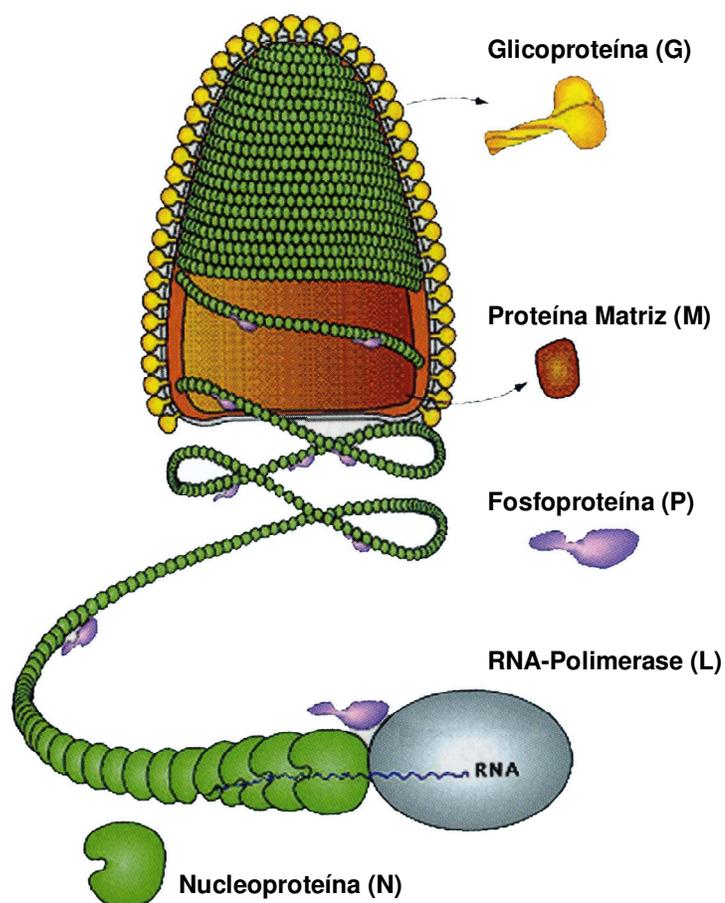
porteiro do Instituto Pasteur, em Paris (Lemos & Souza, 1990; Rezende, 1997; Costa, 1998).

Em 1903, a natureza viral do agente foi sugerida por Remlinger ao demonstrar sua filtrabilidade, e em seguida, Negri (1903) descreveu a lesão patognomônica causada pelo VR no Sistema Nervoso Central (SNC), os corpúsculos de Negri, que são inclusões intracitoplasmáticas nos neurônios de animais e humanos infectados (Rezende *et al.*, 1997).

## 1.2.O VÍRUS DA RAIVA

O VR pertence à ordem *Mononegvirales* e família *Rhabdoviridae*, sendo o membro protótipo do gênero *Lyssavirus* (Dietzschold *et al.*, 1996; Wagner & Rose 1996; Wu *et al.*, 2002; Fauquet *et al.*, 2005; Finke & Conzelmann, 2005). Morfologicamente a partícula do VR apresenta-se sob a forma cilíndrica semelhante a um projétil, com uma extremidade arredondada e outra mais plana, podendo ser dividido em duas unidades estruturais: um cilindro central e denso formado pelo ribonucleocapsídeo (RNP) helicoidal, no qual é encontrado o material genético, e um envelope de natureza lipoprotéica, onde estão inseridas as Glicoproteínas (G) que interagem com o nucleocapsídeo via proteína Matriz (M). As espículas glicoproteicas formam um trímero na superfície do vírion, de aproximadamente 5 a 10 nanômetros (nm) de comprimento e 3 nm de diâmetro, com separações de 5 nm umas das

outras (Figura 1) (Tordo, 1996; Gonçalves, J. L. S, *et al.*, 2002; Woldehiwet, 2002; Guyatt *et al.*, 2003; Fauquet *et al.*, 2005).



**Figura 1** - Ilustração esquemática do VR mostrando glicoproteínas de superfície que envolvem o complexo RNP.

Fonte: Adaptado de Fauquet *et al.*, 2005.

O nucleocapsídeo dos rabdovírus apresenta simetria helicoidal e pode ser visualizado com estriações em formato de cruz. Consiste em um complexo RNA-Nucleoproteína (N), sendo este ácido nucléico de polaridade

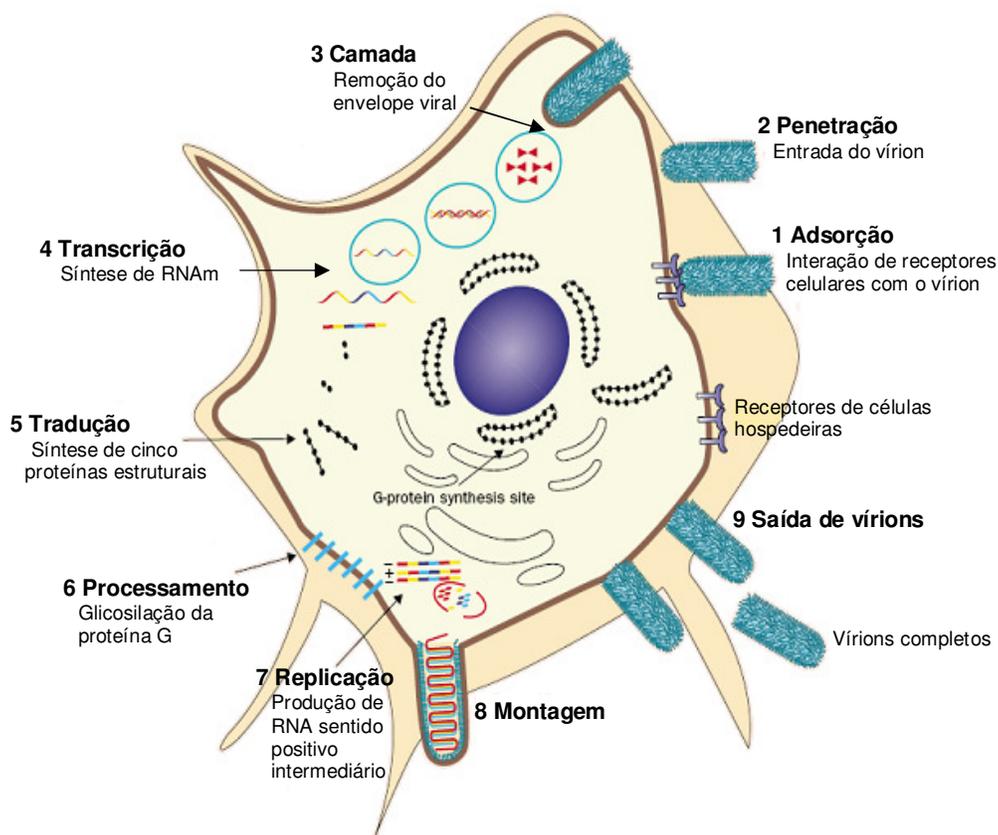
negativa, fita única e não segmentado, e que se encontra agregado às proteínas RNA-polimerase (L) e Fosfoproteína (P). O nucleocapsídeo possui atividade de transcriptase e é de natureza infecciosa. Seu tamanho é de 180 nm de comprimento e 75 nm de diâmetro. Sendo o filamento desenrolado de aproximadamente 700 nm de comprimento e 20 nm de diâmetro (Tordo, 1996; Fauquet *et al.*, 2005; Finke & Conzelmann, 2005).

### 1.3. PATOGENIA DA RAIVA

A raiva é uma doença infecciosa aguda, causada por um vírus que compromete o SNC e caracterizada por um quadro de encefalite. É considerada uma zoonose, por ter como hospedeiros, reservatórios e transmissores, os animais domésticos ou selvagens que, dependendo do ciclo biológico, transmitem a doença aos seres humanos, através de soluções de continuidade produzidas por mordedura ou arranhadura (Hinrichsen *et al.*, 2005; Takaoka, 2003).

O ferimento causado pela mordida de um animal raivoso, e a deposição de saliva infectada com o VR, no interior de músculos estriados e tecidos adjacentes, constitui a principal porta de entrada do vírus no organismo do hospedeiro (Gonçalves, J. L. S, *et al.*, 2002). Após a introdução do vírus ocorre o desencadeamento de uma série de eventos ao nível celular tais como: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem e brotamento virais (Figura 2) (Wagner & Rose, 1996; Rupprecht *et al.*, 2002).

Após a ligação do vírion à célula do hospedeiro, este é envolvido pela célula por endocitose. Segue-se à liberação do genoma viral no citoplasma por fusão mediada pela glicoproteína, o que implica pequenas mudanças conformacionais na mesma (Gaudin *et al.*, 1999; Badrane & Tordo, 2001; Poisson *et al.*, 2001). O primeiro evento após a entrada da célula é a transcrição dos seus genes, produzindo cinco RNAm monocistrônicos, seguido da síntese de seu genoma complementar de fita positiva (5'-3') (Badrane *et al.*, 2001; Poisson *et al.*, 2001).



**Figura 2** - Esquema ilustrativo da recepção, entrada, transcrição, tradução, replicação e saída de partículas virais. Fonte: Adaptado de Rupprecht, 2002.

Após a penetração no hospedeiro, o vírus permanece localizado nas células musculares por períodos que podem variar de dias a meses. No local da agressão, ao nível das camadas musculares, ocorre uma intensa replicação viral, com o transporte dos mesmos por nervos periféricos em direção ao SNC. A infecção neuronal é centrípeta, ocorrendo de forma passiva a uma razão de 50 a 100 mm por dia. Uma vez atingido o SNC, outra replicação ocorre, esta, porém, envolvendo todo o sistema. A partir de então ocorre uma expansão centrífuga do vírus pelos nervos até outros órgãos incluindo glândulas salivares, fígado, rins e coração. Apesar da intensa replicação viral não são observadas mudanças patológicas significativas no cérebro com exceção da presença dos corpúsculos de Negri (Charlton *et al.*, 1983; Germano, 1994; Licata & Harty, 2003).

Segundo Fekadu & Shaddock (1984) a capacidade de disseminação do vírus rábico para os diferentes tecidos parece estar relacionada, principalmente com a cepa viral e o grau de suscetibilidade do hospedeiro. Posteriormente, Germano *et al.* (1988), confirmou esta informação quando então avaliaram, três cepas antigenicamente distintas, encontrando diferentes graus de disseminação que variou entre as mesmas, não havendo, todavia, interferência da idade dos animais utilizados no estudo.

Existem dois tipos gerais de VR denominados de vírus de rua e vírus fixo. O vírus de rua provém de um hospedeiro naturalmente infectado com mínima ou nenhuma adaptação em animais de experimentação ou cultura de células. Os vírus denominados fixos foram adaptados através de passagens sucessivas em cérebros de animais de laboratório e/ou cultura de células,

recebendo essa denominação porque, teoricamente, o período de incubação e o comportamento do vírus se tornaram relativamente semelhantes ou fixos, diferentemente do vírus de rua, para qual o período de incubação e o comportamento viral, são variáveis (Wunner & Dietzschold, 1987; Gonçalves, J. L. S, *et al.*, 2002).

#### 1.4. CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA E RELACIONAMENTO ANTIGÊNICO

Com o advento de técnicas moleculares, foram realizados numerosos estudos baseados em comparações na seqüência nucleotídica dos genes N e G, e de pseudogenes ( $\Psi$ ) de numerosos isolamentos de *Lyssavirus*. Tais estudos permitiram a identificação de sete diferentes genótipos (GT) denominados GT1 a GT7 (Whitby *et al.*, 1997; Kelly & Strick, 2000; Badrane *et al.*, 2001; Woldehiwet, 2002; Guyatt *et al.*, 2003; Finke & Conzelmann, 2005), quais sejam: *Vírus da raiva* Clássico (VR, GT<sub>1</sub>), distribuído mundialmente entre mamíferos terrestres, e diversas espécies de morcegos hematófagos e não hematófagos; *Virus Lagos bat* (LBV, GT<sub>2</sub>) principalmente encontrado entre morcegos frugívoros, foi primeiramente isolado na Nigéria em 1956 (Boulger & Porterfield, 1958); *Virus Mokola* (MOKV, GT<sub>3</sub>) isolado em 1968 na Nigéria e encontrado em morcegos insetívoros e algumas espécies de roedores (Shope *et al.*, 1970); *Virus Duvenhage* (DUVV, GT<sub>4</sub>) também encontrado entre morcegos insetívoros, foi isolado de um humano que morreu após ser agredido por morcego no ano de 1970, na África do Sul (Meredith *et al.*, 1971); *European*

*bat lyssavirus* tipo 1 (EBLV-1, GT<sub>5</sub>), isolado em vários países europeus desde 1950, tendo o morcego insetívoro da espécie *Eptesicus serotinus* como hospedeiro primário para este genótipo (Kuzmin *et al.*, 2005; Amengual *et al.*, 1997); *European bat lyssavirus* tipo 2 (EBLV-2, GT<sub>6</sub>), principalmente encontrado em morcegos insetívoros da espécie *Myotis dasycneme* e que foi originalmente isolado na Finlândia (Lumio *et al.*, 1986); e *Australian bat lyssavirus* (ABLV, GT<sub>7</sub>), foi descoberto em 1996, e isolado inicialmente de morcegos *Pteropus sp* e de dois humanos, sendo posteriormente identificado em cinco diferentes espécies de morcegos, com pelo menos duas linhagens separadas originadas de morcegos frugívoros e insetívoros (Gould *et al.*, 2002 ; Guyatt *et al.*, 2003). Atualmente os sete genótipos encontram-se segregados em: filogrupo I onde estão incluídos os genótipos 1, 4, 5, 6 e 7; e filogrupo II que contém os genótipos 2 e 3 (WHO, 2005).

Logo após a descoberta do LBV e MOKV, a África foi considerada como o provável lugar de origem do gênero *Lyssavirus*, e a ordem *Chiroptera* foi considerada como a primeira afetada na rota de adaptação de rhabdovírus de artrópodes e plantas, para os mamíferos (Shope, 1982). E desde que foi demonstrada a relação do EBLV-1 com o DUVV, foi sugerida a hipótese de um possível deslocamento do vírus da África para a Europa (Amengual *et al.*, 1997; Serra-Cobo *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Bourhy *et al* (1993) demonstrou que a relação filogenética é maior entre o EBV1 e o DUVV do que entre o EBV1 e o EBV2, assim como há maior similaridade genética do EBV2 com o VR.

De acordo com Guyatt *et al.* (2003), é preciso ter cautela na definição se o ABLV é uma variante australiana do VR ou uma espécie de *lyssavírus* distinta. Testes sorológicos indicaram que o ABLV e o VR clássico são antigenicamente similares, e análises filogenéticas preliminares das seqüências nucleotídicas dos genes N, P, M e G do ABLV com outros *lyssavírus* sugeriram que, embora ocorra essa similaridade, o ABLV é suficientemente diferente ao nível nucleotídico, dos demais *lyssavírus*, formando um genótipo diferente.

Recentemente foram isolados quatro outros *lyssavirus* em morcegos na Ásia Central, Leste da Sibéria e região Caucásiana, que ainda precisam ser caracterizados como novos genótipos, são eles: *Vírus Aravan* (ARAV), *Vírus Khujand* (KHUV), *Vírus Irkut* (IRKV) e *Vírus West Caucasian bat* (WCBV) (kuzmin *et al.*, 2005; WHO, 2005).

Tordo *et al.* (2003), ressaltam o fato de que os quirópteros são possíveis transmissores de todos os genótipos, com exceção do GT<sub>3</sub> (MOKV). Já os carnívoros, transmitem apenas o GT<sub>1</sub>. Os mesmos autores ainda afirmam que devido os *lyssavírus* estarem bem estabelecidos em duas ordens de mamíferos ecologicamente diferentes, este fato pode ser consequência de uma mudança bem sucedida de hospedeiro.

É interessante observar que todos os genótipos, com exceção do LBV (GT<sub>2</sub>) são conhecidos por causar doenças em humanos. Ademais, a doença causada pelos outros genótipos é virtualmente indistinguível da raiva clássica (Smith, 1996).

Com a advento dos anticorpos monoclonais (AcM) a classificação antigênica do VR pôde ser estabelecida. A produção destes anticorpos é feita através da imunização de camundongos albinos suíços com vacina anti-rábica inativada, e a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) com os mesmos, foram estabelecidas por Wiktor & Koprowski (1978). O trabalho destes autores contribuiu de forma significativa para os estudos epidemiológicos, visto que tornou-se possível definir variantes virais associadas a focos de raiva em todo o mundo e as espécies que agem como reservatórios do vírus (Favoretto *et al.*, 2002; Brasil, 2005b).

Em 1996 o Instituto Pasteur de São Paulo implantou a técnica IFI usando um painel de oito AcM (C1; C4; C9; C10; C12; C15; C18, e C19) contra a nucleoproteína viral, produzidos pelos Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, e estabelecido pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS), com o objetivo de estudar as cepas de VR isoladas das Américas. Com esse estudo foram definidas onze variantes antigênicas (VAg), determinadas de acordo com o perfil de leitura apresentado por cada uma (Quadro 1).

No Brasil, somente quatro variantes circulam atualmente sendo elas: VAg2, comumente encontrada em cães, VAg3 de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, e VAg4 e VAg6 de morcegos insetívoros da espécie *Tadarida brasiliensis* e *Lasiurus cinereus*, respectivamente (Quadro 1) (Favoretto *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 1994).

**Quadro 1** - Padrões de reação das diferentes variantes antigênicas com os anticorpos monoclonais.

	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	VAg	Lab
CVS	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Canina/Capivara	+	+	+	+	+	+	-	+		1
<b>Canina (Brasil)</b>	+	+	-	+	+	+	-	+		<b>2</b>
<b>Desmodus rotundus (Brasil)</b>	-	+	+	+	+	-	-	+		<b>3</b>
<b>Tadarida brasiliensis (Brasil)</b>	-	+	+	+	+	-	-	-		<b>4</b>
<i>Desmodus rotundus</i> (Venezuela)	-	+	V	+	+	V	-	V		5
<b><i>Lasiurus cinereus</i> (Brasil)</b>	V	+	+	+	+	-	-	-		<b>6</b>
Raposa do Arizona (EUA)	+	+	+	-	+	+	-	+		7
Gambá (EUA)	-	+	+	+	+	+	+	+		8
<i>Tadarida brasiliensis</i> (México)	+	+	+	+	+	-	-	-		9
Gambá (Sul da Califórnia)	+	+	+	+	-	+	-	+		10
<i>Desmodus rotundus</i> (México)	-	+	+	+	-	-	-	+		11

Legenda: (+) Positivo; (-) Negativo; (V) Reação débil). Fonte: Favoretto *et al.*, 2002.

O uso do painel de AcM tornou possível determinar a distribuição geográfica das variantes antigênicas do VR, identificar variantes conhecidas em novos hospedeiros, bem como descrever novas variantes, como ocorreu no estado do Ceará, onde uma possível nova variante do VR, com nenhuma aproximação antigênica e relacionamento genético com variantes conhecidas em morcegos ou mamíferos terrestres nas Américas, foi encontrada. Esta foi identificada em associação aos casos de raiva humana ocorridos naquele Estado. O sagüi da espécie *Callithrix jacchus*, foi determinado como sendo a fonte de transmissão (Morais *et al.*, 2000; Favoretto *et al.*, 2001).

## 1.5. EPIDEMIOLOGIA

### 1.5.1. Ciclo de Transmissão

A raiva é uma enfermidade que ocorre de maneira endêmica em diversos países do mundo, e seu ciclo de transmissão pode ser didaticamente dividido como mostrado na figura 3 em ciclo urbano, ciclo rural, silvestre terrestre e silvestre aéreo (Takaoka *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 2004).



**Figura 3** - Esquema do ciclo epidemiológico da raiva.

Fonte: Takaoka *et al.*, 2003.

O ciclo urbano é principalmente mantido pelos cães, e sua transmissão ocorre de cão para cão, sendo o vírus principalmente mantido nestes animais, embora outros animais domésticos urbanos, sejam freqüentemente infectados como é o caso dos gatos. Os cães são os principais transmissores de raiva para o homem, e desta forma, este ciclo urbano constitui um grave problema de saúde pública, devido ao estreito relacionamento entre as pessoas e seus animais de companhia (Rezende *et al.*, 1997; Fernandes, 2001).

O ciclo rural é mantido no campo por morcegos hematófagos, que são os reservatórios do VR neste ambiente, transmitindo-o para diferentes

espécies de animais domésticos, como: eqüinos, bovinos, caprinos, suínos e outros (Rezende *et al.*, 1997; Fernandes, 2001).

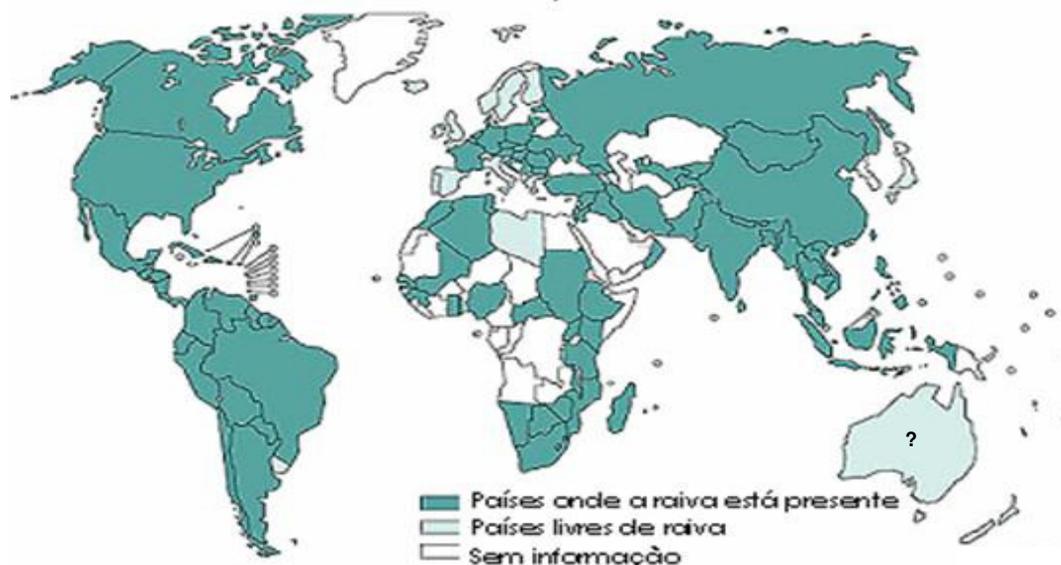
O ciclo silvestre terrestre é o de maior prevalência nos países desenvolvidos, em especial nas regiões em que a raiva urbana está sob controle. A transmissão do vírus ocorre, geralmente, através da saliva de um animal infectado para outro, e ocorre entre animais como: raposa, lobo, guaxinim, macaco e quati (Wada *et al.*, 2004).

O ciclo silvestre aéreo da raiva ocorre entre as diferentes espécies de morcegos, hematófagos ou não, e apresenta grande importância na manutenção e disseminação do vírus. Por serem os únicos mamíferos que voam, os morcegos têm a capacidade de transpor grandes barreiras geográficas (Wada *et al.*, 2004).

### **1.5.2. Distribuição Geográfica**

A raiva é uma doença amplamente distribuída em quatro dos cinco continentes (Figura 4). O único continente habitado e considerado sem a presença do VR era a Oceania, porém, com o encontro de um *lyssavírus* neste continente, esta hipótese está sendo revista. Nos outros continentes, a raiva apresenta distribuição variável, estando ausente em alguns países da Ásia como o Japão, Taiwan e certas ilhas do Pacífico. Encontram-se livres do VR também o Hawaí, Reino Unido, bem como algumas ilhas das Antilhas e do Atlântico (Johnson citado por Rezende *et al.*, 1997; Takaoka, 2003).

### Distribuição Geográfica da Raiva



**Figura 4** - Ilustração da distribuição geográfica da raiva.

?: Oceania (continente onde está sendo revista à presença ou não do VR).

Fonte: Adaptado de Duarte & Drago, 2004.

De acordo com Madhusudana (2005), a Ásia é o continente que apresenta o maior número de casos notificados da doença, estando à maioria deles concentrados na Índia, onde a raiva é considerada o principal problema de saúde pública, com aproximadamente 20.000 mortes humanas por ano, sendo o cão o transmissor em mais de 95% dos casos.

Na América do Norte, Krebs *et al.*, (2003), relataram casos de raiva humana, transmitida por morcegos, onde também casos de transmissão inter-humana têm sido descritos. De fato, existe na literatura a descrição de oito casos de raiva humana transmitida através de transplante de córnea, um dos quais, ocorrido nos Estados Unidos (Helmick *et al.*, 1987; CDC,1999). No ano

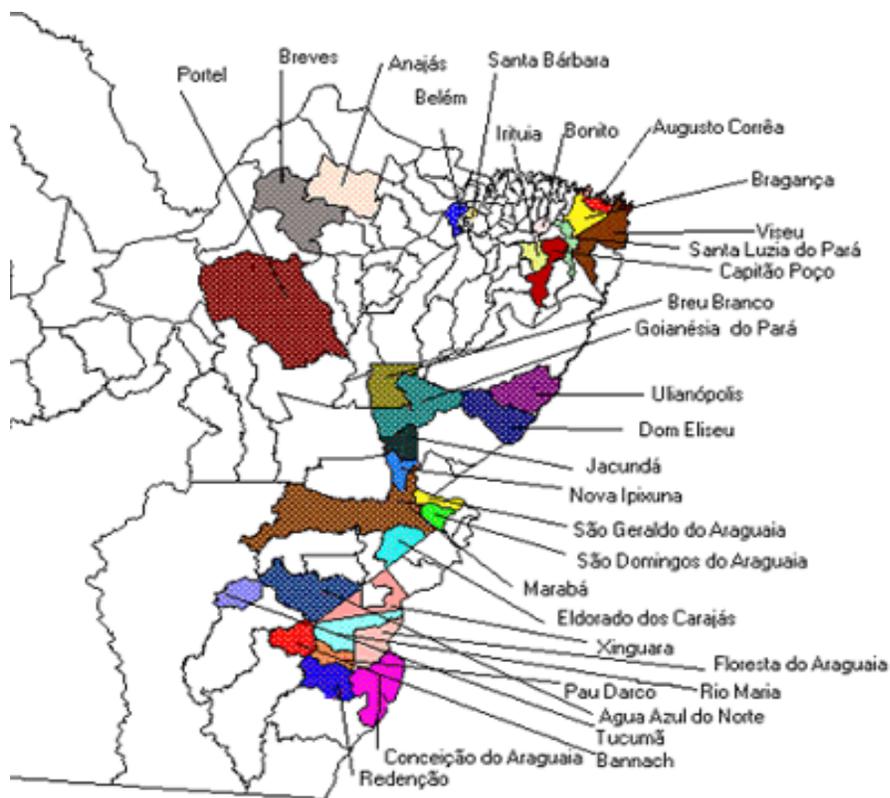
de 2004, mais quatro casos de raiva humana ocorreram no estado do Texas, após transplante de diversos órgãos como pulmões, fígado, rins e enxerto vascular, os quais foram transplantados para diversos receptores, a partir de um único doador que morreu com um quadro encefalítico sem etiologia definida (Burton *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005).

Ainda em 2004 casos semelhantes de transmissão por órgãos transplantados foram relatados na Alemanha. Neste episódio, três pacientes receberam transplante de rim, pulmão e pâncreas, e morreram com sintomas neurológicos progressivos. Acredita-se que o doador tenha se infectado em uma viagem à Índia (HPA, 2005).

Nos Estados Unidos e Canadá, a raiva é mais encontrada em mamíferos silvestres (esquilos, guaxinins, raposas, lobos e chacais), ocorrendo também em morcegos não hematófagos. No Brasil, a doença mantém-se em caráter enzoótico e ocorre tanto em áreas urbanas quanto rurais (Fernandes, 2001; Rupprecht *et al.*, 2002; Brasil, 2005c).

Além dos morcegos hematófagos, espécies de morcegos não hematófagos têm sido também incriminadas como importantes reservatórios do VR, sendo responsáveis por infecções humanas no Brasil, como também por mortes humanas em outros países da América Latina. Considerando a larga área geográfica de circulação do vírus rábico no Brasil, e a transmissão já relatada do vírus entre primatas não humanos, morcegos frugívoros e insetívoros, e carnívoros selvagens, a existência de novos genótipos ou variantes do vírus pode ser esperada (Favi *et al.*, 2002).

De acordo com a Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará (SESPA), até o ano de 2005 a raiva era encontrada circulando em pelo menos 31 dos 143 municípios que compõe o estado do Pará (Figura 5), sendo que a região Norte foi responsável por 20% dos casos humanos notificados no país até o ano de 2004 (Brasil, 2004b; SESPA, 2004). Entre os anos de 2000 a 2005, foram testadas 5.940 amostras suspeitas de raiva, entre humanas e de outros animais, tendo sido diagnosticadas como positivas 167, pelas técnicas de IFD e/ou PB no laboratório de raiva do Instituto Evandro Chagas.



**Figura 5** – Mapa ilustrando as áreas com circulação do *Vírus da raiva* no estado do Pará até o ano de 2005. Fonte: Adaptado de <http://portal.sespa.pa.gov.br>

São estimadas cerca de 40.000 a 100.000 mortes humanas anuais por raiva e cerca de 50.000 herbívoros mortos anualmente, sendo essas perdas econômicas estimadas em até 100 milhões de dólares, o que representa uma importante limitação ao desenvolvimento da pecuária (Belotto, 2001; Brasil, 2005c ; Fernandes, 2001; Rupprecht *et al.*, 2002). Associado a isso, há os prejuízos indiretos que são estimados em 32,5 milhões de dólares anuais correspondentes à espoliação sanguínea, perda de peso, depreciação do couro e bezerros não produzidos (Belotto, 2001). O caráter zoonótico da doença é o que mais preocupa, visto que a raiva é a zoonose fatal que mais faz vítimas em todo o mundo (Fernandes, 2001; Rupprecht *et al.*, 2002; Brasil, 2005c).

O ataque de morcegos hematófagos a humanos parece comum em algumas regiões da América Latina. No ano de 1986, no município de Boca da Mata, estado de Alagoas, nordeste do Brasil, dois casos de raiva humana transmitidas por morcegos hematófagos foram registrados. Entre os anos 1990 a 1992 foram registrados mais seis casos no estado da Bahia, Nordeste do Brasil, um ocorrido no município de Pintadas, três no município de Aporá e dois casos no município de Conde (Schneider & Santos-Burgoa, 1995; Gonçalves, M. A. S, *et al.*, 2002).

Mais recentemente, nos anos de 2004 e 2005, foram relatadas a ocorrência de mais três epidemias de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos, no estado do Pará. As primeiras epidemias ocorreram nos meses de março e maio de 2004, nos municípios de Portel mesoregião do Marajó, onde foram relatados 15 óbitos, sendo 10 confirmados laboratorialmente, e

Viseu mesoregião Nordeste, com 6 óbitos dos quais 2 confirmados laboratorialmente (Travassos da Rosa *et al.*, 2006). A terceira epidemia ocorreu em junho de 2005, no Município de Augusto Corrêa, também na mesoregião Nordeste onde ocorreram 15 óbitos, dos quais 10 foram confirmados por análises laboratoriais Neste mesmo ano, outras epidemias foram relatadas nos municípios contíguos de Godofredo Viana, Cândido Mendes, Carutapera e Turiaçú, todos do estado do Maranhão, com uma ocorrência de 24 casos humanos (Wada *et al.*, 2004; Brasil, 2004a; Brasil, 2005a; Travassos da Rosa *et al.*, 2006).

### **1.5.3. Hospedeiros**

Tanto os animais domésticos quanto os animais selvagens podem servir como fonte de infecção do vírus rábico. Entre os primeiros, a espécie canina assume o papel mais importante na cadeia de transmissão, e outros animais como felinos, suínos e herbívoros também servem como fonte secundária de contágio. Entre os animais selvagens, vários deles exercem um papel importante na transmissão, entre os quais quirópteros, canídeos e felídeos selvagens (Figura 6) (Rezende *et al.*, 1997).

De todos os mamíferos susceptíveis ao VR e que podem transmiti-lo a outros animais, os principais são os carnívoros e quirópteros visto que estes mantêm o vírus em natureza por um maior período de tempo (Krebs *et al.*, 2003; 2004).



**Figura 6** - Distribuição geográfica dos mamíferos transmissores da raiva.

Fonte: Adaptado de Rupprecht *et al.*, 2002.

Em termos de saúde pública, os morcegos têm sido estudados como possíveis reservatórios e/ou transmissores de agentes patogênicos, entre eles o VR. O papel dos morcegos na transmissão de doenças e em particular do VR foi formulada pela primeira vez por Carini em 1911, ao estudar uma epizootia da raiva em Santa Catarina (Carini revisado por Almeida *et al.*, 1994), e posteriormente confirmada por Haupt e Rehaag, em 1916, quando estes conseguiram o isolamento do vírus rábico a partir do tecido nervoso de um morcego *Phyllostoma superciliatum*, atualmente classificado como *Artibeus lituratus* (Haupt & Rehaag revisado por Silva, 2001). Desde então, a incidência da raiva transmitida por morcegos hematófagos foi demonstrada em várias regiões neotropicais, desde a Argentina até o México. Antes da colonização

européia as espécies de morcegos hematófagos ocorriam em populações relativamente pequenas que se alimentavam de mamíferos e aves silvestres (Brasil, 1998).

Os morcegos não hematófagos somente passaram a merecer importância em Saúde Pública, quando em 1953, no Estado da Flórida, EUA, um garoto foi agredido por um morcego insetívoro da espécie *Dasypterus floridanus*, atualmente denominado *Lasiurus intermedius*. O proprietário do local onde ocorreu o incidente tinha conhecimento da ocorrência da raiva em morcegos vampiros no México, então resolveu encaminhar o espécime agressor para análise, quando então o diagnóstico laboratorial foi positivo para o VR (Brasil, 2005c).

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

De uma grande diversidade de espécies de quirópteros existentes, registra-se atualmente que 27 espécies já foram diagnosticadas positivas para raiva sendo a maioria associada a infecções em humanos, representando risco para o homem, mas somente três delas são especializadas em sugar sangue de animais vertebrados, sendo elas: *Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*. Estas espécies são encontradas na América Latina, mas principalmente no Brasil (Uieda *et al.*, 1996; Gonçalves, M. A. S, *et al*, 2002).

## 1.6. INFECÇÃO EM HUMANOS E ANIMAIS: ASPECTOS CLÍNICOS

Em humanos o período de incubação (p.i), pode ser tão curto quanto uma semana ou longo como dois anos. Não obstante, essa ampla faixa, na maioria dos casos o p.i situa-se entre um a dois meses. Sugere-se que esta oscilação no p.i depende de inúmeras variáveis, sendo as principais a localização e gravidade da mordedura ou arranhadura, a proximidade dos centros nervosos, o grau de imunidade adquirida e o número de partículas virais inoculadas, porém não há na literatura, trabalhos que comprovem estas informações (Rezende *et al.*, 1997; Hemachudha *et al.*, 2002).

No período inicial da doença podem ser observadas alterações de comportamento, sensação de angústia, cefaléia, pequena elevação de temperatura, mal-estar e parestesia. Na fase seguinte, de excitação, surge hiperestesia, seguida de fotofobia, hiperacusia, midríase e sialorréia. Com a progressão da doença, surgem espasmos nos músculos da deglutição e a ingestão de líquidos é recusada por contrações espasmódicas laringofaríngeas mesmo à simples visão de um líquido, culminando em uma hidrofobia. Também podem ser observados espasmos dos músculos respiratórios e convulsões generalizadas (Rezende *et al.*, 1997; Takaoka *et al.*, 2003).

A fase de excitação pode ser predominante até a morte ou ser substituída por uma fase de paralisia generalizada ascendente. Em alguns casos, a fase de excitação é muito curta e em quase todo o curso da doença predomina a sintomatologia paralítica. Este fato ocorre, principalmente, quando a espécie transmissora é o morcego. O período de estado da doença dura de

dois a seis dias ou mais, culminando com um desfecho fatal. A morte é atribuída à falência das funções vegetativas centrais básicas, e muitas vezes decorrentes da miocardite concomitante que se instala (Jackson, 2000; 2002; Plotkin, 2000; Takaoka *et al.*, 2003; Duarte & Drago, 2004).

Embora a doença possa apresentar um quadro clínico clássico, é uma doença de difícil diagnóstico e reconhecimento clínico. Geralmente, no início dos sintomas, a doença é confundida com outras enfermidades, acarretando diagnósticos tardios ou até mesmo somente após a morte do paciente (Hemachudha *et al.*, 2002).

Nos animais domésticos, os sinais clínicos da raiva apresentam-se com muita similaridade, havendo poucas variações entre as espécies. O p.i varia mais ou menos de 14 a 60 dias. Nos cães podemos dividir o curso da doença em: fase prodrômica, que dura de 1 a 3 dias, sendo característica a mudança de comportamento do animal; fase excitativa ou furiosa onde o animal torna-se agressivo e sua salivação é abundante; fase parálitica ou muda que se caracteriza por sintomas paráliticos que iniciam a partir dos músculos da cabeça e pescoço, e o animal também apresenta dificuldades de deglutição e latido rouco. A morte ocorre por paralisia de músculos respiratórios. Os gatos evoluem de modo semelhante aos cães, ou seja, com predomínio da forma furiosa (Rezende *et al.*, 1997; Takaoka *et al.*, 2003).

Nos animais silvestres, a raiva ocorre naturalmente em muitas espécies de canídeos e outros mamíferos, e a sintomatologia mais comum é a forma furiosa, semelhante a dos cães domésticos. Nos herbívoros a forma parálitica é predominante, e o p.i é geralmente mais longo, variando de um a

três meses. Nos morcegos também é observada a sintomatologia parálitica, caracterizada por atividades alimentares diurnas, tremores, incoordenação motora, contrações musculares e paralisia das asas. Ressalte-se que morcegos hematófagos ou não, encontrados em locais não habituais, principalmente durante o dia são potencialmente suspeitos de estarem infectados com o VR (Uieda *et al.*, 1995; Brasil, 1998; Rezende *et al.*, 1997; Takaoka *et al.*, 2003).

## 1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A raiva está presente em todo o território nacional, sendo confirmada laboratorialmente através da detecção do vírus em animais infectados, podendo ser considerada endêmica em graus diferenciados de acordo com a região geopolítica (Marques & Kotait, 2001)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda para o diagnóstico específico o uso das técnicas de Imunofluorescência Direta (IFD), conforme descrita por Dean *et al.*, (1996) e a Prova Biológica (PB) segundo Koprowsky (1996) como os principais métodos para o diagnóstico específico da raiva. São testes com alta sensibilidade e especificidade, que devem ser utilizados simultaneamente, para a detecção de antígenos virais e isolamento viral, respectivamente (Meslin & Kaplan, 1996).

A IFD é uma técnica rápida e de custo baixo, e seu fundamento consiste em uma reação imunológica, que identifica antígenos rábicos em

impressão de fragmento de tecido nervoso por ação de um conjugado específico, que são anticorpos anti-rábicos marcados com o isotiocianato de fluoresceína. É um teste rápido em que o resultado pode ser obtido em cerca de duas horas (Dean *et al.*, 1996; Villa Nova *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 2002).

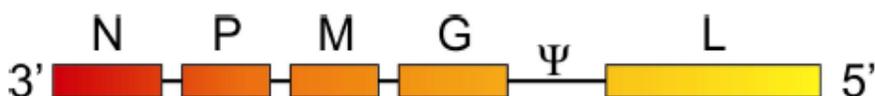
A PB se baseia na reprodução da doença em camundongos albinos suíços recém-nascidos através de inoculação via intracerebral de uma suspensão do material suspeito. Este teste confirma os resultados obtidos na IFD, e representa a técnica “Padrão Ouro” para a raiva, embora seu uso seja oneroso e demorado, visto que são necessários pelo menos 21 dias de observação diária dos animais inoculados para um resultado negativo (Koprowsky, 1996; Villa Nova *et al.*, 1996; Peixoto *et al.*, 2000).

Os laboratórios que realizam o diagnóstico específico da raiva devem ser considerados de risco (nível de biossegurança 2), e todos os espécimes suspeitos, devem ser manuseados com cuidado e sob as normas de biossegurança nacionais. Também, os profissionais que atuam nesta área devem ser previamente imunizados e suas condições imunológicas avaliadas regularmente (Kaplan, 1996; Woldehiwet, 2002).

## 1.8. GENOMA VIRAL

### 1.8.1. Organização Genômica

O RNA genômico da partícula infecciosa do VR contém cinco genes e cada qual codifica uma proteína estrutural do vírion. Assim, cinco proteínas distintas compõem a partícula viral: N, P, M, G e L (Figura 7).



**Figura 7** – Esquema ilustrativo do genoma do *Vírus da raiva*.

N: Nucleoproteína    P: Fosfoproteína    M: Proteína Matriz    G: Glicoproteína  
L: RNA-Polimerase    Ψ: Pseudogene

Fonte: Adaptado de Kimura, L.M.S., 2006.

A proteína M está localizada na face interna do envelope lipídico. Ela é responsável por manter a ligação entre o envelope e o complexo RNP (Sokol *et al.*, 1971). É formada por 202 aminoácidos (aa) possui peso molecular (PM) de 23.000 dáltons (Da), possuindo papel importante na regulação da replicação viral (Sokol *et al.*, 1971; Tordo *et al.*, 1986).

A glicoproteína G é uma proteína transmembrana que forma as espículas que se projetam na superfície da partícula viral. É responsável pela ligação do vírus à superfície celular do hospedeiro, definindo desta forma o

neotropismo do vírus (Tordo *et al.*, 1986). É considerada a única proteína capaz de induzir a formação e reagir com os anticorpos neutralizantes. Esta proteína tem 542 aa e PM de 58.000 Da. É importante salientar que variações na seqüência de aminoácidos em algumas regiões da proteína G podem alterar as propriedades patogênicas e imunológicas do vírus (Bunschoten *et al.*, 1989).

A proteína P é constituída de 297 aa, possui PM de 33.000 Da e é fortemente fosforilada (Tordo *et al.*, 1986). É uma proteína interna não estrutural e possui papel importante na replicação viral, já que esta é inibida por anticorpos monoclonais específicos para essa proteína (Bunschoten *et al.*, 1989).

A proteína L é a maior proteína dos *lyssavírus* com 2.142 aa e PM de 244.206 Da. É uma RNA Polimerase, sendo responsável pelas atividades enzimáticas necessárias à transcrição e replicação do RNA viral (Tordo *et al.*, 1988).

A proteína N é um polipeptídeo longo com 450 aa, PM de 50.500 Da, sendo fosforilada no resíduo de serina na posição 389 e situa-se no interior do cilindro helicoidal do nucleocapsídeo. Tem importância estrutural na capsidização do RNA genômico, além de estar envolvida nas etapas de transcrição e replicação, já que estas etapas não iniciam sem que uma quantidade suficiente de proteína N esteja unida ao RNA genômico (Tordo, 1996). A nucleoproteína é considerada uma região gênica muito conservada, facilitando o desenho de iniciadores hábeis na amplificação de inúmeras variantes virais (Crepin *et al.*, 1998).

## 1.9. EMPREGO DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DE ISOLAMENTOS DO VÍRUS RÁBICO

Os avanços registrados em biologia molecular possibilitaram em 1981, o relato da primeira seqüência dos genes do vírus rábico e estabeleceram as bases para a classificação definitiva do vírus mediante a comparação das análises antigênica e genética. Do mesmo modo, foi possível identificar a estrutura molecular e codificar o genoma viral, estabelecendo a correlação entre as seqüências do ácido nucléico primário e aminoácidos e as propriedades biológicas e imunológicas do vírus rábico (Natarajan *et al.*, 1992; Germano, 1994).

O VR possui, em seu genoma, regiões conservadas principalmente no gene N, o que permitiu desenvolver estratégias moleculares para uma rápida, sensível e precisa detecção do vírus, além de identificar o relacionamento entre eles, suas cepas, espécies hospedeiras e sua distribuição geográfica (Nadin-Davis, 1998; Badrane *et al.*, 2001).

No que tange ao VR, os avanços tecnológicos das ciências biológicas, notadamente a biologia molecular, permitiram aprofundar os conhecimentos sobre o vírus, a patogenia e a imunoprofilaxia da infecção, assim como o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos (Germano, 1994).

Sacramento *et al.* (1991) desenvolveram o primeiro protocolo de Transcrição Reversa - Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (RT-PCR), para o VR. A partir daí, a evolução desta técnica tem sido marcante, além de

representar um grande avanço no diagnóstico e na tipificação de amostras de *lyssavírus*.

Kamolvarin *et al.* (1993), citam algumas vantagens do uso da técnica de RT-PCR para a detecção do genoma do vírus rábico quando comparada às técnicas tradicionais, IFD e PB: seu uso em espécimes deteriorados e sua rapidez em relação a PB, que requer de 21 a 30 dias para um resultado conclusivo, constituem atrativos para o diagnóstico molecular.

O futuro das técnicas de amplificação aponta para sua possível capacidade de ultrapassar a sensibilidade das técnicas *post-mortem*, podendo fornecer um diagnóstico específico preciso ainda no *ante-mortem*, permitindo a implementação de rápidas medidas de controle e profilaxia (Ito *et al.*, 2001; 2003; Dantas Júnior *et al.*, 2004).

Nestes termos, pesquisas efetuadas com base na biologia molecular têm sido de relevante importância, não só para complementar os conhecimentos sobre a patogênese da infecção rábica, como também para determinação da variabilidade genética do vírus, inclusive entre cepas, bem como para o estudo evolutivo do VR, tornando possível traçar um perfil epidemiológico da doença numa determinada área geográfica. No caso deste trabalho resolvemos estudar as características moleculares do VR isolados no estado do Pará.

## 1.10. OBJETIVOS

### 1.10.1. Geral

Caracterizar geneticamente cepas de vírus rábico isoladas de amostras humanas e animais, procedentes do estado do Pará no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2005.

### 1.10.2. Específicos

- Descrever a epidemiologia do *Vírus da raiva* no estado do Pará no período de 2000 a 2005.

- Comparar as seqüências nucleotídicas obtidas entre as cepas analisadas neste e com outras amostras de VR isoladas no Brasil e nas Américas, cujas seqüências se encontram disponíveis no GenBank, utilizando métodos de análise filogenética.

- Contribuir para o entendimento da epidemiologia molecular da raiva no estado do Pará.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. AMOSTRAS

Para a execução deste trabalho, 62 cepas de vírus rábico foram seqüenciadas, todas oriundas de tecido nervoso humano e animal, e recebidas no Laboratório de Diagnóstico de Raiva, da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas, e que apresentaram diagnóstico confirmado para raiva pelas técnicas de IFD e/ou PB, sendo provenientes das mesoregiões do estado do Pará, de acordo com mapa a seguir: Baixo Amazonas; Marajó; Metropolitana de Belém; Nordeste Paraense; Sudeste Paraense; e Sudoeste Paraense (Figura 8).



**Figura 8** - Figura ilustrando as mesoregiões paraenses.

Fonte: Adaptado de [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)

As amostras foram encaminhadas pelas unidades de Saúde das Secretarias de Saúde dos Estados e Municípios, ou foram colhidas durante estudos de campo para investigar epidemias de raiva humana no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2005, tendo sido selecionadas de acordo com a espécie e mesoregião.

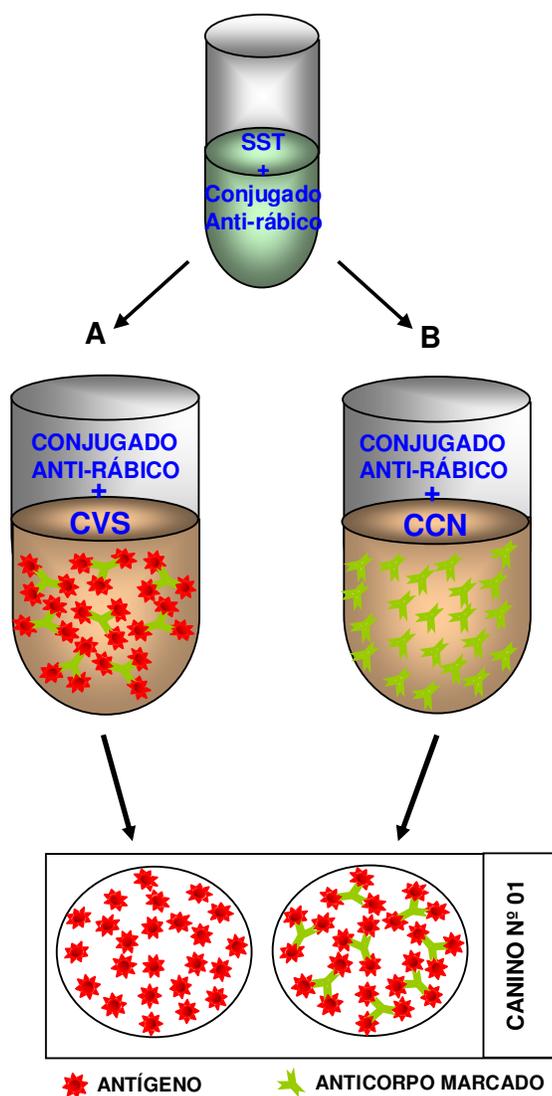
## 2.2. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

Foi realizada a técnica adaptada por Dean *et al.* (1996), na qual o fundamento da IFD é baseado em uma prova imunológica para detectar a reação antígeno-anticorpo, em que um conjugado anti-rábico específico, é utilizado e este conjugado nada mais é que o anticorpo anti-rábico unido a uma substância fluorescente, o isotiocianato de fluoresceína, que funciona como sistema revelador da reação (Figura 9).

Impressões do material suspeito foram feitas de fragmentos do cérebro, cerebelo, medula espinhal ou corno de Amon, em lâminas de microscopia de 26 x 76 mm. A secagem das lâminas ocorreu em temperatura ambiente (T.A) e a fixação em acetona gelada por quatro horas. Decorrida esta etapa, retirou-se as lâminas da acetona e novamente secas em T.A.

Prosseguiu-se com a realização de uma diluição inicial pré-estabelecida do conjugado em solução salina tamponada (SST) pH 7,4, e em seguida diluída 1:5 em suspensões a 20% de cérebro de camundongo infectado com *Challenger Vírus Standard* (CVS) e suspensões a 20% de

cérebro de camundongo normal (CCN). No preparo destas suspensões utilizou-se solução de albumina bovina a 0,75% em SST e antibióticos. Este procedimento ocorreu em tubos do tipo eppendorf devidamente identificados.



**Figura 9** – Esquema da técnica de IFD. (A) Antígenos ligados ao anticorpo marcado e impressão de cérebro com antígenos livres. (B) Anticorpos livres e posterior ligação dos mesmos aos antígenos da impressão de tecido nervoso.

Concluída a etapa anterior, foram adicionados cerca de 30 $\mu$ L das mesmas, sobre cada impressão. Seguiu-se com uma incubação das lâminas em estufa a 37°C dentro de uma câmara úmida por 30 minutos. Transcorrido este tempo, procedeu-se uma primeira lavagem das lâminas em SST pH 7,4, e após, as mesmas permaneceram imersas nesta solução por 10 minutos, foi realizada uma segunda lavagem com água destilada, para retirar o excesso de cristais de sal, a fim de não prejudicar a leitura do teste. Ocorrida à secagem total a T.A das mesmas, sua montagem se deu com glicerina tamponada pH 8,5 e lamínulas de 22 x 22 mm.

A leitura do teste foi feita em microscópio de imunofluorescência com objetiva de 10x e ocular de 20x (Axiophot, marca Carl Zeiss). As impressões positivas apareceram como partículas brilhantes de cor esverdeada e com diferentes formas, podendo ser ovaladas ou arredondadas.

### 2.3. PROVA BIOLÓGICA (PB)

De acordo com Koprowsky (1996), a prova biológica consiste em uma técnica de inoculação via intracerebral (i.c.) do material suspeito, em camundongos albinos suíços recém-nascidos com dois a três dias de vida (Figura 9). Foi preparada uma suspensão a 20% do material (Cérebro, Cerebelo, medula espinhal ou Corno de Amon), podendo ser ainda glândula salivar em caso de morcego, saliva e líquido céfalo raquidiano (LCR) quando provenientes de humanos. Tais espécimes foram diluídos em uma solução de

albumina bovina a 0,75% em SST com antibióticos. A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante retirado e utilizado como inóculo (Figura 10).

Os animais inoculados foram distribuídos em grupos de seis lactentes e a mãe em gaiolas devidamente identificadas e mantidas no infectório. Observações e anotações nos respectivos cartões de inoculação foram realizadas diariamente por um período de 21 dias, com exceção de amostras provenientes de herbívoros e animais silvestres (P. ex. morcego) que foram observadas por 30 dias. Quando os camundongos mostraram sinais de doença, seus encéfalos foram coletados e submetidos a um teste de IFD, para confirmação do diagnóstico.



**Figura 10** - Camundongos albinos suíços recém-nascidos utilizados para as tentativas de isolamento do VR. (I) Família de camundongos mantidos em gaiolas. (II) Inoculação da suspensão viral via i.c.

## 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo, a análise estatística foi realizada com o auxílio do programa BioEstat 4.0, utilizando para a avaliação dos dados os testes “t de *student*” e Qui-Quadrado, com valor de significância estatística estabelecido de 95% (com erro  $\alpha$  de 5%,  $p < 0,05$ ).

## 2.5. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO PELO MÉTODO DO REAGENTE TRIZOL LS

Para realizar a extração do RNA viral foi utilizada uma suspensão de tecido nervoso a 50%, contendo 1g do tecido nervoso, macerado em 1000  $\mu$ L de solução de albumina bovina. Prosseguiu-se com uma centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para a extração do RNA viral.

Em um microtubo de 1,5mL, um total de 250 $\mu$ L da suspensão viral foi misturado a 750 $\mu$ L de reagente TRIZOL (Life Technologies, Invitrogen). Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio. 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 superior na qual se encontrava o ácido nucléico.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5mL estéril na qual foram adicionados 500µL de isopropanol. 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%. Seguiu-se de uma rápida agitação em vórtex e de centrifugação a 7500 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 imediatamente utilizado para detecção do genoma viral ou armazenado a -70°C até o uso.

## **2.6. TRANSCRIÇÃO REVERSA REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (RT-PCR)**

### **2.6.1. Iniciadores Específicos**

O par de iniciadores (Quadro 2) foi desenhado através 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 2** - Iniciadores utilizados no protocolo de RT-PCR para amplificação do vírus rábico.

Iniciador	Posição no Genoma	Seqüência	GC%	TmA*	Produto
RabNF	868 (+)	GGAAGAGATAAGAAGAATGTTTG	34.78	54.16	490 pb
RabNR	1359 (-)	TTGGAGCTGACTGAGACATA	45.00	54.33	

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

### 2.6.2. RT-PCR em dois passos

De acordo com Travassos da Rosa *et al.*(2006) e objetivando-se o aumento da sensibilidade do teste, foi realizada a RT e a PCR em dois passos distintos, onde 5 µL do RNA extraído, previamente diluído a 50% em água livre de RNase, foi desnaturado a 94°C 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 constituída por uma mistura de 5µL de RNA e 5µL da mistura da Transcrição Reversa, que incluiu tampão 1x (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>); 5 µL de RNA (~2-5 ng); e 5

$\mu\text{L}$  da mistura de reação que inclui tampão RT 1x (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 100 mM NaCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA); 0,5 mM de dNTP; 10 mM de DTT; 10 U/ $\mu\text{L}$  de enzima RT (Superscript-II, Reverse Transcriptase, Invitrogen); 2,5  $\mu\text{M}$  do iniciador 868 NF (5'-GGAAGAGATAAGA AGAATGTTTG-3'), e 20 U de inibidor de RNase (RNaseOUT –Invitrogen). A RT foi processada em um ciclo de 42°C durante 90 minutos (Quadro 3).

**Quadro 3** - Reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar do vírus rábico.

Reagentes para Transcrição Reversa	Concentração Inicial	Concentração Final	Reação de 10 $\mu\text{l}$
Água livre de RNase e DNase	-	-	-
Tampão (RT)	5x	1x	2 $\mu\text{l}$
dNTP	10 mM	0,5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
DTT	1,25 mM	10 mM	1 $\mu\text{l}$
RT (SuperScri II)	200 U/ $\mu\text{L}$	10 U/ $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{l}$
RNAsin	40 U/ $\mu\text{L}$	2 U/ $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{l}$
Primer NF	50 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
Amostra	-	1:4	5 $\mu\text{l}$

A amplificação do produto da RT foi realizada pela técnica de PCR, cujo volume da reação foi ajustado para 25 $\mu\text{L}$  contendo: 5  $\mu\text{L}$  do produto da RT (cDNA) e 20  $\mu\text{L}$  da mistura de reação (Quadro 4) constituída por tampão

de PCR 10x (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA); 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,2  $\mu M$  de dNTPs; 1  $\mu M$  de cada iniciador 868 NF e 1359 NR (5'-TTGGAGCTGACTGAGACATA-3') e 0,05 U/ $\mu L$  de DNA polymerase (Platinum Taq DNA Polymerase). A reação de PCR foi executada com 35 ciclos, na qual cada um foi composto de 94°C durante 40 segundos para desnaturação, 55°C, durante 40 segundos para anelamento, e 74°C por 1 minuto para síntese.

**Quadro 4** - Reação de PCR para a amplificação do cDNA vírus rábico.

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

## 2.7. VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DA RT-PCR

Os produtos da PCR foram revelados usando a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão T.A.E 1X (Tris 10 mM; Acetato 0,1 M; EDTA 1 mM pH 7,2) corado com brometo de etídio, mediante a utilização de

transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

Os produtos amplificados foram colocados para migrar 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. Afim de verificarmos a ocorrência de possíveis contaminações durante a realização da técnica de RT-PCR, amostras contendo apenas água livre de RNase foram migradas no gel, bem como os demais componentes da mistura de RT-PCR.

## **2.8. PURIFICAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)**

A purificação do cDNA foi realizada utilizando o *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) no qual colunas de retenção a base de sílica foram usadas. A técnica consistiu em retirar com auxílio de estilete metálico fragmentos de gel com bandas, que foram transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis e previamente pesados. O peso dos fragmentos 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 3 volumes de tampão de QG (para dissolução do gel de agarose) em relação ao peso da banda (ex: 3  $\mu$ L de tampão QG para cada 1 mg de gel).

Estes tubos foram agitados vigorosamente e posteriormente incubados a 60°C durante 5 minutos ou até que a agarose fosse

completamente dissolvida. Após essa etapa, as amostras foram transferidas para um tubo coletor contendo a coluna de retenção. Seguiu-se com uma incubação por 1 minuto e centrifugação por 30 segundos. O material filtrado foi descartado, sendo adicionados 500 µL de tampão de lavagem PE aos tubos, os quais foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 30 segundos.

As colunas foram transferidas do interior do tubo coletor para um tubo de 1,5 mL estéril, e posteriormente foram adicionados a cada uma delas um volume de 50 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; TE pH 8,0) ou água livre de RNase e DNase. Por último, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto para que ocorresse a recuperação do cDNA retido nas colunas. Os cDNA recuperados foram usados imediatamente para seqüenciamento nucleotídico ou estocados a – 20° C até o uso.

## **2.9. SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO**

O seqüenciamento dos cDNA purificados foi realizado utilizando o kit ABI PRISM Dye Terminator (Applied Biosystems), cujas reações foram processadas em um seqüenciador automático, modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystem), pelo emprego do método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes, que ao contato com raios laser emanados do seqüenciador, 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 *et al.*, 1977).

O seqüenciamento das amostras pelo método automático seguiu algumas etapas: Reação de seqüenciamento composta pela mistura de 2 µL (80 ng) de DNA plasmidial, 8 µL de tampão de reação contendo os dideoxynucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP (*Terminator reaction mix*), 3,5 pmoles dos iniciadores específicos e água para o volume final de 10 µL. As amostras foram processadas em termociclador automático (GeneAmp PCR Systems 9600, Applied Biosystems) programado para realizar 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 10 segundos, hibridização dos iniciadores (T7 e SP6) a 50 °C por 5 segundos e síntese a 60 °C por 4 minutos.

A precipitação do DNA se deu através da adição de 80µL de isopropanol 75%, ao volume total da reação de seqüenciamento. Em seguida as amostras foram submetidas a outras etapas seqüenciais que foram: incubação por 20 minutos a TA, seguida de uma centrifugação por 25 minutos a 14.000 rpm a 8 °C. Posteriormente foi feita uma lavagem com 250 µL de etanol a 70% e outra centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 8 °C . Nesta etapa foi realizada outra incubação a 95°C por 2 minutos para que ocorresse completa evaporação do etanol. A reconstituição do DNA foi feita com o auxílio de 5 µL de solução de formamida e azul dextran / EDTA 25 mM pH 8,0 na proporção 5:1, respectivamente.

A finalização ocorreu com a eletroforese no seqüenciador automático por aproximadamente 7 horas, 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 através da região de leitura ótica do sequenciador.

## 2.10. ANÁLISE FILOGENÉTICA

As seqüências nucleotídicas obtidas das 62 amostras de VR utilizadas neste estudo foram comparadas entre si e com outras seqüências homólogas de cepas isoladas no Brasil disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa Clustal X (Thompson, *et al.*, 1997)

As árvores filogenéticas foram construídas usando os métodos de agrupamento de vizinhos (*Neighbor Joining*: NJ) (Saitou & Nei, 1987) e máxima parcimônia (MP) implementados no programa PAUP 4.0b.10 (Swofford, 2002). e máxima verossimilhança (MV) utilizando o programa PHYML (Guindon & Gascuel, 2003) devido a melhor performance deste programa para a análise de máxima verossimilhança (rápido processamento) em comparação ao PAUP. O programa Moldest v. 3.6 (Posada & Crandall, 1998) foi utilizado para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica a ser usado baseado no critério de informação Akaike (AIC).

Para a análise pelo método de NJ, a matriz de distância foi calculada a partir das seqüências alinhadas usando o modelo de Tamura-3 parâmetros

utilizando diferentes parâmetros de distribuição gama (parâmetro de distribuição gama =1.0). A análise de *bootstrap* (1000 réplicas) foi realizada para gerar maior confiabilidade nos valores dos grupamentos que foram obtidos (Felsenstein, 1985) nos métodos de NJ, MP e MV.

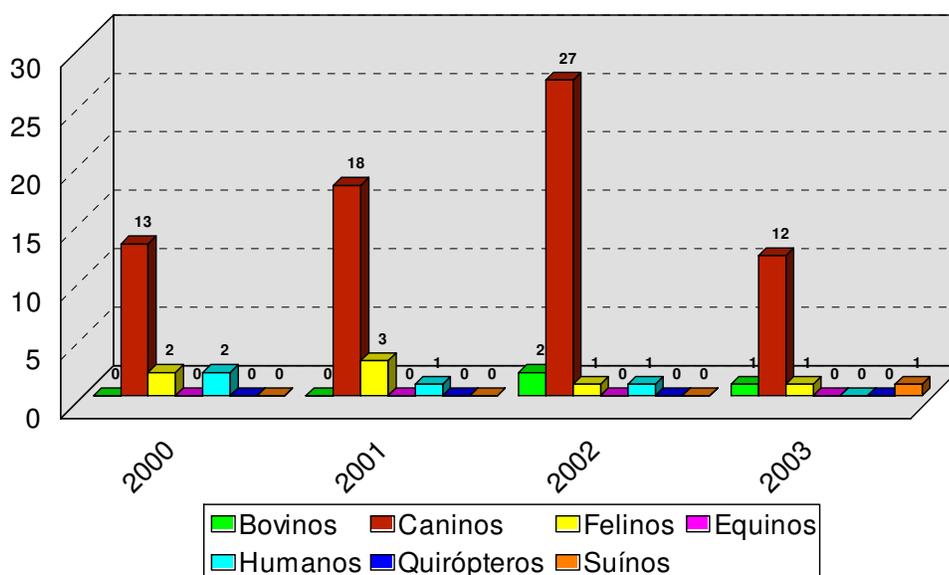
A análise Bayesiana foi realizada empregando o modelo de Markov Monte Carlo (Markov Chain Monte Carlo; MCMC) e implementada no programa MrBayes 3.0b4. A análise foi feita para 2 milhões de réplicas, sendo a amostragem fixada a cada 1000 árvores geradas. Os valores Bayesianos foram estimados em 50% das árvores consenso geradas. (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). O programa TRACER disponível no portal ([www.evolve.zoo.ox.ac.uk](http://www.evolve.zoo.ox.ac.uk)) foi utilizado para verificar se a análise realizada pelo programa MrBayes alcançou a convergência apropriada.

Valores de confiabilidade foram calculados pelo programa Mega 3.0 (Kumar *et al.*, 2004) baseados na divergência nucleotídica de cepas do vírus rábico isoladas de morcegos, cães, guaxinim e cepas de vírus fixos sendo tais valores estimados em  $\leq 3\%$ ,  $\leq 1,3$  e  $\leq 0,9\%$  para o grupamento das cepas em clusters, clades e sub-clades, respectivamente.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. EPIDEMIOLOGIA DA RAIVA NO ESTADO DO PARÁ NO PERÍODO DE 2000 A 2005**

Entre os anos de 2000 a 2003, observou-se a maior prevalência de casos positivos na espécie canina, sendo um total de 70 casos (3,57%), seguido da espécie felina, com sete casos (0,35%) registrados. Até o ano de 2003 em animais de produção, entre eles bovinos, suínos e eqüinos, foi observada pouca positividade. De fato, essas três espécies juntas somaram quatro casos (0,20%). Entre os anos de 2000 a 2002, em humanos foram registrados quatro casos (0,33%), sendo que no ano de 2003 nenhum caso humano de raiva foi diagnosticado no estado do Pará (Figura 11).



**Figura 11:** Total de casos positivos para raiva no estado do Pará distribuídos por espécie no período de 2000 a 2003.

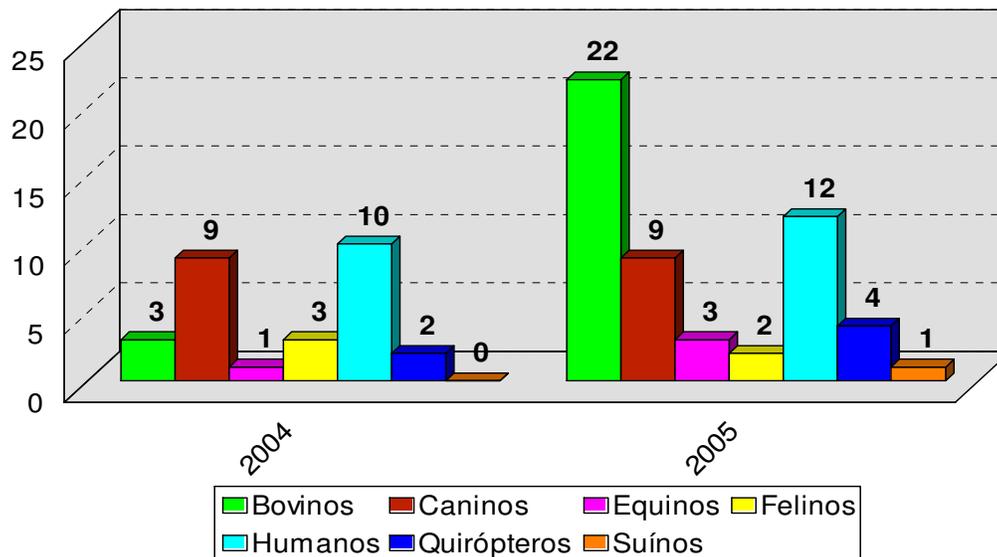
Nota: Dados do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Em 2004, a grande maioria dos casos positivos ficou concentrada na espécie humana, tendo se verificado 10 casos (0,63%) positivos, seguido da

espécie canina com nove (0,57%) e em felinos foram registrados três casos (0,19%). Vale ressaltar que o relato de casos em grandes animais, somente neste ano, foi superior aos anos de 2000 a 2003, sendo observados quatro casos (0,25%), três em bovinos e um em eqüino. Ainda em 2004, foram relatados dois casos positivos em quirópteros (0,12%).

No ano de 2005, um elevado número de casos positivos em animais de produção foi comprovado, com o registro de um total de 26 casos (1,07%), sendo 22 na espécie bovina, três em eqüinos, um em suíno. Um elevado índice de positividade em humanos ainda persistiu neste ano, como pode ser comprovado pelos 12 casos (0,49%) diagnosticados. Esses elevados números de casos em humanos e grandes animais coincidem com as epidemias de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos ocorridos nos municípios de Portel e Viseu em 2004 e Augusto Corrêa em 2005. Essa redução de casos transmitidos por cães e o aumento da transmissão por morcegos, entre os anos de 2000 a 2005, pode ser melhor observada na Figura 12.

A análise estatística pelo Teste “t de *student*” para amostras independentes demonstrou que neste período, não houve relação entre a redução de raiva canina associada a VAg2 e o aumento do número de casos relacionados à VAg3 associados aos casos em quirópteros, suínos e herbívoros, visto que, o valor de (p) obtido foi 0,0234 para o valor de significância de 5% (0,05).

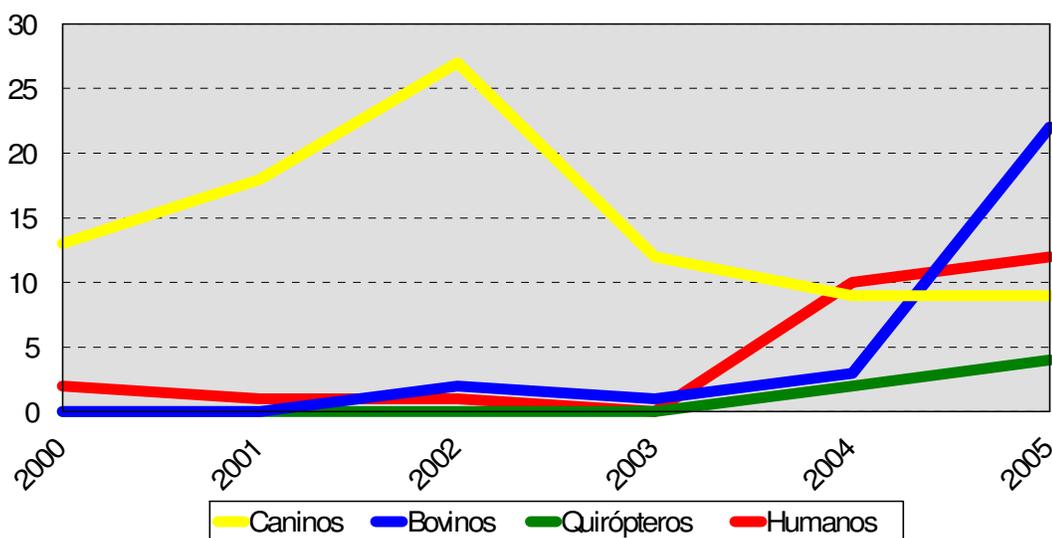


**Figura 12:** Total de casos positivos para raiva no estado do Pará distribuídos por espécie no período de 2004 a 2005

Nota: Dados do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Com o objetivo de verificar se o aumento de casos relacionados a morcegos foi estatisticamente significativo, foi realizado o Teste do Qui-Quadrado obtendo-se o valor de p de 0,0265 para um nível de significância de 0,05 (5%), ou seja, o acréscimo de número de casos positivos relacionados à VAg3 foi estatisticamente significativo (Figura 13).

Realizando o mesmo teste para verificar a significância estatística na redução de casos relacionados à espécie canina o valor obtido de p foi 0,0037 para um nível de significância de 0,05 (5%), mostrando elevada significância estatística na redução dos casos relacionados à VAg2 no período de 2000 a 2005 (Figura 13).



**Figura 13:** Casos de raiva humanos e animais ocorridos no estado do Pará entre os anos de 2000 a 2005, sendo valor de (p) para VAg2 0,0037 e para VAg3 0,0265.

Nota: Dados do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

### 3.2. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL E DETECÇÃO ANTIGÊNICA

Para todas as 62 amostras selecionadas foram obtidos produtos pela RT-PCR. A correlação entre as três referidas técnicas foi de 83,87%, e obtida para 53 amostras. Resultados negativos foram observados apenas para as técnicas de detecção antigênica por IFD, em seis amostras (9,67%), e isolamento do vírus, em três amostras (4,83%). As amostras discordantes por IFD foram: um cão do município de Salinópolis (Can 16405); um suíno de São João do Araguaia (Sui 17738); um cão da região metropolitana de Belém (Can 18132); um morcego frugívoro do município de Portel (Quiropt 18867) e dois

humanos de Augusto Correa (Hum 22903 e Hum 22931). Os três discordantes pela PB foram um cão do município de Santarém (Can 10740), um cão de Ulianópolis (Can 12752) e um bovino de Augusto Corrêa (Bov 22904). Vale ressaltar que destas três amostras, duas na IFD e uma na PB, encontravam-se em adiantado estado de decomposição, o que pode explicar esses resultados diferentes.

Quando feita a correlação IFD e RT-PCR, 56 amostras foram positivas, para a primeira técnica, o que corresponde a 90,32% de positividade em relação à RT-PCR. Fazendo esta mesma comparação com a PB, foram obtidas 59 amostras positivas, representando 95,16% de positividade em relação à RT-PCR.

É importante assinalar que, nenhuma amostra selecionada para este estudo foi retirada devido a não obtenção do genoma viral, ou seja, obteve-se 100% de resultados positivos pela técnica de RT-PCR, independente do estado de conservação das mesmas. (Quadro 5).

**Quadro 5** – Resultados obtidos através das técnicas de IFD, PB e RT-PCR.

<b>Procedência</b>	<b>Ano de Isolamento</b>	<b>Registro da amostra</b>	<b>Resultado IFD</b>	<b>Resultado PB</b>	<b>Resultado RT-PCR</b>
Santarém	2000	Can 10005	+	+	+
Oriximiná	2000	Fel 10083	+	+	+
Rondon do Pará	2000	Can 10422	+	+	+
Santarém	2000	Can 10740	+	-	+
Rondon do Pará	2000	Fel 10950	+	+	+
Marabá	2001	Fel 11669	+	+	+

(Continuação)

**Quadro 5** – Resultados obtidos através das técnicas de IFD, PB e RT-PCR.

<b>Procedência</b>	<b>Ano de Isolamento</b>	<b>Registro da amostra</b>	<b>Resultado IFD</b>	<b>Resultado PB</b>	<b>Resultado RT-PCR</b>
Dom Eliseu	2001	Hum 11950	+	+	+
Marabá	2001	Can 12641	+	+	+
Ulianópolis	2001	Can 12752	+	-	+
Mãe do Rio	2001	Can 12948	+	+	+
Itupiranga	2002	Hum 13597	+	+	+
Marabá	2002	Fel 14133	+	+	+
Peixe-Boi	2002	Can 14327	+	+	+
Belterra	2002	Bov 14664	+	+	+
Marabá	2002	Eq 14717	+	+	+
Conceição do Araguaia	2003	Bov 16207	+	+	+
Salinópolis	2003	Can 16405	-	+	+
Mãe do Rio	2003	Fel 16257	+	+	+
Ipixuna do Pará	2003	Can 17182	+	+	+
São João do Araguaia	2003	Sui 17738	-	+	+
Belém	2003	Can 18132	-	+	+
Marabá	2003	Can 18202	+	+	+
Jacundá	2004	Eq 18727	+	+	+
Portel	2004	Hum 18742	+	+	+
Portel	2004	Hum 18781	+	+	+
Portel	2004	Hum 18782	+	+	+
Portel	2004	Hum 18857	+	+	+
Portel	2004	Quiropt 18867	-	+	+
Portel	2004	Hum 18884	+	+	+
Viseu	2004	Hum 19222	+	+	+
Viseu	2004	Hum 19233	+	+	+
Breves	2004	Bov 19671	+	+	+
Jacundá	2004	Fel 21296	+	+	+
Eldorado do Carajás	2005	Bov 21977	+	+	+
Eldorado do Carajás	2005	Bov 21978	+	+	+

(Continuação)

**Quadro 5** – Resultados obtidos através das técnicas de IFD, PB e RT-PCR.

Procedência	Ano de Isolamento	Registro da amostra	Resultado IFD	Resultado PB	Resultado RT-PCR
Eldorado do Carajás	2005	Bov 21979	+	+	+
Jacundá	2005	Can 22023	+	+	+
Xinguara	2005	Bov 22057	+	+	+
Viseu	2005	Can 22186	+	+	+
Jacundá	2005	Can 22422	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22881	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22895	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22896	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22897	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22899	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22901	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22902	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22903	-	+	+
Augusto Correa	2005	Bov 22904	+	-	+
Augusto Correa	2005	Bov 22928	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 22931	-	+	+
Bragança	2005	Bov 22957	+	+	+
Augusto Correa	2005	Hum 23047	+	+	+
Augusto Correa	2005	Fel 23167	+	+	+
Augusto Correa	2005	Quiropt 23187	+	+	+
Viseu	2005	Bov 23188	+	+	+
Augusto Correa	2005	Bov 23284	+	+	+
Augusto Correa	2005	Eq 23285	+	+	+
Augusto Correa	2005	Sui 23430	+	+	+
Augusto Correa	2005	Bov 23431	+	+	+
Viseu	2005	Bov 23625	+	+	+
Bragança	2005	Bov 23717	+	+	+

**Fonte:** Instituto Evandro Chagas/SVS/MS.

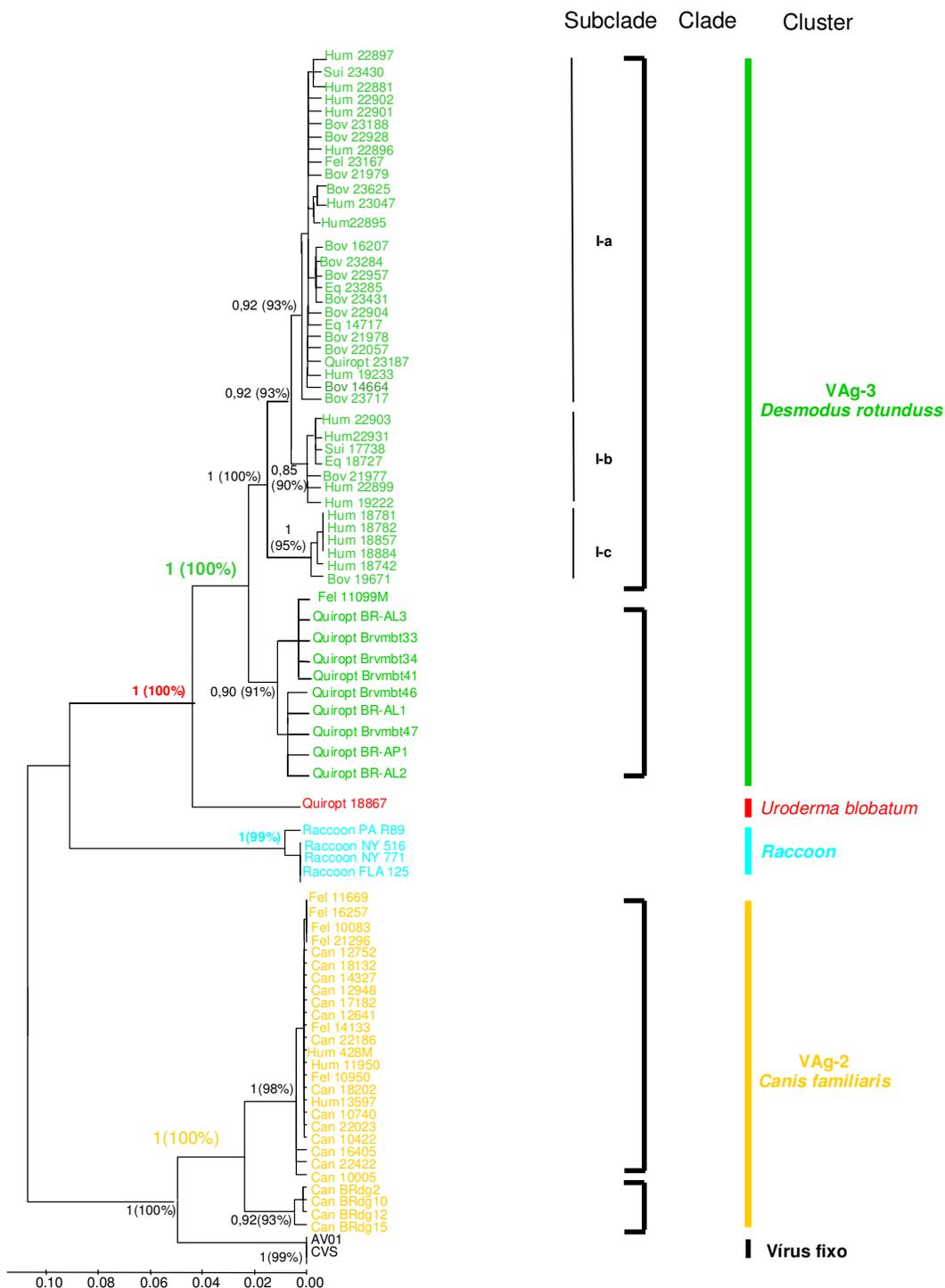
### 3.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA RELACIONADA ÀS VARIANTES ANTIGÊNICAS

A amplificação do genoma do vírus rábico das 62 cepas utilizadas foi obtida através da técnica de RT-PCR. Os produtos desta amplificação, após seqüenciamento nucleotídico geraram seqüências parciais do gene N com aproximadamente 490 nt e determinadas entre as posições 868 e 1359 da nucleoproteína do VR. A análise das seqüências obtidas foi realizada pelo programa BLAST *search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e só então identificadas como cepas do VR pertencentes à variante antigênica 3 (VAg3) relacionada a morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* e variante antigênica 2 (VAg2) relacionada aos cães domésticos.

O processo de análise filogenética deu-se conjuntamente com seqüências de cepas do VR oriundas de outros estados brasileiros, assim como cepas de vírus fixos AV01 (GenBank: X13357) e CVS (GenBank: D42112), bem como cepas da variante de “Raccons” (GenBank: U27218, U27219, U27220 e U27221) da América do Norte (Canadá). A análise filogenética das seqüências nucleotídicas parciais do gene N do VR utilizando os métodos de NJ, MP, MV (modelo selecionado pelo programa Modeltest foi SYM+G; Base=equal Nst=6 Rmat=[1,7919 5,5880 1,2398 1,4125 10,9630], Taxa=gama ,Formato=0,6073, Pinvar=0), bem como o método Bayesiano resultou em árvores com topologias similares. Embora todos os métodos tenham gerados árvores semelhantes, os métodos de MV e Bayesiano evidenciaram topologias mais confiáveis. Neste caso, a topologia gerada pelo

método de MV foi escolhida evidenciando tanto os valores de bootstrap quanto os Bayesianos (Figura 14 e 15).

De acordo com a análise filogenética, todas as cepas estudadas se relacionaram com genótipo I do VR, e ficaram distribuídas em cinco clusters principais relacionadas às distintas variantes antigênicas de acordo com os critérios de inclusão em clusters, clades e subclades cujos valores foram estimados em  $\leq 3\%$ ,  $\leq 1,3\%$  e  $\leq 0,9\%$ , respectivamente: Cluster VAg3, que agrupa cepas relacionadas à variante antigênica de morcegos *Desmodus rotundus* e valor de bootstrap de 100%; Cluster “*Uroderma bilobatum*” com uma única cepa isolada de morcego frugívoro, anteriormente identificada no Instituto Pasteur de São Paulo como *Uroderma bilobatum* (Quiropt 18867), e capturado na localidade de Ajará, município de Portel, estado do Pará com valor de bootstrap de 100%; Cluster “*Raccoon*”, agrupando cepas relacionadas à variante dessa espécie, com valores de bootstrap maiores que 99%; Cluster VAg2 que agrupa cepas relacionadas ao cão doméstico (*Canis familiaris*) e mostra valores de bootstrap de 100%; e Cluster Vírus fixo, agrupando cepas de laboratório (AV01 e CVS) e mostrando valores de bootstrap de 100%. Embora a amostra do VR obtida de *Uroderma bilobatum* esteja geneticamente mais relacionada às cepas da VAg3 de *Desmodus rotundus*, ela forma um cluster isolado, o que parece indicar que se trata de uma possível nova variante, uma vez que o valor de divergência genética de 4,5% foi superior ao valor limítrofe para a formação de clusters que é estabelecido em 3% (Figura 14).



**Figura 14** - Análise filogenética das seqüências nucleotídicas parciais do gene N do *Vírus da raiva* isolados no estado do Pará entre 2000 a 2005. Cor verde representa amostras relacionadas a variante antigênica 3 (VAg3) e cor amarela amostras relacionadas a variante antigênica 2 (VAg2).

### 3.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA RELACIONADA À DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Segundo a distribuição geográfica, no cluster VAg3 são identificadas duas clades distintas: a clade com amostras do Pará (Clade I) e outra com amostra da região Sudeste brasileiro (Clade II), que estão sustentadas por um valor de bootstrap de 100% e valor de divergência genética entre clades de 2,3% (Figura 15).

A clade do Pará (Clade I) está subdividida em três subclades: I-a, I-b e I-c. Na subclade I-a foram agrupadas as cepas provenientes das mesoregiões do Baixo Amazonas, município de Belterra (Bov 14664); mesoregião Nordeste, sendo a maioria das cepas do município de Augusto Correa (Hum 22897, Sui 23430, Hum 22881, Hum 22902, Hum 22901, Bov 22928, Hum 22896, Fel 23167, Hum 23047, Hum 22895, Bov 23284, Eq 23285, Bov 23431, Bov 22904 e Quiropt 23187); além dos municípios de Bragança (Bov 22957) e Viseu (Bov 23188, Bov 23625, Hum 19233 e Bov 23717); da mesoregião Sudeste, as cepas dos municípios de Eldorado do Carajás (Bov 21979, Bov 21978), Conceição do Araguaia (Bov 16207), Marabá (Eq 14717) e Xinguara (Bov 22057).

A subclade I-b agrupa quatro cepas da mesoregião Nordeste, sendo três cepas de Augusto Correa (Hum 22899, Hum 22903 e Hum 22931) e uma de Viseu (Hum 19222), e três da mesoregião Sudeste, sendo uma cepa de São João do Araguaia (Sui 17738), uma de Jacundá (Eq 18727), e uma de Eldorado do Carajás (Bov 21977).

A subclade I-c, relaciona-se com as cepas da mesoregião do Marajó, incluindo os isolamentos do surto de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos no município de Portel (Hum 18781, Hum 18782, Hum 18857, Hum 18884 e Hum 18742), em 2004 e uma cepa de Breves (Bov 19671).

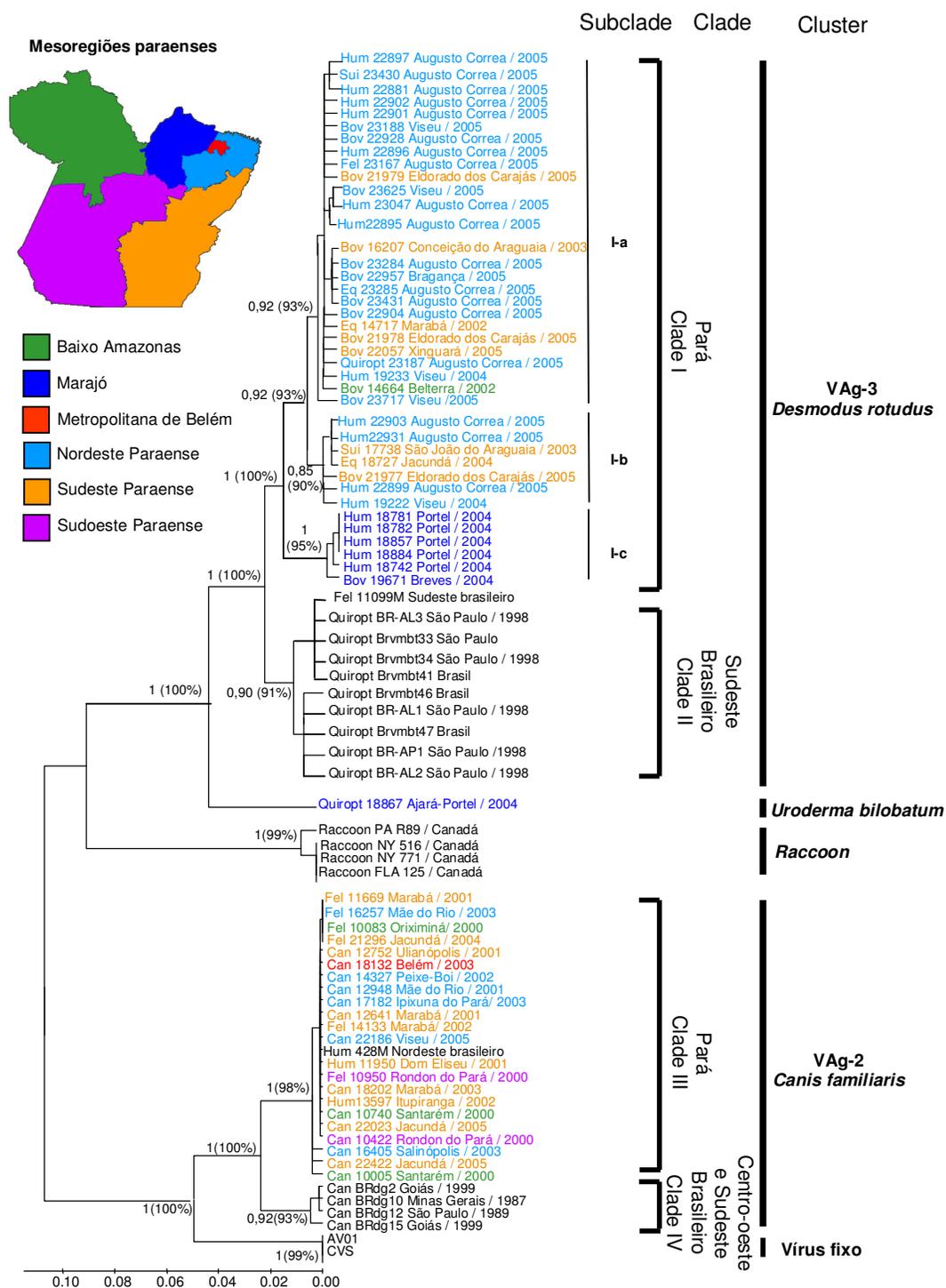
A clade relacionada à região Sudeste brasileiro (Clade II) inclui as cepas isoladas de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* sp. (BR-AL1, GenBank: AB117969; BR-AL-2, GenBank: AB117970; BR-AL3, GenBank: AB117971; e BR-AP1, GenBank: AB117972), cepas isoladas no estado de São Paulo (Quiropt Brvmbt34, GenBank: AB083807 e Quiropt Brvmbt33, GenBank: AB083806) e três amostras de quirópteros (Quiropt Brvmbt41 GenBank: AB083812, Quiropt Brvmbt46, GenBank: AB083816 e Quiropt Brvmbt47, GenBank: AB083815) e uma de felino (Fel 11099M, GenBank: AY563517) com o local de isolamento desconhecido.

No cluster "*Uroderma bilobatum*" está inserida uma única cepa proveniente de um quiróptero dessa espécie (Quiropt 18867), oriunda de Portel e isolada durante a ocorrência do surto de raiva humana em 2004, e que está constituindo uma clade distinta das demais. No cluster "*Raccoon*" estão agrupadas todas as cepas relacionadas à "*Raccoon*" (FLA 125, GenBank: U27220; NY 516, GenBank: U27218; NY 771, GenBank: U27219 e PA R89, GenBank: U27221) isoladas no Canadá.

O cluster VAg2 pode ser dividido em duas clades: a clade III e IV, apresentando valores de bootstrap de 100% e valor de divergência genética de 2,5%. Na clade III estão agrupadas as cepas de cães, de felinos e de um humano isoladas no estado do Pará, provenientes das mesoregiões do Baixo

Amazonas, municípios de Oriximiná (Fel 10083) e Santarém (Can 10740 e Can 10005); do Nordeste, municípios de Ipixuna do Pará (Can 17182), Mãe do Rio (Fel 16257 e Can 12948), Peixe-Boi (Can 14327), Salinópolis (Can 16405) e Viseu (Can 22186); Sudeste, com cepas de Dom Eliseu (Hum 11950), Jacundá (Fel 21296, Can 22023 e Can 22422), Marabá (Fel 11669, Can 12641, Fel 14133 e Can 18202), Itupiranga (Hum 13597) e Ulianópolis (Can 12752); Sudoeste, que contribuiu com cepas de Rondon do Pará (Fel 10950 e Can 10422); e Metropolitana de Belém, representada com cepa do município de Belém (Can 18132); bem como uma amostra da região Nordeste do Brasil (Hum 428M).

Na clade IV, relacionada às regiões do Centro-oeste e Sudeste brasileiro, agruparam-se as cepas isoladas nos estados de Goiás (Can BRdg2 GenBank: AB083792 e Can BRdg15 GenBank:AB083798); Minas Gerais (Can BRdg10 GenBank:AB083796) e São Paulo (Can BRdg12 GenBank:AB083797).



**Figura 15**— Análise filogenética das seqüências nucleotídicas parciais do gene N do VR isolados no estado do Pará entre 2000 e 2005. As análises Bayesianas e de MV foram empregadas para a construção da árvore. Valores Bayesianos e de bootstrap para o método de MV (no interior de parênteses) encontram-se acima do nó de cada grupo principal. O comprimento total da barra corresponde a 10% (0,10) de divergência nucleotídica com escala de divergência fixada para 2% (0,02).

#### 4. DISCUSSÃO

É notória, de longa data, a distribuição cosmopolita do genótipo I do VR, bem como o seu impacto em saúde pública e na economia mundial, pois ele é responsável por números significativos de óbitos em humanos e animais de interesse econômico, respectivamente (Belotto, 2001; Rupprecht *et al.*, 2002). Esse fato justifica a realização de vários estudos baseados no genótipo I do VR, muito embora inúmeras pesquisas realizadas tenham melhorado significativamente o entendimento sobre esse agente viral. Vários aspectos do ciclo biológico, modo de transmissão, caracterização molecular e epidemiologia, produção de vacinas, dentre outros têm sido amplamente descritos e recentemente revistos (Hemachudha *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2002; Rupprecht *et al.*, 2002).

Por outro lado, os estudos moleculares sobre o VR têm claramente demonstrado a importância da obtenção de seqüências nucleotídicas que possibilitem traçar estratégias moleculares para uma detecção rápida, sensível e específica do VR. Molecularmente, o gene N vem sendo amplamente utilizado, pois ressalta pequenas variações filogenéticas, que permitem identificar diferentes genótipos virais (Heaton *et al.*, 1997). Esse fato permite uma abordagem mais completa acerca da caracterização viral, bem como o reconhecimento do relacionamento de espécies hospedeiras, sua distribuição geográfica, dentre outros, o que tem contribuído de forma decisiva na compreensão da epidemiologia molecular da raiva (Nadin-Davis, 1998; Badrane *et al.*, 2001).

Até meados de 1980, em alguns países da América Latina, a raiva canina era considerada endêmica. Mais recentemente, um estudo realizado por Belloto *et al.*, (2005) demonstrou que a situação epidemiológica da doença havia piorado já que, entre os anos de 1993 a 2002, o número de casos de raiva canina e raiva humana havia aumentado em aproximadamente 80% na América Latina, sendo que somente no ano de 2002 foram notificados 39 casos humanos, 63% deles transmitidos por cães.

Esse panorama dramático, contudo, foi revertido através de ações estratégicas de saúde pública tais como: vacinação em massa de cães e administração adequada do tratamento profilático humano às pessoas expostas ao vírus, posto que, até então, tais esforços não eram realizados adequadamente. No Brasil, somente no ano de 2004 o governo investiu cerca de 28 milhões de dólares na profilaxia e controle da raiva. Esse montante incluiu vacinas de uso humano e animal, imunoglobulinas, diagnóstico laboratorial, treinamento de recursos humanos e campanhas de vacinação de cães. Não estão incluídas nesse valor, entretanto, as despesas relacionadas à prevenção da raiva transmitida por morcegos hematófagos aos humanos e herbívoros (WHO, 2005). Porém, é importante ressaltar que essas medidas de controle não teriam sucesso sem o apoio dos programas de vigilância epidemiológica e laboratorial, bem como o entendimento da dinâmica populacional canina nas áreas endêmicas (Warrell & Warrell, 2004; Wunner, 2005).

Atualmente, a ameaça reside na transmissão da raiva de reservatórios selvagens para animais domésticos e principalmente para o

homem. De acordo com dados da Organização PanAmericana de Saúde (OPAS), é reconhecido que entre os anos de 1995 e 2000 os morcegos hematófagos ocuparam o segundo lugar na transmissão da raiva humana na América Latina, superados apenas pelos cães, e ainda que, no período foram notificados 105 casos de raiva humana transmitida por *Desmodus rotundus* nas Américas, representando 20% do total diagnosticado em humanos (Belotto, 2003).

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 permitiu a redução progressiva do número de casos positivos, principalmente de cães em parte devido ao uso de novas ferramentas para o diagnóstico como sejam a caracterização antigênica com anticorpos monoclonais, seqüenciamento nucleotídico e análise filogenética, em parte também devido às alterações ambientais que tem prejudicado os *habitats* dos morcegos, facilitando o contato desses animais com animais domésticos e seres humanos. Em decorrência disso, o morcego tem emergido como o mais importante transmissor da raiva atualmente na América Latina, como tem sido observado em todos os países onde a raiva urbana encontra-se sob controle (Almeida *et al.*, 2005; Rupprecht, *et al.*, 2002; Toporovski *et al.*, 2005).

A raiva silvestre assumiu maior importância também devido aos hábitos sinantrópicos destes animais que alcançaram as áreas urbanas e de transição, em conseqüência da menor oferta de alimentos em seu *habitat*, e principalmente, como anteriormente mencionado, o impacto ambiental provocado pela ação humana em seus *habitats*. Isto provocou o deslocamento

da população de morcegos silvestres para as áreas habitadas pelo homem. A ocorrência desses fatos no Brasil permitiu ao Programa Nacional de Controle da Raiva (PNCR), coordenado pelo Ministério da Saúde, um novo olhar para a questão da raiva silvestre, particularmente dos canídeos e de morcegos hematófagos e não hematófagos em áreas urbanas, sem que ocorressem prejuízos à sistemática vigilância epidemiológica da raiva canina no país (Kotait *et al.*, 2007).

O aumento de casos de raiva transmitida por morcegos, hematófagos ou não, e a redução de casos transmitidos por cães, também pôde ser observada em outros países das Américas. No México, Velasco-Villa *et al.*, (2002) citam que em 1990 foram notificados 60 casos de raiva humana transmitida por cães, contrastando com apenas um caso humano de transmissão por morcegos em 2000. Essa redução é consequência de uma diminuição significativa da raiva canina, de 8706 casos em 1990, para 261 casos em 2000, como resultado de campanhas de vacinação de cães, que alcançou cerca de 14 milhões de doses aplicadas. Em contrapartida, naquele País, a taxa de casos de raiva humana associada a reservatórios silvestres aumentou de 6% em 1990, para 80% em 2000 (Velasco-Villa *et al.*, 2002; 2006).

Ressalta-se que a raiva em morcegos hematófagos especialmente os da espécie *Desmodus rotundus* representa uma ameaça à saúde pública na América Latina, porém, várias outras espécies de morcegos, hematófagos ou não, podem estar desempenhando um papel importante como reservatórios de VR permanecendo até então imperceptíveis ou silenciosos, tal

qual foi detectado no México (Velasco-Villa *et al.*, 2006). No Chile, por exemplo, somente casos esporádicos de raiva em animais domésticos têm sido relatados desde 1980, e morcegos hematófagos e não hematófagos, especificamente a espécie *Tadarida brasiliensis*, tem se mantido como o mais importante reservatório silvestre e potencial transmissor de raiva naquele país (De Mattos *et al.*, 2000).

O complexo ciclo de manutenção do vírus rábico envolve diversos hospedeiros que apresentam uma estreita relação às variantes antigênicas específicas, determinadas através de um painel de anticorpos monoclonais (AcM) produzidos pelo CDC/Atlanta(EUA) (Diaz *et al.*, 1994; Favoretto *et al.*, 2002). No Brasil são encontradas quatro variantes: VAg2, VAg3, VAg4 e VAg6. Na espécie canina (*Canis familiaris*) é comumente identificada a VAg2. A VAg3 é relacionada epidemiologicamente aos morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, também sendo comumente encontrada em animais de produção como bovinos, eqüinos, suínos, caprinos, etc, visto que, esta espécie de morcego apresenta um hábito alimentar eletivo, obtendo preferencialmente sangue desses animais quando então pode transmitir a raiva aos mesmos. As variantes VAg4 e VAg6 têm sido encontradas em morcegos insetívoros das espécies *Tadarida brasiliensis* e *Lasiurus cinereus*, respectivamente (Favoretto *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 1994).

O homem e os felinos domésticos são considerados hospedeiros acidentais, 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).

O estudo realizado com amostras isoladas no estado do Pará corrobora com os dados da literatura, já que se verifica a circulação genótipo I representado pelas variantes VAg2 e VAg3 (Belotto, 2001; Favoretto *et al.*, 2002; Rupprecht *et al.*, 2002). Baseado nos resultados da análise estatística, pôde-se comprovar a independência entre os ciclos de manutenção das variantes em questão, por apresentarem transmissores distintos, cães domésticos e morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, respectivamente. Observou-se a circulação da VAg2 entre as espécies humana (Hum 11950 e Hum 13597) e felina, além do cão, e da VAg3 observada entre as espécies humana, felina (Fel 23167), bovina, eqüina, quirópteros e suína. Vale ressaltar que o isolamento de ambas as variantes em amostras humanas e felinas, correlaciona essas espécies como hospedeiros acidentais, tal qual relata a literatura (Kobayashi *et al.*, 2006).

No Brasil, são encontrados todos os ciclos epidemiológicos: ciclos urbano, rural e os ciclos silvestres terrestre e aéreo (Takaoka *et al.*, 2003). Alguns fatores, entre eles antropológicos, pressionaram fortemente estes ciclos para o aumento ou diminuição do número de casos de raiva associados aos principais hospedeiros que mantêm estes ciclos. No caso dos ciclos silvestres, populações humanas invadiram áreas antes não habitadas, e mudaram o ambiente drasticamente nas últimas décadas, estabelecendo novas associações entre morcegos vampiros e animais domésticos como bovinos, eqüinos, suínos e caninos, bem como com humanos, visto que, os morcegos foram forçados a buscar novas fontes de alimento, devido à escassez de animais silvestres o que gerou um aumento do número de casos de raiva

transmitida por morcegos em humanos e animais de produção (Belotto, 2003; Travassos da Rosa *et al.*, 2006). Deste modo, é possível que o VR tenha iniciado sua adaptação em novos hospedeiros, o que tem resultado em uma variedade de espécies animais infectadas.

Esse panorama atual da raiva também se reflete no estado do Pará (SESPA, 2004). De fato, baseado em um levantamento do número de casos de raiva diagnosticados no IEC entre o período de 2000 a 2005, foi demonstrado uma importante diminuição de casos de raiva humana relacionados ao cão (VAg2) e um aumento significativo de casos associados à transmissão por morcego (VAg3). Essas alterações foram comprovadas pelos testes estatísticos “t de *student*” e qui-quadrado durante as análises deste estudo mostrando resultados significativos.

No período de estudo, a emergência da raiva transmitida por morcegos hematófagos foi aumentando paulatinamente, através do diagnóstico de casos de raiva em herbívoros e em morcegos, culminando com a ocorrência das epidemias de raiva humana registrados nos municípios paraenses de Viseu e Portel, em 2004 (Travassos da Rosa *et al.*, 2006), e Augusto Correa, em 2005 (Barbosa *et al.*, 2007).

A análise filogenética dos 62 isolamentos do VR estudados nesta série, identificou linhagens distintas entre as variantes circulantes no Pará, demonstrando uma importante correlação dessas linhagens com a distribuição geográfica, dentro do estado e em relação ao restante do país (Figura 14). Com efeito, todas as amostras de VAg2 do estado do Pará estudadas, independente da mesorregião, são estritamente relacionadas entre si e com a

amostra VAg2 proveniente do nordeste brasileiro (Hum 428M GenBank: AY563516), o que se deve, provavelmente, à proximidade geográfica 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. Tais amostras, por sua vez, são claramente distintas da linhagem VAg2 circulante no Centro-Oeste e Sudeste do país, sugerindo que ambos os grupos filogenéticos (clades III e IV) apresentam origens evolutivas diferentes (Figura 15).

Quanto a VAg3, o filograma mostrou um ancestral comum que deu origem a três linhagens no estado do Pará (subclades I-a, I-b e I-c), sendo duas circulantes nas mesorregiões do Baixo Amazonas, Nordeste e Sudeste (subclades I-a e I-b) e uma restrita a mesoregião do Marajó (subclade I-c).

A grande maioria das amostras isoladas em Augusto Correa durante o surto de 2005 (Barbosa *et al.*, 2007, comunicação pessoal) estão relacionadas com a amostra de humano isolada durante o surto de Viseu em 2004 (Hum 19222, GenBank: DQ097075) (Travassos da Rosa *et al.*, 2006), sendo identificada pela linhagem da subclade I-a, muito embora três amostras de Augusto Correa (Hum 22903, Hum 22931 e Hum 22899) estejam incluídas num grupo distinto (subclade I-b) juntamente com as cepas de São João do Araguaia (Sui 17738), Jacundá (Eq 18727), e Eldorado dos Carajás (Bov 21977). Corroborando com Travassos da Rosa *et al.* (2006), que previamente descreveu a distinção das cepas de Portel com relação a outras cepas do restante do país, bem como a cepa de Viseu (Hum 19222), este trabalho também mostrou diferenças genéticas significativas entre as amostras de

Portel com outras amostras do estado do Pará, e sua associação com a amostra proveniente do município de Breves (Bov 19671), na Ilha do Marajó, o que sugere a circulação de uma linhagem distinta do VR na mesoregião do Marajó, definindo-a como uma região singular para a manutenção do ciclo silvestre aéreo do VR (subclade I-c).

Nota-se ademais, que essas linhagens paraenses apresentam um ancestral diferente das cepas encontradas na região Sudeste do país (clade II), que se relacionou às amostras isoladas de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*, capturados no estado de São Paulo em 1998 (Shoji *et al.*, 2004), com outras amostras isoladas de morcegos *Desmodus rotundus* capturados também no estado de São Paulo (Quiropt Brvmbt33 e Quiropt Brvmbt34) e em outros estados não identificados (Quiropt Brvmbt41, Quiropt Brvmbt46 e Quiropt Brvmbt47) (Ito *et al.*, 2003) e uma amostra de felino (Fel 11099M) (Ito *et al.*, 2001).

Interessante, além da VAg3, pode estar circulando no Marajó uma possível nova variante antigênica (Quiropt 18867) isolada a partir de um morcego frugívoro da espécie *Uroderma bilobatum* capturado na localidade de Ajará, em Portel, durante a ocorrência do surto em 2004. Vale ressaltar que essa informação baseia-se tanto na tipificação antigênica, visto que esta amostra apresentou um padrão de leitura diferenciado das variantes antigênicas circulantes na América Latina, reagindo com todos os oito AcM disponíveis (C1, C4, C9, C10, C12, C15, C18, e C19) o que não se observou até o presente com as conhecidas variantes circulantes na América Latina, quanto pelo seqüenciamento parcial do gene N, já que a análise filogenética

sugeriu que esta amostra está relacionada com a variante de *Desmodus rotundus*, porém apresentando divergência genética suficiente (>4,4%) para ser considerada como uma nova variante portanto bem acima do mínimo aceitável que é de 3%.

Os dados da literatura científica têm mostrado que morcegos frugívoros são hospedeiros de variantes antigênicas específicas tal como a VAg4 identificada em morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis* e a VAg6 identificada em morcegos *Lasiurus cinereus* (De Mattos *et al.*, 2000; Velasco-Villa *et al.*, 2006). Vale ressaltar que com base no estudo das caracterizações antigênicas têm sido sugeridas possíveis novas variantes, como observado para a amostra de sagüi (*Callithrix jacchus*) isolada no estado do Ceará (Morais *et al.*, 2000; Favoretto *et al.*, 2001). É interessante assinalar, no entanto, que para confirmação da hipótese de uma nova variante do *Vírus da raiva* circulando na Ilha do Marajó, estudos adicionais tornam-se necessários, incluindo a caracterização molecular completa do gene N, o que deve ser objeto de novo estudo em breve.

Finalmente, é importante assinalar que os dados da epidemiologia da Raiva no estado do Pará mostraram o aumento dos casos relacionados a morcegos em detrimento dos casos relacionados a cães, e que a análise filogenética mostrou uma grande prevalência das amostras analisadas relacionadas à VAg3, característica de morcegos *Desmodus rotundus*. Comparando-se ambas as análises, os dados, obtidos corroboram com o perfil epidemiológico e molecular atual demonstrado para a Raiva no Novo Mundo, que é o morcego emergindo como o grande transmissor de raiva

nas Américas. O grande desafio agora da vigilância epidemiológica e dos programas de controle da Raiva é controlar a transmissão do VR por esses hospedeiros.

## 5. CONCLUSÕES

1. No estado do Pará, observou-se a circulação da variante de VAg2, nas mesoregiões do Baixo Amazonas, Metropolitana de Belém, Nordeste, Sudeste e Sudoeste, e da variante VAg3 nas mesoregiões do Baixo Amazonas, Marajó, Nordeste e Sudeste;

2. Observou-se a emergência da VAg3 em que o morcego hematófago *Desmodus rotundus* surge como o principal transmissor de raiva na região;

3. No período de 2000 a 2005, os dados epidemiológicos demonstraram uma significativa diminuição da transmissão da raiva entre cão-cão e cão-humano, em contrapartida houve um aumento relevante da transmissão de casos relacionados aos morcegos hematófagos (VAg3) observada em animais de produção, principalmente bovinos, e em humanos;

4. Observou-se no estado do Pará, uma única linhagem viral da VAg2 circulante e que é similar àquela encontrada no Nordeste brasileiro e distinta da circulante nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do país, sugerindo que a imigração nordestina tem contribuído para a manutenção da VAg2 circulante no Estado;

5. Três sub-linhagens distintas relacionadas à VAg3 do *Vírus da raiva* foram identificadas no estado do Pará, duas das quais foram encontradas na área continental do Estado e uma restrita a mesoregião do Marajó;

6. Foi identificada uma provável nova variante do *Vírus da raiva* relacionada ao morcego frugívoro *Uroderma bilobatum*, que embora relacionada, é distinta da VAg3;

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. F.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; SILVA, M. M. S. Diagnóstico laboratorial da raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 28: 341-344,1994.
- 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.
- AMENGUAL, B.; WHITBY, J. E.; KING, A.; SERRA COBO, J.; BOURHY, H. Evolution of European bat lyssaviruses. **Journal of General Virology**, **78**: 2319-2328, 1997.
- AYRES, M.; JUNIOR-AYRES, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 4.0**. Aplicações estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Sociedade Civil Mamirauá/ MCT-CNPQ/ Conservation International. 2006.
- AZEVEDO, M. B. Raiva. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, 10(4): 233-241, 1981.
- BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, O.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, **75**: 3268-3276, 2001.

- BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the carnivore orders. **Journal of Virology**, **75**: 8096-104, 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. (2007) Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. **Virology**, no prelo.
- 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. **Programas e Resumos**. p. 24-25.
- BELOTTO, A. J. Raiva transmitida por morcegos nas Américas. **Boletim do Instituto Pasteur**, **7**: 2, 2003.
- BELOTTO, A.; LEANES, L.F.; SCHNEIDER, M. C.; TAMAYO, H.; CORREA, C. Overview of rabies in the Americas. **Virus Research**, **111**: 5-12, 2005.
- BLAST search**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> >. Acesso em: 06/06/2007.
- BOULGER, I. R.; PORTERFIELD, J. S. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **52**: 421-424, 1958.
- BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity of the lyssavirus genus. **Virology**, **194**: 70-81, 1993.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Morcegos em áreas urbanas e rurais: **Manual de manejo e controle**. Brasília: FNS, 1998. 117p.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva humana transmitida por morcegos em Viseu, Pará.** Distrito Federal, 2004a. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/destaque/raiva.htm>. Acesso em 03/06/2005.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva: Situação da doença no Brasil.** Brasília, 2004b. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21831](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21831)>. Acesso em 13/06/2007.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva Humana Transmitida por Morcegos no Estado do Maranhão.** Brasília: M.S.,2005a.p.1-5.

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 06/01/2007.

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.

BUSCHOTEN, H.; KLAPMUTS, R. J.; CLOASSEN, I. J.; REYNEVELD, S. D.; OSTERHAUS, A. D.; UYTDEHAAG, F. G. rabies virus-specific human T-cell

clones provide help for an "in vitro" antibody response against neutralizing antibody-inducing determinants of viral glycoprotein. **The Journal of General Virology**, **70(6)**: 513-21, 1989.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Human rabies prevention**, United States, 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvr/rabies/Professional/acip/ACIP99.htm>>. Acesso em 24/01/2006.

CHARLTON, K. M.; CASEY, G. A.; CAMPBELL, J.B. Experimental rabies in skunks: mechanisms of infection of the salivary glands. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, **47**: 363-369,1993.

CORRÊA, W. M. & CORRÊA, C. N. M. Raiva. In: **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. CORRÊA, W. M. & CORRÊA, C. N. M.(eds). São Paulo, Medsi, 1992. p.609-628.

COSTA, W.A. Raiva. In: **Infectologia Pediátrica**. FARHAT, C. K.; CARVALHO, E. S.; CARVALHO, L. H.F.R.; SUCCI, R.C.M. (eds).São Paulo, Atheneu, 1998. p.460-473.

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y.; GACOIN, A.; GAROFF, C.; BOURHY, H. Intravital Diagnosis of Human Rabies by PCR using Saliva and Cerebrospinal Fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, **36(4)**:1117-1121, 1998.

DANTAS JÚNIOR, J. V.; KIMURA, L. M. S.; FERREIRA, M. S. R.; FIALHO, A. M.; ALMEIDA, M. M. S.; GRÉGIO, C. R. V.; ROMIJN. P. C.; LEITE, J. P. G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus

- detection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **56**: 1-5, 2004.
- DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASU, P. The fluorescence antibody test. In: **Laboratories Techniques in Rabies**. MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H.(eds.).Geneva, World Health Organization, 1996. p.88-95.
- 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.
- DIAZ, A. M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic Analysis of Rabies-virus Isolates from Latin America and the Caribbean. **Journal of Veterinary Medical Biological**, **41**: 153-160, 1994.
- DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C. E.; FU, Z. F.; KOPROWSKI, H. Rhabdoviruses. In: **Virology**. FIELDS, B. N.; WOLDEHIWET, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds). Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers,1996. p.1137-1159.
- DUARTE, L.; DRAGO, M. C. **A Raiva**. Portugal, Universidade de Évora. Disponível em: <[http://www.evunix.uevora.pt/sinogas/TRABALHOS/2004/Raiva\\_files/image014.jpg](http://www.evunix.uevora.pt/sinogas/TRABALHOS/2004/Raiva_files/image014.jpg)>. Acesso em 12/12/2005.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses: Family Rhabdoviridae. In: **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Virology

- Division International Union of Microbiological Societies. Elsevier Academic Press. 2005. p. 623-633.
- FAVI, M.; DE MATTOS, C. A.; YUNG, V.; CHALA, E.; LOPEZ, L. R.; DE MATTOS, C. C. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerging Infectious Disease**, **8**: 79-81, 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**, **7**: 1062-1065, 2001.
- 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**: 91-95, 2002.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, **39**: 783-791, 1985.
- FEKADU, M.; SHADOCK, J. H. Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. **American Journal Veterinary Research**, **45**: 724-729, 1984.
- FERNANDES, C. G. Raiva. In: **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. (eds). São Paulo, Varela Editora e Livraria, 2001. p.149-162.
- FINKE, E.; CONZELMANN, K. Replication strategies of rabies virus. **Virus Research**, **111**: 120-131, 2005.

GAUDIN,Y.; TUFFEREAU,C.; DURRER,P.; BRUNNER,J.; FLAMAND,A.;  
RUIGROK,R. Rabies virus-induced membrane fusion. **Molecular Membrane  
Biology**,**16**:21-31,1999.

**GenBank.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em:  
31/08/2007

GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública**,  
**28**: 86-91, 1994.

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, O.; ISHIZUA, M. M.; SILVA, E. G. Avaliação de  
Três Cepas de Vírus Rábico, Antigenicamente Distintas, em Camundongos.  
II- Estudo da Disseminação Viral, por Diferentes Órgãos. **Revista Saúde  
Pública**, **22**: 473-478, 1988.

GONÇALVES, J.L.S.; VON HUBINGER, M.G.; WERMELINGER, M.C.M.W.  
Viroses do Sistema Nervoso Central. In: **Introdução à Virologia Humana**.  
SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. (eds).Rio de Janeiro,  
Guanabara Koogan, 2002. p.157-164.

GONÇALVES, M. A. S.; SÁ-NETO, R. J.; BRAZIL, T. K. Outbreaks of  
agressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in  
northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,  
**35**: 461-464, 2002.

GOULD, A. R.; KATTENBELT, J. A.; GUMLEY, S. G.; LUNT, R. A.  
Characterization of an Australian bat lyssavirus variant isolated from an  
insectivorous bat. **Virus Research**, **89**: 1-28, 2002.

- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, **52**:696-704, 2003.
- GUYATT, J. K.; TWIN, J.; DAVIS, P.; HOLMES, E. C.; SMITH, G. A.; SMITH, I. L.; MACKENZIE, J. S.; YOUNG, P. L. A molecular epidemiological study of Australian bat lyssavirus. **Journal of General Virology**, **84**: 485-496, 2003.
- 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**, **35**:2762-2766, 1997.
- HELMICK, C.G.; TAUXE, R.V.; VERNON, A.A. Is there a risk to contacts of patients with rabies?. **Reviews of Infectious Diseases**, **9**:511-518, 1987.
- HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C. H. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenger. **Lancet Neurology**, **1**: 101-109, 2002.
- 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.
- HINRICHSEN, S. L.; NOVA, A. V.; RENGELL, F. S. Raiva. In: **Tratado de Infectologia**. FOCACCIA, R. (ed). São Paulo, Atheneu. 2005. p. 633-648.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBAYES: Bayesian inference Of phylogeny. **Bioinformatics**, **17**: 754–755, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA (IBGE). Divisão MAPAS33441148189 [2006]. Banco de dados agregados. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 18/08/2006.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES (ISID). ProMED-mail. **Rabies Transmission through Organ Donation**. Disponível: <[http://www.promedmail.org/pls/promed/f?=2400:1001::NO::F2400\\_P1001\\_B ACK\\_PAGE,F2400\\_1001\\_PUB\\_MAIL\\_ID:1000%2C28141](http://www.promedmail.org/pls/promed/f?=2400:1001::NO::F2400_P1001_B ACK_PAGE,F2400_1001_PUB_MAIL_ID:1000%2C28141)> Archive number 20050218.0539. Acesso em 07/04/2005.

**Invitrogen**. Disponível em: <<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>>. Acesso em: 10/01/2006.

ITO, M.; ARAI, T. A.; ITOU, T. Genetic characterization and geographic distribution of rabies vírus isolates in Brazil: Identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, **284**: 214-222, 2001.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y. 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 Clinical Virology**, **26**: 317-330, 2003.

JACKSON, A. C. Rabies. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**, **27**: 278-283, 2000.

JACKSON, A. C. Update on rabies. **Current Opinion in Neurology**, **15**: 327-331, 2002.

- KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMOKE, R. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. **Journal of Infectious Diseases**, **167**: 207-210, 1993.
- KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: **Laboratories Techniques in Rabies**. MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H.(eds.). Geneva, World Health Organization, 1996. p. 03-08.
- KELLY, R. M.; STRICK, P.L. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous systems. **Journal of Neuroscience Methods**, **103**: 63-71, 2000.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of General Virology**, **77**: 1761-1768, 1980.
- KIMURA, L.M.S. **Epidemiologia molecular do vírus da raiva detectados em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil**. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde & Fundação Osvaldo Cruz, 2006. 94 p.
- 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 bovine rabies in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, **68**:1097-1100, 2006.
- 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.; JÚNIOR, P. C.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; FERREIRA, K. C. S.; ACHKAR, S. M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa)**, **4 (40)**, **2007**. Disponível em <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40\\_raiva.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40_raiva.htm)>. Acesso em: 04/06/2007.
- KREBS, J. W.; WHEELING, J. T.; CHILDS, J. E. Rabies surveillance in the United States during 2002. **Journal of American Veterinary Association**, **223**: 1736-1748, 2003.
- KREBS, J. W.; MANDEL, E. J.; SWERDLOW, D. L.; RUPPRECHT, C. E. Rabies surveillance in the United States during 2003. **Journal of American Veterinary Association**, **225**: 1837-1849, 2004.
- KUMAR S.; TAMURA K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** **5**:150-163, 2004.
- 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**, **111**: 28-43, 2005.
- LEMOS, H.N.; SOUZA, M.M. Reações adversas na vacinação anti-rábica humana. **A Folha Médica**, **101(5)**: 299-303, 1990.
- LICATA, J. M.; HARTY, R. N. Rhabdoviruses and apoptosis. **International Reviews of Immunology**, **22**: 451-476, 2003.

- LUMIO, J.; HILLBOM, M.; ROINE, R.; KETONEN, L.; HALTIA, M.; VALLE, M.; NEUVONEN, E.; LAHDEVIKTRA, J. Human rabies of bat origin in Europe. **Lancet**, **15**: 378, 1986.
- MADHUSUDANA, S. N. Rabies: An ancient disease that still prevails. **Indian Journal of Medical Research**, **122**: 4-6, 2005.
- MARQUES, G.H.F.; KOTAIT, I. Situação epidemiológica da raiva dos herbívoros no Brasil. In: Seminário Internacional – Morcegos como transmissores da raiva, 2001, São Paulo. **Programas e Resumos**. p.27-28.
- MEREDITH, C. D.; ROSSOUW, A. R.; VAN PRAAG KOCH, H. An unusual case of human rabies thought to be of Chiropteran origin. **South African Medical Journal**, **45**: 767-769, 1971.
- MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratories techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: **Laboratories Techniques in Rabies**. MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H.(eds.). Geneva, World Health Organization, 1996, p. 9-27.
- 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**, **95**(5): 609-610, 2000.
- NADIN-DAVIS, S. A. Polymerase chain reaction protocols for rabies vírus discrimination. **Journal of Virological Methods**, **75**: 1-8, 1998.
- NATARAJAN, M.; MUKUNDAN, P.; JOHN, T.J. Immune response to purified chick embryo cell culture rabies vaccine manufactured in Índia. **Indian Journal of Medical Research**, **95**: 51-53, 1992.

- PEIXOTO, Z. M. P.; CUNHA, E. M. S.; SACRAMENTO, D. R. V.; SOUZA, M. C. A. M.; SILVA, L. H. Q.; GERMANO, P. L.; KROEFF, S. S.; KOTAIT, I. Rabies Laboratory Diagnosis: Peculiar Features of Samples from Equine Origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, **31**: 01-07, 2000.
- PLOTKIN, S. A. Rabies. **Clinical Infectious Disease**, **30**: 4-12, 2000.
- POISSON, N.; REAL, R.; GAUDIN, Y.; VANEY, M.C.; KING, S.; JACOB, Y.; TORDO, N.; BLONDEL, D. Molecular basis virus phosphoprotein P and te dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. **The Journal of General Virology**, **82**: 2691-96, 2001.
- POSADA, D.; CRANDALL, K .A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, **14 (9)**: 817-818, 1998.
- REZENDE, M.B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; VASCONCELOS, P.F.C.; REZENDE JÚNIOR, A. B. Raiva. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico**. LEÃO, R.N.Q. (ed). Belém, Cejup, 1997.p.377-395.
- RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infectious Disease**, **2**: 327-343, 2002.
- SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO,N. PCR Technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, **5**: 229-240, 1991.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, **4**: 406-425, 1987.

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

SECRETARIA EXECUTIVA DE SAÚDE PÚBLICA (SESPA). **Vigilância a saúde. Endemias: Raiva**. Portal de Saúde do Estado do Pará, Belém, Pará, 2004. Disponível em: <[http://portal.sespa.pa.gov.br/portal/page?\\_pageid=73,36424&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL&pagina=/departamentos/dce/endemias.html](http://portal.sespa.pa.gov.br/portal/page?_pageid=73,36424&_dad=portal&_schema=PORTAL&pagina=/departamentos/dce/endemias.html)>. Acesso em: 12/06/2007.

SCHNEIDER, M. C. & SANTOS-BURGOA, C. Tratamiento contra la rabia: un poco de su historia. **Revista de Saúde Pública**, **28**: 454-463, 1994.

SERRA-COBO, J.; AMENGUAL, B.; ABELAN, C.; BOURHY, H. European bat lyssavirus infection in Spanish bat populations. **Emerging Infectious Diseases**, **8**: 414-420, 2002.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; CUNHA, E. M. S.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; 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 / The Japanese Society of Veterinary Science**, **66**: 1271-1273, 2004.

SHOPE, R. E.; MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K.; CAUSEY, O. R.; KEMP, G. E.; SIMPSON, D. I. H.; MOORE, D. Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus. **Journal Virology**, **6**: 690-692, 1970.

SHOPE, R.E. Rabies-related viruses. **Yale Journal Biological Medical**, **55**: 271-275, 1982.

SILVA, R. A. História da raiva em quirópteros no Brasil. In: Seminário Internacional - Morcegos Transmissores de Raiva, 2001, São Paulo. **Programas e Resumos**, 2001.p. 34-36.

SMITH, J. S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiological Reviews**, **9**: 166-176, 1996.

SOARES, R. M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S. M.; HEINEMANN, M. B.; CORTEZ, A.; ALVES, L.M.; MEYER, A. D.; ITO, F.H.; RICHTZENHAIN, L. J. A Heminested Polymerase Chain Reaction for the Detection of Brazilian Rabies Isolates from Vampire Bats and Herbivores. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**: 109-111, 2002.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural proteins of rabies virus. **Journal of Virology**, **7(2)**: 241-9,1971.

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**, **352**: 1103-1111, 2005.

SWOFFORD, D.L. **PAUP:Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods, Version 4**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.

TAKAOKA, N, Y.; KOTAIT, I.; REICHMANN, M.L M. 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: 02/10/2005.

TAKAOKA, N. Y. Raiva. In: **Pediatria Básica: pediatria clínica geral**. MARCONDES, E.; VAZ, F. A.C.; RAMOS, J, L. A.; OKAI, Y. (eds). São Paulo. Sarvier, 2003. p. 167-177.

THOMPSON J.D.; GIBSON T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN. F.; HIGGINS, D.G. 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. **Virus. Reviews & Research**. XVI National Meeting of Virology, **10** (Supplement 1): 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): 3914-8, 1986.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) protein of unsegmented negative-stand RNA-viruses. **Virology**, **165**(2):565-76, 1988.

- TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: **Laboratories techniques in rabies**. MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (eds.). Geneva, World Health Organization, 1996. p. 28-51.
- TORDO, N.; BADRANE, H. A evolução do gênero *Lyssavirus*. **Boletim Instituto Pasteur**, 7:3-5, 2003.
- TRACER**. Disponível em: <<http://www.evolve.zoo.ox.ac.uk>>. Acesso em: 20/09/2007.
- TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J. S.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUSA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F.C. Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, 12(8): 1197-1202, 2006.
- UIEDA, W., HARMANI, N., SILVA, M. Rabies in insectivoros (Mollosidae) bats of southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, 29: 393-397,1995,
- UIEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOMES, L. H.; SILVA, M. M. S. Espécies de quirópteros diagnosticados com raiva no Brasil. **Boletim Instituto Pasteur**, 1: 17-35, 1996.
- 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: 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. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 1697-1710, 2006.

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

WAGNER, R.; ROSE, J.K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: **Virology**. FIELDS, B. M.; KINIPPE, P.M. (eds.) Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 1996. p. 1121-1159.

WARRELL, M. J.; WARRELL, D. A. Rabies and other lyssavirus diseases. **Lancet**, **363**: 959-969, 2004.

WHITBY, J. E.; HEATON, P. R.; WHITBY, H. E.; O`SULLIVAN, E.; JOHNSTONE, P. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods**, **69**: 63-72, 1997.

WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization detection of antigenic variants.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **75**: 3938-3942, 1978.

WOLDEHIWET, Z. Rabies: recent developments. **Research In Veterinary Science**, **73**: 17-25, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Who Expert Consultation on Rabies**: First Report. Geneva, 2005. 123p. (WHO Technical Report Series, n.931).

WU, X.; GONG, X.; FOLEY, H. D.; SCHELL, M. J.; FU, Z. F. Both Viral Transcription and replication are reduced when the Rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. **Journal of Virology** , **76**: 4153-4161, 2002.

WUNNER, W. H.; DIETZSCHOLD, B. Rabies virus infection: genetic mutations and the impact on viral pathogenicity and immunity. **Contributions to Microbiology and Immunology**, **8**: 103-124, 1987.