ALBERIO ANTONIO DE BARROS GOMES

**Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus
isolados de animais domésticos e silvestres
do semi-árido paraibano da região de
Patos, Nordeste do Brasil**

São Paulo

2004

ALBERIO ANTONIO DE BARROS GOMES

**Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais
domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de
Patos, Nordeste do Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

São Paulo
2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1383
FMVZ

Gomes, Alberio Antonio de Barros

Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil / Alberio Antonio de Barros Gomes. - São Paulo : A. A. B. Gomes, 2004.
107 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira.

1. Raiva animal. 2. Raposas. 3. Caprinos. 4. Ovinos.
5. Anticorpos monoclonais. 6. Filogenia. I. Título

ERRATA

Página	Onde se lê	Leia-se
2	Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira	Prof. Dr. Fumio Honma Ito

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Prevalência da raiva em raposas *Dusicyon vetulus* na região do semi-árido do Nordeste do Brasil", Protocolo nº 105/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. Fumio Honma Ito, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 17/04/2002.

(We certify that the Research "Prevalence of rabies virus in fox (*Dusicyon vetulus*) from the semi-arid area of the Brazilian Northeast region" protocol number 105/2002, under the responsibility of Prof.Dr. Fumio Honma Ito, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 04/17/2002 meeting.

São Paulo, 17 de abril de 2002

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome: GOMES, Albério Antonio de Barros

Título: Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus filhos e à minha esposa.

Aos meus pais e meus irmãos

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças às condições oferecidas pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) e pelo Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), além dos estímulos e colaborações recebidas por parte dos docentes, funcionários e outras instituições de pesquisa, aos quais devo os meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Fumio Honma Ito, que idealizou e nos orientou nesse trabalho, pela confiança, estímulo, colaboração e auxílio na redação e revisão do mesmo.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, pelo constante estímulo e apoio durante a realização do trabalho. E pela forma que conduz o Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses do VPS - FMVZ - USP.

À Dra. Fernanda Bernardi, pelo companheirismo e pelas grandiosas e efetivas colaboração na execução deste, além de sugestões, críticas construtivas e auxílio na redação.

Ao Dr. Alex Wandeler e às Dras. Susan Nadin-Davis e Janet Armstrong, do laboratório do "Canadian Food and Inspection Agency Fallowfield", de Ottawa, Canadá, pela colaboração quando do seqüenciamento do gene da fosfoproteína e seleção dos anticorpos monoclonais para análise antigênica.

Ao IICA – Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture por patrocinar o seqüenciamento genético da fosfoproteína e a análise antigênica com monoclonais, junto ao "Canadian Food and Inspection Agency Fallowfield", de Ottawa, Canadá.

Aos Parceiros japoneses Prof. Dr. Takeo Sakai e Prof. Dr. Takuya Itou da Nihon University. de Kanagawa, Japão, que, através de convênio firmado entre a FMVZ-USP e o College of Bioresource Sciences – CBS-NU, Fujisawa, kanagawa, Japão, viabilizaram o seqüenciamento do gene da nucleoproteína e sua análise filogenética.

À funcionária Rosana Cleide Paick Utima, pelo auxílio e dedicação nas atividades desenvolvidas no Laboratório de Raiva do VPS - FMVZ - USP.

Ao funcionário Antonio da Costa Martins, pelo incansável e árduo trabalho junto ao Biotério do VPS - FMVZ - USP.

Às secretárias Ana Virginia P. Almeida Prado e Maria Cristina Paick do VPS - FMVZ - USP.

À Tânia Delonero, secretária do curso de Pós-graduação do VPS - FMVZ - USP.

Ao Médico Veterinário Francisco Roserlândio Botão Nogueira, que com sua experiência e dedicação muito colaborou na execução dos trabalhos com eqüídeos.

Ao funcionário Pedro Andrade Mota, pela dedicação no manejo dos eqüídeos na Fazenda Experimental Lamerão do CSTR – UFCG.

Ao Laboratório BioVet, que gentilmente cedeu a vacina anti-rábica utilizada na imunização dos eqüídeos, além de colaborar com material de consumo para o manejo dos animais.

A todos os colegas do curso de pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses do VPS - FMVZ - USP.

Aos docentes e professores da USP que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas e demais funcionários da FMV-CSTR-UFCG, pelo apoio incondicional à capacitação docente.

Aos administradores do CSTR – UFCG, que prontamente atenderam as nossas solicitações para instalação de um laboratório de diagnóstico de raiva e também no que diz respeito a utilização de transporte e instalações, para execução de grande parte dos trabalhos.

Aos motoristas que fazem o transporte alternativo entre Patos e a cidades circunvizinhas e que gentilmente colaboraram na colheita de animais atropelados ao longo das rodovias que cortam a região semi-árida do Estado da Paraíba.

À CAPES e ao PICDT, pela concessão da bolsa, que possibilitou a realização deste trabalho.

“Que cada um considere a si mesmo, não como um homem procurando satisfazer sua própria sede de conhecimento [...] mas como um colaborador numa grande obra comum relacionada com os interesses supremos da humanidade.”

Hermann von Helmholtz
(1821-1894)

RESUMO

GOMES, A. A. B. **Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil.** [Epidemiology of rabies: characterization of vírus isolated from domestic and wild animals of the semiarid region of Patos, Northeastern Brazil]. 2004. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

No semi-árido paraibano há poucos relatos de ocorrência da raiva, há quem afirme que os caprinos, ovinos e asininos são resistentes à doença e a prática de vacinação é incomum. Este trabalho visou estudar a situação da raiva na região semi-árida de Patos-PB, estabelecendo o diagnóstico desta enfermidade em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres. Foram capturados 12 exemplares de raposas (*Dusicyon vetulus*), por meio de armadilha; 192 morcegos insetívoros (*Molossus molossus*), capturados no Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, em Patos, e oito morcegos insetívoros (*M. molossus*) encaminhados por moradores desta cidade. As raposas capturadas foram submetidas à colheita de sangue e em seguida sacrificadas com uso de Ketamina e T-61. Outras 287 raposas e oito guaxinins (*Procyon cancrivorous*) atropelados e mortos nas rodovias que servem o município de Patos foram examinados, além de 74 amostras de diferentes espécies de animais domésticos, enviados pelo setor de Patologia do Hospital Veterinário do CSTR-UFCG. Os animais silvestres, uma vez transportados ao Laboratório de Virologia do CSTR-UFCG, foram necrópsiados e os fragmentos do cérebro, submetidos à prova de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (ICC) para o diagnóstico da raiva. Dos 581 materiais examinados, 50 (8,60%) foram positivos à IFD, dos quais 47 (8,09%) se confirmaram à ICC. Relativamente às espécies, 19/41 amostras de bovinos; 12/299 de raposas; 1/5 de ovinos e 2/6 de

caninos apresentaram resultados positivos para ambas as provas. Amostras procedentes de caprinos, eqüinos e morcegos apresentaram resultados discrepantes entre as provas de IFD e ICC, de 2/6 e 1/6; 3/11 e 2/11; e 9/200 e 8/200, respectivamente. As amostras de vírus foram enviadas ao Laboratório de Raiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para extração do material nucléico, tipificação antigênica e genética. A tipificação antigênica e genética com base no gene M1 foi realizada no "Canadian Food and Inspection Agency", Fallowfield, Ottawa, Canadá, patrocinado pela IICA – "Inter-American Institutes for Cooperation on Agriculture". A caracterização genética do gene N e o estudo filogenético foram realizados no laboratório do "National Institute of Infectious Diseases", Toyama, Tóquio, pelos pesquisadores do "College of Bioresources Sciences" da Nihon University, Kanagawa, Japão. O estudo do comportamento biológico das amostras foi realizado em camundongos, pela inoculação por via intracerebral, avaliando-se os períodos de incubação e clínico, no seu primo-isolamento. O comportamento biológico de um isolado de raposa foi estudado em caprinos e ovinos inoculados experimentalmente por via intramuscular. A mesma amostra foi utilizada para o desafio de asininos e eqüinos vacinados com uma vacina comercial de vírus inativado. Estes animais apresentaram níveis mensuráveis de anticorpos anti-rábicos neutralizantes e os resultados do desafio indicaram a eficácia da vacina contra o isolado de raposa. Os resultados da tipificação antigênica e genética permitem concluir que: na região estudada a epidemiologia da raiva é complexa, revelando existir variantes distintas, mantidas em cães domésticos, raposas, morcegos insetívoros e morcegos hematófagos.

Palavras chave: Raiva animal. Raposas. Caprinos. Ovinos. Anticorpos Monoclonais. Filogenia.

ABSTRACT

GOMES, A. A. B. **Epidemiology of rabies: characterization of vírus isolated from domestic and wild animals of the semiarid region of Patos, Northeastern Brazil** [Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil]. 2004. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

In the semiarid of the State of Paraíba there are few reports of rabies occurrence, and it is said that caprines, ovines and asinines are resistant to rabies and the use of vaccines in these species is uncommon. This work aimed to study the situation of rabies in the semiarid of Patos-PB, establishing the diagnosis in domestic and wild animals. For the study, 12 foxes (*Dusicyon vetulus*) were captured alive; 192 insectivorous bats (*Molossus molossus*), captured at the "Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR", of the "Universidade Federal de Campina Grande-UFCG", Patos-PB; and 8 bats (*M. molossus*) sent by residents of the city of Patos. Captured foxes were submitted to blood collection and then sacrificed using ketamine and T-61. Other 287 foxes and 8 raccoons (*Procyon cancrivorus*) road-kills collected from the roads serving the Patos municipality were examined. Other 74 samples from different domestic animals sent by the Pathology section of the Veterinary Hospital of the CSTR-UFCG were also included. The wild animals, once shipped to the Virology Laboratory of the CSTR-UFCG, were necropsied and brain fragments were submitted to the fluorescent antibody test (FAT) and mouse inoculation test (MIT) for rabies diagnosis. Among the 581 materials, 50 (8.60%) were positive by FAT, and 47 (8.09%), confirmed by MIT. Concerned to animal species, 19/41 bovines; 12/299 foxes; 1/5 ovines; and 2/6 canines were positive for both FAT and MIT. Caprine, equine and bat samples presented discrepant results between the FAT and MIT,

from 2/6 to 1/6; 3/11 to 2/11; 9/200 to 8/200, respectively. All the isolates were sent to the Rabies Laboratory of the "Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal", "Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia", "Universidade de São Paulo-FMVZ-USP", for extraction of nucleic materials, to perform the antigenic and genetic typing. Antigenic and genetic typing based on M1 gene was conducted at the Canadian Food and Inspection Agency, Fallowfield, Ottawa, Canada, sponsored by the IICA – Inter-American Institutes for Cooperation on Agriculture. The genetic characterization of the N gene and the phylogenetic analyses were made at the National Institute of Infectious Diseases, Toyama, Tokyo, by the researchers of the College of Bioresources Sciences, Nihon University, Kanagawa, Japan. The biologic behavior of the isolates was studied in mice through intracerebral inoculation by registering the incubation and the clinical periods at its first passage. The biologic behavior of a fox isolate was assessed in caprines and ovines, by experimental inoculation through intramuscular route. The same isolate was used for the challenge of asinines and equines that had been vaccinated with a commercially available inactivated virus vaccine. The vaccinated animals showed measurable levels of neutralizing antirabies antibodies and the results of challenge indicated the efficacy of this vaccine against the fox isolate. According to the results of antigenic and genetic typing, it can be concluded that in the region, the epidemiology of rabies is complex, revealing the existence of virus variants maintained in populations of domestic dogs, foxes and hematophagous and insectivorous bats.

Key words: Animal rabies. Fox. Caprines. Ovines. Monoclonal Antibodies. Phylogeny.

Lista de Figuras

Figura 01	Sagüis (<i>Calithrix jacchus</i>) animais comumente encontrado no Nordeste do Brasil.....	33
Figura 02	Produtor rural agredido por raposa (<i>D. vetulus</i>), no município de Patos – PB.....	33
Figura 03	Indivíduos agredidos por raposa (<i>D. vetulus</i>), com evidente laceração do lábio inferior do Sr. Genoino, no município de Ouro Branco - RN, semi-árido do Nordeste.....	34
Figura 04	Criação de caprinos e ovinos, comum na caatinga da região Nordeste.....	34
Figura 05	Caatinga do Nordeste brasileiro. Região de Patos-PB.....	35
Figura 06	Raposa (<i>Dusicyon vetulus</i>) atropelada na PB - 110, próximo ao município de São José do Bonfim – PB.	35
Figura 07	Raposa (<i>D. vetulus</i>) atropelada na BR 230, próximo ao município de Patos – PB.....	36
Figura 08	Raposa (<i>D. vetulus</i>) criada como animal de estimação, na zona rural, no município de São José do Bonfim - PB.....	36
Figura 09	Raposa (<i>D. vetulus</i>) criada como animal de estimação, na zona urbana, no município de Patos - PB.....	37
Figura 10	Gatos jaguarandi vermelho (<i>Felis yagouaroundi</i>), criados como animais de estimação, Patos-PB.....	37
Figura 11	Mapa da Paraíba mostrando estradas e relevo da região de Patos.....	38
Figura 12	Raposa (<i>D. vetulus</i>) em armadilha, no momento em que é anestesiada.....	43
Figura 13	Mapa da Paraíba, destacando a região polarizada por Patos.....	43
Figura 14	Transporte alternativo que serve à região de Patos-PB, utilizado na colheita de animais atropelados.....	44
Figura 15	Necrópsia de raposa, realizado no Laboratório de Virologia do CSTR-UFCG em Patos-PB.....	45
Figura 16	Cérebro de raposa, colhido após necrópsia, mostrando detalhe anatômico característico da espécie.....	45
Figura 17	Morcego insetívoro (<i>M. molossus</i>) após colheita do cérebro.....	61
Figura 18	Caverna no semi-árido paraibana, no município de Santa Luzia-PB.....	64
Figura 19	Mina abandonada nas proximidades de Santa Luzia-PB.....	64
Figura 20	Caprino inoculado com vírus rábico, apresentando reflexo de <i>flehmen</i>	69

Figura 21	Ovino inoculado com vírus rábico, com evidente apatia.....	69
Figura 22	Asininos inoculados por via intramuscular com vírus rábico originário de raposa, em diferentes fases após o aparecimento dos sintomas.....	71
Figura 23	Análise filogenética entre amostras de vírus rábico isoladas no Brasil, de diferentes espécies, tendo como referência a amostra CVS, com base na homologia de nucleotídeos do gene da proteína M1, usando-se uma seqüência de 350 bp. A aproximação genética foi obtida mediante aplicação do programa CLUSTAL X. Para definição dos grupos aplicou-se o Método Bootstrap com 100 repetições, considerando-se um valor >90%. A relação das amostras encontra-se no Quadro 5.....	74
Figura 24	Análise filogenética entre amostras de vírus rábico isoladas no Brasil, de diferentes espécies, tendo como referência a amostra Mokola, com base na homologia de nucleotídeos do gene da proteína N, usando-se uma seqüência de 203 bp. A aproximação genética foi obtida mediante aplicação do programa CLUSTAL X. Para definição dos grupos aplicou-se o Método Bootstrap com 100 repetições, considerando-se um valor >70%. A relação das amostras encontra-se no Quadro 6.....	76
Figura 25	Dendrograma da relação filogenética estabelecida entre amostras de vírus rábico, com 100 replicações no “bootstrap”. Vírus do Gênero <i>Lissavirus</i> genótipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, estão distribuídos na parte superior da árvore. Agrupamento por homologia de 203 bp do gene N, de amostras isoladas nos estados de São Paulo(SP), Goiás(GO), Minas Gerais(MG) e Paraíba(PB), em cão(dg), gato(ct), humano(hm), eqüino(hr), suíno(pg), bovino(bv), raposa(fx), <i>M. molossus</i> (Ms), <i>D. rotundus</i> (Dr), <i>.Artibeus lituatus</i> (AL), <i>A. planirostris</i> (Ap) e ovino (sp). Foi considerado um Bootstrap > 70% para 100 replicações.....	77
Figura 26	Dendrograma da relação filogenética estabelecida entre amostras de vírus rábico isoladas de carnívoros de diferentes continentes (GenBank) e carnívoros do Brasil (Quadro 6). Com base na seqüência de 203 bp do gene N, considerando um Bootstrap > 70% para 1000 replicações.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Número de amostras de cérebros colhidas de diferentes espécies de animais domésticos e silvestres da região do semi-árido nordestino de Patos - PB. São Paulo – 2003.....	40
Quadro 2	Resultados da prova de imunofluorescência (IFD), inoculação intracerebral em camundongos (ICC) e perfil antigênico com anticorpos monoclonais (MABs) anti-rábicos do Canadian Food and Inspection Agency Fallowfield, Ottawa, Canadá, de materiais procedentes de diferentes espécies animais, domésticos e silvestres, do semi-árido paraibano da região de Patos – PB. São Paulo – 2003.....	65
Quadro 3	Título de anticorpos anti-rábico soroneutralizantes em asininos (A) e eqüinos (E) imunizados com vacina comercial de vírus inativado, em diferentes períodos pós vacinação e desafiados com amostra de vírus rábico isolado de raposa, no semi-árido paraibano Nordeste do Brasil. São Paulo, 2004.....	70
Quadro 4	Grupos de variantes (Var.) resultantes da análise antigênica de amostras de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies (Esp.) de animais domésticos e silvestres, da região de Patos – PB, com anticorpos monoclonais (MABs) cedidos pelo "Canadian Food and Inspection Service" - Canadá. São Paulo, 2004.....	73
Quadro 5	Relação de amostras de vírus rábico submetidas a análise filogenética após serem seqüenciadas no "Canadian Food and Inspection Service" - Canadá, com seus respectivos anos de isolamento, local e hospedeiro de origem. VPS – FMVZ – USP. São Paulo, março de 2004.....	75
Quadro 6	Relação de amostras de vírus rábico submetidas a análise filogenética após serem seqüenciadas no National Institute of Infectious Disease, Toyama, Tóquio, Japão, com seus respectivos anos de isolamento, local e hospedeiro de origem. VPS–FMVZ -USP Paulo, março de 2004.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH3-Rockfeller = linhagem de camundongo
CVS = Challenge Virus Standard
DL₅₀ = dose letal 50%
G = glicoproteína
IFD = imunofluorescência direta
IC = inoculação intracerebral
ICC = inoculação intracerebral em camundongos
IgG = imunoglobulina G
KDal = quilodáton
Km = quilômetro
L = polimerase RNA-dependente
M = proteína matriz
M1 = fosfoproteína
M2 = proteína matriz
MABs = anticorpos monoclonais
mg = miligrama
min = minuto
mL = mililitro
mol = número de moles
N = nucleoproteína
NS = fosfoproteína
PBS = solução salina tamponada
PCR = reação em cadeia pela polimerase
pH = concentração de hidrogênio iônico
p/v = peso/volume
RNA = ácido ribonucléico
RT = transcrição reversa
SN₅₀ = soroneutralizante 50%
UI/mL = unidades internacionais/mililitro
v/v = volume/volume

Nota: em virtude do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1	MATERIAIS	40
2.1.1	Animais	40
2.1.1.1	Animais para o diagnóstico da raiva.....	40
2.1.1.1.1	Raposas (<i>D. vetulus</i>).....	41
2.1.1.1.2	Morcegos não hematófagos (<i>M. molossus</i>).....	46
2.1.1.1.3	Guaxinins (<i>P. cancrivorus</i>).....	46
2.1.1.1.4	Animais domésticos.....	47
2.1.1.2	Animais para infecção experimental.....	47
2.1.1.2.1	Caprinos e ovinos.....	47
2.1.1.2.2	Asininos e eqüinos.....	48
2.1.1.2.3	Camundongos.....	48
2.1.2	Soros de raposas	49
2.1.3	Cérebro de animais	49
2.1.4	Diluyente	50
2.1.5	Soro anti-rábico padrão	50
2.1.6	Conjugado anti-rábico imunofluorescente	51
2.1.7	Amostra CVS 31/2 (Challenge Virus Standard)	51
2.1.8	Vacina comercial de vírus inativado	52
2.2	MÉTODOS	52
2.2.1	Prova de inoculação intracerebral em camundongos (ICC)	52
2.2.2	Prova de imunofluorescência direta (IFD)	53
2.2.3	Titulação do vírus	53
2.2.4	Prova de soroneutralização	54
2.2.5	Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para detecção de antígeno em órgãos	55
2.2.6	Caracterização antigênica com MABs	55
2.2.7	Caracterização genética	56
2.2.7.1	Com o gene da proteína M1.....	56
2.2.7.1.1	Extração do RNA.....	56
2.2.7.1.2	Reação de RT-PCR.....	56
2.2.7.1.3	Seqüenciamento do gene da proteína M1.....	57
2.2.7.2	Com o gene da proteína N.....	57
2.2.7.2.1	Extração do RNA.....	57
2.2.7.2.2	Reação de RT-PCR.....	58
2.2.7.2.3	Seqüenciamento do gene da proteína N.....	58
2.2.8	Análise filogenética	59
2.2.9	Procedimento experimental	60
3	RESULTADOS	62
4	DISCUSSÃO	81
5	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO	107

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença muito antiga e temida, descrita em documentos da Mesopotâmia que datam de 2.300 anos antes de Cristo (WILKINSON, 1988). Trata-se de uma zoonose que acomete todos os animais de sangue quente e causa uma encefalomielite aguda e fatal, resultante principalmente da transmissão do vírus pela mordida de um animal doente (ACHA;SZYFRES, 1986; KAPLAN; KOPROWSKI, 1980).

Apesar da disponibilidade de vacinas efetivas e seguras, para proteção de humanos e animais, a raiva continua sendo uma doença bastante difundida no mundo, transmitida tanto por animais domésticos como por animais silvestres (TOMA; ANDRAL; 1977). Os cães, ainda são responsáveis pela manutenção da doença em muitos países da África, Ásia e América Latina, onde as estruturas veterinária e sanitária são inadequadas (ACHA; SZYFRES, 1986).

A importância da raiva para a Saúde Pública reside em sua alta letalidade, que alcança 100% dos doentes e, também, no impacto psíquico e emocional, no sofrimento e na ansiedade das pessoas mordidas diante do temor de contrair a doença (ACHA; SZYFRES, 1986; KAPLAN; TURNER; WARRELL, 1986).

O agente etiológico da raiva pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, a qual compreende mais de 100 vírus de vertebrados, invertebrados e vegetais (FENNER et al., 1992). O vírus da raiva pertence ao gênero *Lyssavirus*,

apresentando uma morfologia característica em forma de bala de revólver, diâmetro de 75 nm e comprimento de 100 a 300 nm (KAPLAN; TURNER; WARRELL., 1986; TORDO, 1996; TORDO; POCH, 1988), variando de acordo com a amostra considerada; é também composto por um envoltório formado por uma dupla membrana fosfolípídica na qual emergem espículas de aproximadamente 9 nm, de composição glicoproteica. Este envoltório envolve o nucleocapsídeo de conformação helicoidal, composto de um filamento único de RNA negativo e não segmentado (TORDO; POCH, 1988). Estudos bioquímicos têm demonstrado que além do RNA o vírus é composto estruturalmente por cinco proteínas: uma RNA polimerase RNA-dependente (proteína L de 190 KDa), uma glicoproteína de superfície (proteína G de 65 a 80 KDa), uma nucleoproteína (proteína N de 57 a 62 KDa), uma fosfoproteína (proteína NS ou M1 de 35 a 41 KDa), e uma proteína matriz (proteína M ou M2 de 22 a 25 KDa) (BOURHY; SUREAU; TORDO, 1990; SMITH, 1996; TORDO, 1996).

Mediante estudos sorológicos, o gênero *Lyssavirus* era subdividido em 4 sorotipos, o sorotipo I ou o vírus clássico da raiva e outros sorotipos isolados do continente africano, o sorotipo II ou “Lagos Bat virus”, o sorotipo III ou “Mokola vírus” e o sorotipo IV ou “Duvenhage vírus”, conhecidos como vírus “relacionados” ou “aparentados” com o vírus da raiva (GOULD et al., 1998).

Porém, os conhecimentos advindos do uso de anticorpos monoclonais (MABs), dos progressos da engenharia genética e da biologia molecular, modificaram os conceitos relacionados ao “vírus de rua”, permitindo tipificar as amostras de vírus mediante avaliação antigênica (FLAMAND; WIKTOR; KOPROWSKI, 1980) e genética.(TORDO, et al, 1986). Em 1994, os especialistas da

raiva, reunidos em Niagara Falls, EUA, propuseram a denominação de "genótipos" em substituição aos "sorotipos", até então utilizados para designar os diferentes membros do gênero *Lyssavirus* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994). Desta forma, com base na seqüência do genoma do nucleocapside o vírus da raiva passou a ser dividido em: genótipo 1, que compreende a amostra clássica de vírus da raiva, notadamente amostras vacinais e amostras de "vírus de rua" isoladas de animais domésticos e silvestres; genótipo 2 correspondente à amostra "Lagos Bat virus", isolada de morcegos frugívoros *Eidolon helvum*, na África; genótipo 3 que corresponde à amostra "Mokola virus", isolada do musaranho (*Crocidura* sp.), na província de Ibadan, Nigéria, e posteriormente do homem, cães, gatos e roedores; genótipo 4, amostra "Duvenhage virus", isolado do homem e morcegos insetívoros *Nycterus thebaica*, na África; genótipos 5 e 6, recentemente identificados como "European Bat Lyssavirus" (EBL 1 e EBL 2), isolados de morcegos *Eptesicus serotinus* e *Myotis dasycneme* e *M. daubentoni*, respectivamente, na Europa (BOURHY; KISSI; TORDO., 1993; 1995; BRASS, 1994); e o "Australian Bat Lyssavirus" (ABL) que também é distinto geneticamente e classificado como genótipo 7 (GOULD et al., 1998). Os genótipos 5, 6 e 7, isolados de morcegos não hematófagos, são descritos como "lyssavírus" e apesar de muitos relatos de isolamento de vírus da raiva de morcegos não hematófagos, a existência destes "lyssavirus", até o presente, não tem sido registrada nas Américas (TORDO et al., 2000). Recentemente, Arai et al. (2003) propuseram a inclusão de um novo genótipo, o "Aravan virus", isolado de um morcego insetívoro *Myotis blythi*, no Quirguistão, Ásia Central. Este provável novo genótipo apresenta características filogenéticas mais próximas às dos genótipos EBL1 e EBL2.

A epidemiologia da raiva depende claramente da passagem do vírus de um indivíduo infectado a outro susceptível. A transmissão predominantemente é através da saliva, mas a via aérea é importante em certas áreas, principalmente cavernas densamente povoadas por morcegos infectados (KAPLAN, 1985).

A infecção do SNC inicia-se através das terminações nervosas (KAPLAN; KOPROWSKI, 1980; TSIANG, 1988), por inoculação do vírus quando da transmissão por contato, no caso de mordida de animais raivosos, ou quando a saliva de um animal raivoso que contém o vírus entra em contato com uma lesão preexistente. Há replicação do vírus no ponto de inoculação, normalmente com o vírus avançando pelo citoplasma de axônios, podendo participar nervos sensoriais, motores e autônomos (BAER, 1975; CHARLTON, 1988). Muitas células não nervosas se tornam infectadas como resultado do transporte centrífugo do vírus pelas vias nervosas (CHARLTON, 1988; SHANKAR; DIETZCHOLD; KOPROWSKI, 1991).

O mecanismo da imunidade na infecção ou na vacinação anti-rábica, apesar de bastante estudado, ainda apresenta alguns aspectos não esclarecidos, o grau de proteção à infecção tem sido relacionado com a imunidade humoral (ATANASIU et al., 1968; FLAMAND et al., 1993; MONTAÑO-HIROSE et al., 1993; WIKTOR; KOPROWSKI, 1978), com a imunidade celular (GERBER, et al., 1985; KAWANO, et al., 1990), ou a combinação dos dois fatores anteriores (ABREU; LEMOS; SOUZA, 1992; AUBERT, 1985; BLANCOU et al., 1979; PILLE; BLANCOU; MACFARLAN, 1988;). As células apresentadoras de antígeno tais como os macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, entre outras, fagocitam o vírus da raiva e o

processam para apresentação às células do sistema imunológico, resultando na produção de linfócitos B (KOPROWSKI; MOCARELLI; WIKTOR, 1972) e ativação dos linfócitos T auxiliares, produzindo citocinas. Tem sido sugerido que a indução da produção de interferon é um importante fator de proteção contra a raiva (BAER; YAGER, 1977; MENDONÇA; PEREIRA, 1994).

No entanto, a raiva é uma doença bem sucedida, pois, tem persistido ao longo do tempo e do espaço, atingindo uma distribuição mundial em uma grande variedade de espécies de animais domésticos e silvestres, graças ao fato de o vírus poder mudar ("spillover") de um hospedeiro a outro, denominado de "species - jumping agent", condição fundamental para ser classificado como agente de zoonose (CAREY, 1985).

Os animais mais freqüentemente relatados como fonte de infecção aos seres humanos são os cães, enquanto que para os herbívoros são as raposas, morcegos e cães, mas o quadro é muito diferente em muitas partes do mundo. Essas diferenças existem devido ao grande número de espécies capazes de atuarem como reservatórios da doença e das diversas formas que elas interagem em seus habitat (BACON, 1985; KAPLAN, 1985). Dentro de um determinado ecossistema, uma ou mais espécies de mamíferos se encarregam de perpetuar o vírus (PASTORET, 1989).

A raiva envolvendo animais silvestres é um perigo constante para o homem e para os animais domésticos. Quando estão com raiva, os animais silvestres se aproximam das habitações e podem agredir o ser humano e seus animais. Tanto na

Europa como na América do Norte, as principais vítimas são os bovinos (ACHA; SZYFRES, 1986). No Canadá, os bovinos chegam a representar 20% do total de casos diagnosticados laboratorialmente, onde as raposas correspondem a quase 50% de todos os casos confirmados de raiva (MACDONALD; VOIGT, 1985). No hemisfério norte, a raiva em eqüinos é rara e a transmissão do vírus ocorre principalmente após mordeduras envolvendo animais silvestres, como "skunks", raposas e "raccoons" (KENTUCKY COOPERATIVE EXTENSION SERVICE, 2004).

Carini (1911) foi o primeiro a diagnosticar raiva em bovinos nas Américas e mencionar os morcegos hematófagos como reservatórios da raiva, na epidemia constatada em herbívoros no sul do Brasil. A "crendice popular" divulgada por Carini foi mais tarde confirmada por Haupt e Rehaag (1925) que, a convite do governo catarinense, visitaram a região durante a epidemia, entre os anos 1914-1916.

Nos países da América Latina e do Caribe onde são encontrados os morcegos hematófagos, por muito tempo se pensou que os "vampiros" eram os únicos responsáveis pelos casos de raiva dos herbívoros. No entanto, outros animais silvestres terrestres, como o lobo guará, coiote, mangusto, quati, cangambá, guaxinim e raposas já foram relatados positivos para raiva (BARROS; FREITAS; SOUSA, 1989; SILVA; HAYASHI, et al., 1984; BRECKENFELD, 1968; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2001; REDE INTERAGENCIAL DE INFORMAÇÃO PARA A SAÚDE, 2002), contudo, poucos são os trabalhos relacionando estas espécies como transmissores do vírus para os herbívoros (BACON, 1985).

Na Europa e América do Norte, onde o controle da raiva em animais domésticos foi bem sucedido, outras espécies de animais silvestres superaram em importância os cães como "vetores" da doença nas últimas décadas, principalmente a raposa (SMITH, 1994; TOMA; ANDRAL, 1977). Na Europa, um certificado de zona livre da raiva, requer que nenhum caso da doença seja notificado em um período mínimo de dois anos, em uma área de 5.000 Km², de onde no mínimo oito raposas para cada 100 Km² sejam capturadas e submetidas a diagnóstico laboratorial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992).

No continente Norte Americano, várias espécies silvestres são reconhecidas como reservatórios da raiva, em regiões geograficamente distintas. Nas partes árticas e sub-árticas do Canadá e do Alasca, a raiva é endêmica na raposa do ártico (*Alopes lagopus*). Nos Estados Unidos, tanto a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) como a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) são encontradas em um ambiente muito favorável e comportam-se como importantes transmissores (TOMA; ANDRAL, 1977). O gambá (*Mephitis mephitis*) é a espécie mais importante no Oeste dos Estados Unidos. Por sua vez, o "raccoon" (*Procyon lotor*) é importante desde o Sudeste do Canadá ao istmo do Panamá, Geórgia e Flórida, principalmente. Os morcegos são provavelmente o maior grupo de animais nos quais a raiva é endêmica. O morcego de "cauda livre" (*Tadarida brasiliensis mexicana*) é encontrado em cavernas no Texas e no Novo México, e apesar da raiva ocorrer em apenas 1% aproximadamente da população de morcegos, esta quantidade se torna significativa, quando se estima uma população de 60 milhões, somente a cada inverno (KAPLAN, 1985).

No século XIX, a Europa foi marcada pela raiva endêmica em raposas e, em alguns locais, a doença atingiu proporções epidêmicas. O número de raposas com raiva na França, Suíça e Alemanha, aumentou consideravelmente e os animais doentes passaram a apresentar uma ameaça, não só para outras raposas, cães e animais de fazendas, mas, para a população humana (BACON, 1985).

No continente europeu, o animal mais envolvido tem sido a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), sendo portanto a espécie mais importante na epidemiologia da raiva (WANDELER, 1988). Em algumas áreas é muito comum a participação de mais de uma espécie. Como exemplo temos o "Raccoon dog" (*Nyctereutes procyanoides*) que passou a ser considerado um importante reservatório do vírus da raiva e capaz de coexistir no mesmo habitat da raposa (KAPLAN, 1985). Pastoret et al. (1989), em um estudo da raiva em raposas na Europa, admite uma propagação de 20 a 60 Km por ano e uma prevalência entre 2% e 10% nestes animais. Prevalência de 1% a 5%, considerada epidêmica, é comum e abaixo de 1% é considerada endêmica (CAREY, 1985).

Em muitos países da África e da Ásia faltam dados para estabelecer o grau de envolvimento dos animais silvestres na transmissão da raiva. O continente Africano, no entanto, é reconhecido por ser o berço dos chamados vírus "aparentados", envolvendo animais silvestres como os musaranhos, chacais, morcegos, hienas e animais domésticos e o ser humano (KAPLAN, 1985).

Nos Estados Unidos e Canadá, cinco espécies de carnívoros silvestres e ao menos quatro espécies de morcegos são os principais reservatórios do vírus da

raiva (SMITH, 1989). Dentre as 39 espécies de morcegos conhecidas nos Estados Unidos, em pelo menos 30, já foram confirmados casos de raiva (BAER; SMITH, 1975). Por outro lado, a extensão e a importância da raiva em animais silvestres na América Central e do Sul, Ásia e África não são claros. Nas Américas, entre os animais silvestres com diagnóstico positivo para a raiva, no ano 2000, estão incluídos: coiotes, lobos, "raccoons", mangustos, morcegos hematófagos, morcegos não hematófagos, primatas, roedores e logomorfos, raposas e cães silvestres (ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD, 2001).

Uieda, Harmani e Silva (1995) descreveram a ocorrência da raiva em morcegos insetívoros, frugívoros e hematófagos da fauna brasileira; sugerindo que se deve suspeitar de raiva, sempre que estes animais forem encontrados com comportamento anormal, em plena luz do dia e fora do ambiente natural.

Na América Central e do Sul e em algumas ilhas do Caribe, a raiva é endêmica e a maioria dos casos humanos são devido a exposição a cães raivosos. No entanto, do ponto de vista econômico, a raiva parálitica dos bovinos associada à mordida de morcegos hematófagos, é o problema mais importante (SMITH; BAER, 1988). Três espécies diferentes de morcegos hematófagos ocorrem nesses continentes, o mais importante devido a sua densidade populacional e pelo fato de transmitir mais freqüentemente a raiva para bovinos, é o *Desmodus rotundus*. O *Diphylla ecaudata* é encontrado em climas mais amenos e em maiores altitudes, prefere sangue de bovinos, embora tenha demonstrado igual apetite por sangue de cavalos. A terceira espécie é o *Diaemus youngii*, raro e aceito por muitos que o mesmo prefere sangue de aves (KAPLAN, 1985). Torres e Queiroz Lima (1935) relataram isolamento do

vírus da raiva do morcego *D. ecaudata*, enquanto que Silva e Souza (1968) relataram o isolamento do vírus a partir do morcego *D. youngii*.

No Brasil, a incidência de raiva humana vem diminuindo desde a instituição das campanhas de vacinação em massa de cães e gatos na década de 1970 e manteve esta tendência até a segunda metade da década de 1990, onde se observa uma certa estabilidade no número de casos registrados, que se concentram nas regiões Nordeste e Norte, enquanto a região Sul se mantém livre da doença (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2001; REDE INTERAGENCIAL DE INFORMAÇÃO PARA A SAÚDE, 2002). No período de janeiro de 1992 a dezembro de 2001, foram notificados 313 casos de raiva humana no Brasil. No mesmo período, no Estado de Pernambuco foram notificados 28 casos de raiva humana, dos quais dois tiveram como animal agressor a raposa e ocorreram nos municípios de João Alfredo e Escada, nos anos de 1992 e 1993, respectivamente. Enquanto isto, no Estado da Paraíba foram registrados apenas oito casos de raiva humana, sendo que um destes ocorreu na região de Patos, no ano de 1992 – último caso de raiva humana na região (ARAÚJO, 2002). A raiva em humanos, resultante da mordida de morcegos hematófagos tem sido notificada de tempos em tempos, e o caso mais recente que se tem informação ocorreu às margens do rio Acuti Pereira, no município de Portel, no Estado do Pará, onde no período de 02 de março a 01 de abril de 2004 foram confirmados 15 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (2001) foram registrados 61 casos de raiva em animais silvestres no Brasil, no ano de 2000, dos quais 22 ocorreram em raposas. Com relação à raposa do Nordeste (*Dusicyon vetulus*), existem registros da doença no Estado do Ceará (BARROS; FREITAS; SOUSA,

1989), Paraíba (OLIVEIRA et al, 2001), Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (ARAÚJO, 2002). No entanto, o primeiro relato de raiva em raposa, que se tem notícia, foi feito por Dos Santos e Passos¹ (1947 apud BARROS; FREITAS; SOUSA, 1989). Apesar dos registros de ocorrência da raposa na região Nordeste, não se chegou a um consenso quanto ao nome espécie. No entanto, vários pesquisadores (ALBUQUERQUE; BARRETO, 1970; BARROS; FREITAS; SOUSA, 1989; DALPONTE, 1995; JÁCOMO; SILVEIRA; DINIZ-FILHO, 2004; OLIVEIRA, et al, 2001) a descrevem como *D. vetulus*.

No Ceará, são freqüentes os casos de raiva em animais silvestres, diagnosticados laboratorialmente, mais comumente na raposa (*D. vetulus*), um canídeo bastante encontrado no campo. No período de junho de 1980 a julho de 1986, foram diagnosticados laboratorialmente positivos para raiva, 18 materiais obtidos de raposas e 60 pessoas foram agredidas por esta espécie, em Tianguá - CE e municípios vizinhos, no período de 1985 a julho de 1986 (BARROS; FREITAS; SOUSA 1989). Ainda no Ceará, existem relatos de isolamento do vírus da raiva de sagüis (*Calithrix jacchus*) (MORAIS et al., 2000), um primata muito comum na região (Figura 1) e freqüentemente mantido em cativeiro, como animal de estimação. Na análise antigênica de amostras isoladas de sagüis, utilizando anticorpos monoclonais desenvolvidos pelo Centers for Disease Control - CDC de Atlanta, EUA, os resultados foram incompatíveis, quando comparados com variantes isoladas de outras regiões e há descrição de dois casos de raiva em humanos envolvendo esta variante. (FAVORETO et al., 2000).

¹ Dos Santos, J. Andrade, Passos, Valdemar – Um Carnívoro Selvagem (*Canis vetulus*), vetor e possível transmissor da Raiva no Nordeste do Brasil – Bol. Soc. Bras. Med. Vet., vol. 16, 1947.

No semi-árido nordestino, o animal silvestre mais envolvido em agressões a humanos tem sido a raposa (Figuras 2 e 3). No período de 15 de agosto de 2000 a 11 de fevereiro de 2003, 24 pessoas foram agredidas por raposas e atendidas na Unidade Básica de Saúde Aderban Martins, no Município de Patos – PB (SOUSA, 2003).

O Nordeste brasileiro, além de ser detentor de cerca de 90% do rebanho caprino nacional, também concentra aproximadamente 50% do rebanho de ovinos no país. A região concentra ainda, mais de 90% dos asininos e quase 30% dos eqüinos do país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1996). Estes rebanhos, juntamente com outros animais zootécnicos, são criados de forma extensiva na caatinga (Figura 4 e 5) o que os tornam suscetíveis aos ataques de carnívoros domésticos e silvestres, principalmente as raposas que são vistas com frequência tanto no meio rural como próximo à periferia das cidades e nas rodovias, onde são freqüentemente atropeladas (Figuras. 6 e 7).

Apesar de ser considerado crime, passível de pagamento de multa e conforme a situação, até de prisão, em função da legislação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA atualmente vigente no país, leis 5.197/67 de 03 de janeiro de 1967, e 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, muitas pessoas, no sertão nordestino, criam raposas e outros animais silvestres como animais de estimação (Figuras 8, 9 e 10).

Pela literatura consultada (ACHA; SZYFRES, 1986; BACON, 1985; KAPLAN, 1985; TOMA; ANDRAL, 1977; SMITH, 1989; SMITH; BAER, 1988; WANDELER,

1988), observou-se que a prevalência da doença é de difícil quantificação. Existe, portanto, um certo grau de incerteza nos estudos quantitativos da doença, uma vez que as informações disponíveis a respeito da raiva em animais silvestres são incompletas ou inexistem, como é o caso do Brasil. Para Thrusfield (1990), na ausência de informações, o registro da prevalência funciona como um indicador do alcance dos problemas que uma determinada doença provoca, para fins administrativos e também para definir prioridades de investigações e estratégias de controle da enfermidade nas espécies envolvidas. Os maiores empecilhos para se estudar a raiva em animais silvestres, são as dificuldades para se investigar a raiva endêmica. É difícil se obter uma amostra representativa da população de raposas ou qualquer outro carnívoro silvestre, em função de impedimentos legais. Um grande número de animais deveria ser capturado para se obter uma estimativa da prevalência da raiva em uma população infinita ou não estimada (THRUSFIELD, 1990).

Na região de Patos, assim como em todo o Estado da Paraíba, até o momento não existe nenhum laboratório de diagnóstico oficial da raiva, relacionado à área da agricultura ou da saúde. Os casos tidos como prevalência retratam apenas uma “prevalência aparente”, baseado na maioria das vezes, apenas no diagnóstico clínico, uma vez que o Estado também não oferece condições para o diagnóstico laboratorial fora de sua jurisdição.

Este estudo foi iniciado em fevereiro de 2000, após a implantação do Laboratório de Virologia, no Departamento de Medicina Veterinária - DMV, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR, da Universidade Federal de Campina Grande

– UFCG em Patos – PB (Figura 11). Inicialmente, os “animais-alvo” do projeto estavam direcionados somente às raposas do nordeste, porém, alguns veterinários da região, conhecedores da existência do projeto de estudo da raiva em raposas, encaminharam alguns materiais de caprinos e ovinos suspeitos de raiva e, diante de resultados positivos, o serviço de diagnóstico da raiva foi oferecido ao Hospital Veterinário do CSTR – UFCG e os casos de raiva começaram então a ser diagnosticados, incluindo animais domésticos e silvestres do entorno de Patos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a epidemiologia da raiva na região do semi-árido paraibano de Patos-PB, contemplando os seguintes aspectos:

- verificar a ocorrência da raiva nos animais domésticos da região;
- pesquisar a condição de "reservatório" do vírus da raiva, da raposa do nordeste;
- estudar a patogenicidade e o comportamento biológico e imunológico de uma amostra do vírus da raiva isolada da raposa;
- caracterizar, antigenicamente as amostras do vírus da raiva isoladas;
- caracterizar geneticamente as amostras do vírus da raiva isoladas, comparando com outras amostras isoladas no Brasil e no Mundo, de diferentes espécies animais, valendo-se de recursos da bioinformática e dados disponíveis no GenBank.

Figura 01 Sagüis (*Calithrix jacchus*) animais comumente encontrado no Nordeste do Brasil.

Figura 02 Produtor rural agredido por raposa (*D. vetulus*), no município de Patos – PB.

Figura 03* Indivíduos agredidos por raposa (*D. vetulus*), com evidente laceração do lábio inferior do Sr. Genoino, no município de Ouro Branco - RN, semi-árido do Nordeste.
Foto publicado mediante autorização do Sr. Genoino.

Figura 04 Criação de caprinos e ovinos, comum na caatinga da região Nordeste.

Figura 05 Caatinga do Nordeste brasileiro. Região de Patos-PB.

Figura 06 Raposa (*Dusicyon vetulus*) atropelada na PB - 110, próximo ao município de São José do Bonfim – PB.

Figura 07 Raposa (*D. vetulus*) atropelada na BR 230, próximo ao município de Patos – PB.

Figura 08 Raposa (*D. vetulus*) criada como animal de estimação, na zona rural, no município de São José do Bonfim - PB.

Figura 09 Raposa (*D. vetulus*) criada como animal de estimação, na zona urbana, no município de Patos - PB.

Figura 10 Gatos jaguarandi vermelho (*Felis yagouaroundi*), criados como animais de estimação, Patos-PB.

Figura 11 Mapa da Paraíba mostrando estradas e relevo.

2 MATERIAIS e MÉTODOS

2 MATERIAIS e MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Animais

2.1.1.1 Animais para diagnóstico da raiva

Os animais empregados para diagnóstico no presente estudo foram (Quadro 1):

Espécie animal	Número de amostras colhidas por ano			
	Ano 2000	Ano 2001	ano 2002	Ano 2003
⁽²⁾ Raposas vivas	⁽¹⁾ nr	nr	12	nr
⁽²⁾ Raposas atropeladas	15	8	257	7
Eqüinos	1	nr	5	5
Caprinos	nr	nr	1	5
Ovinos	nr	nr	nr	5
Asinino	1	nr	3	1
Bovinos	nr	nr	10	31
Cão	nr	2	3	1
⁽³⁾ Morcegos não hematófagos	nr	nr	192	8
⁽⁴⁾ Guaxinim	nr	3	5	nr

Quadro 1 Número de amostras de cérebros colhidas de diferentes espécies de animais domésticos e silvestres da região do semi-árido nordestino de Patos - PB. São Paulo – 2003.

Nota

⁽¹⁾nr = não realizado.

⁽²⁾raposa do Nordeste *Dusicyon vetulus*.

⁽³⁾da espécie *Molossus molossus*, 192 capturados no prédio onde se localiza o biotério do Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, e 8 enviados de diferentes bairros da cidade, para o diagnóstico.

⁽⁴⁾*Procyon cancrivorus* encontrados atropelados.

2.1.1.1.1 Raposas (*D. vetulus*)

Conforme sua origem, as raposas pesquisadas foram organizadas em dois grupos: raposas vivas e raposas mortas.

Raposas vivas: foram capturadas 12 exemplares, com a devida autorização do IBAMA Nº 332/2001 (Anexo 1), por meio de uma armadilha feita de arame galvanizado, colocando-se iscas à base de peixe ou cabeça de galinha, montada em locais estratégicos, onde as mesmas eram vistas com frequência. Os animais capturados vivos foram anestesiados com uma associação de xilasina 0,1 mg/Kg e ketamina 15 mg/Kg por via intramuscular (Figura 12), transportados ao laboratório e submetidos a um exame clínico para verificar o estado de saúde dos animais, a pesagem além da constatação do sexo e realização de exame da arcada dentária e da bochecha interna à procura de lesões. Depois, todos os animais capturados foram submetidos à eutanásia feita mediante aprofundamento do quadro anestésico e o emprego de T-61[®] (droga curarizante) na dosagem indicada pelo fabricante.

Raposas mortas: foram colhidas 287 raposas encontradas mortas nas rodovias ("road - kills"), atropeladas por veículos motorizados (Figuras 6 e 7). As rodovias onde foram recolhidas as raposas atropeladas são aquelas que cortam o semi-árido do Estado da Paraíba, nas proximidades do Município de Patos a 320 Km do litoral, entre as latitudes Sul – 06°46'19" e 07°38'32" e longitudes Oeste – 36°42'52" e 38°08'56" (Figura 13). As rodovias foram: BR-230, que liga Patos a Pombal e Patos a Santa Luzia, BR-361 que liga Patos a Itaporanga, BR-110 que liga Patos a Teixeira,

PB-238 que liga Desterro a Tavares e a rodovia que liga Patos a Cacimba de Areia. Para o recolhimento de animais atropelados foi utilizada a frota de veículos que servem a região para transporte alternativo de pessoas e produtos que servem a feira de Patos (Figura 14), realizadas de segunda a sábado. Cada motorista voluntário que aderiu a este estudo foi alertado dos riscos de transmissão de doenças, recebeu instruções sobre os procedimentos a tomar para a realização desta tarefa e recebeu também, luvas e sacos plásticos para o recolhimento de cadáveres de forma segura. Toda manhã era realizada uma ronda nos pontos de serviço dos motoristas, para o recolhimento de cadáveres, a fim de serem transportados ao Laboratório de Virologia do CSTR-UFCG.

Os animais recebidos eram processados imediatamente ou armazenados em congeladores. Na necrópsia, foi retirado o cérebro (Figuras 15 e 16) para pesquisa do antígeno rábico, o estômago foi aberto para verificação dos hábitos alimentares da espécie e os outros órgãos como: fígado, baço e linfonodos mesentéricos foram doados para o setor de Imunologia, as alças intestinais foram encaminhadas para a Parasitologia e carcaças e cabeças em bom estado foram doados para a Anatomia, visando outras pesquisas. O restante dos materiais foi queimado.

Figura 12 Raposa (*D. vetulus*) em armadilha, no momento em que é anestesiada.

Figura 13 Mapa da Paraíba, destacando a região polarizada por Patos

Figura 14 Transporte alternativo que serve à região de Patos-PB, utilizado na colheita de animais atropelados.

Figura 15 Necrópsia de raposa, realizado no Laboratório de Virologia do CSTR-UFCG em Patos-PB.

Figura 16 Cérebro de raposa, colhido após necrópsia, mostrando detalhe anatômico característico da espécie.

2.1.1.1.2 Morcegos não hematófagos (*M. molossus*)

Foi realizada a captura utilizando-se uma rede de malha, apropriada (mist nets), na entrada do prédio do Biotério localizado no CSTR-UFCG - Patos. A rede foi instalada ao entardecer na saída do forro e foram capturados 192 morcegos. Outros 8 exemplares foram encontrados caídos ou fora do horário habitual, na zona urbana no Município de Patos – PB e enviados para diagnóstico. Todos os morcegos examinados eram insetívoros, pertencentes ao gênero *Mollossidae*, espécie *molossus* que foram mantidos congelados à temperatura de -20°C para processamento posterior (Figura 17).

2.1.1.1.3 Guaxinins(*P. cancrivorus*)

Os guaxinins pesquisados foram 8 e todos encontrados atropelados nas mesmas rodovias onde foram colhidas as raposas atropeladas e no mesmo período de colheita das mesmas.

2.1.1.1.4 Animais domésticos

Foram submetidos ao diagnóstico, 41 bovinos, 11 eqüinos, 5 asininos, 6 caprinos, 5 ovinos e 6 cães, enviados pelo Setor de Patologia do Hospital Veterinário do CSTR – UFCG, todos com suspeita de raiva.

2.1.1.2 Animais para infecção experimental

2.1.1.2.1 Caprinos e ovinos

Os caprinos e ovinos procedentes do CSTR – UFCG foram infectados experimentalmente para o estudo do comportamento biológico do vírus isolado da raposa. Foram 4 animais, 2 ovinos e 2 caprinos entre 3 e 4 meses, inoculados no masséter, mantidos em observação, confinados em jaulas de arame e alimentados *ad libitum* com água e forragem verde.

2.1.1.2.2 Asininos e eqüinos

Os asininos e eqüinos, procedente da criação do CSTR – UFCG, foram mantidos em baias com cercado de madeira, em 5 grupos de 4 animais, sendo alimentados com forragem verde e água à vontade. Estes animais, após um período de adaptação nas baias, foram vacinados contra a raiva com uma vacina comercial de vírus inativado, receberam um reforço após 30 dias e foram desafiados com uma amostra de vírus isolada de uma raposa, 90 dias após a primeira dose da vacina. Um dos grupos, composto por 2 asininos e 2 eqüinos, não foi vacinado (grupo testemunho) e foi desafiado no mesmo dia que os demais.

2.1.1.2.3 Camundongos

Os camundongos utilizados no presente experimento foram suíços albinos, adultos-jovens, com peso variando de 12 a 16 gramas, linhagem CH3 - Rockefeller, criados no biotério do Departamento de Medicina Veterinária do CSTR - UFCG, Patos-PB. Esta linhagem foi obtida do biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP, que por sua vez, obteve do Laboratório de Febre Aftosa - LAFAB, do Ministério da Agricultura, localizado em Barretos-SP, na década de 70 do século passado. Os animais foram empregados para o diagnóstico e isolamento do vírus da raiva, além da titulação do vírus e prova de soroneutralização dos soros de asininos e eqüinos vacinados e

raposas capturadas vivas. Todos os animais sobreviventes ao final dessas provas foram submetidos à eutanásia com éter etílico e as carcaças foram autoclavadas e destinadas para a coleta do lixo hospitalar.

2.1.2 Soros de raposas

As raposas capturadas vivas foram sangradas pela punção da veia jugular, com seringas plásticas descartáveis de 10 mL, com agulha 40 x 12. Após separar o coágulo sangüíneo, os soros foram armazenados à temperatura de -20°C até o momento do uso. Estes soros foram submetidos à prova de soroneutralização em camundongos para a avaliação de anticorpos anti-rábicos.

2.1.3 Cérebros de animais

Cérebros de diferentes espécies de animais domésticos e silvestres, submetidos ao diagnóstico laboratorial da raiva, quando positivos, tanto os originais como os de primo isolamento em camundongos, foram mantidos congelados à temperatura de -20°C e transportados ao Laboratório de Raiva do VPS da FMVZ-USP, onde as amostras foram processadas para a extração do material genético.

2.1.4 Diluente

Foi utilizado para preparação das suspensões de cérebros para a prova biológica, diluição dos vírus e diluição dos soros um diluente constituído de água destilada esterilizada, contendo 2% (v/v) de soro de coelho, esterilizado por filtração com filtro clarificante Millipore^{®1}, com pH 7,2, contendo penicilina (500 UI/mL) e estreptomicina (1560 UI/mL), conforme Koprowski (1996).

2.1.5 Soro anti-rábico padrão

Utilizou-se na prova de soroneutralização em camundongos, o soro anti-rábico positivo padrão, aferido em UI/mL, contendo 150UI/mL, procedente do Instituto Pasteur de São Paulo (Secretaria do Estado da Saúde do Estado de São Paulo). Este soro foi utilizado somente para avaliar os soros de raposas capturadas vivas.

¹ **Millipore®** - Milipore Filter Corporation. Bedford, Manachusetts, USA. HAWP 04700 25 ea. HA 0,45µ white, plain, 47mm

2.1.6 Conjugado anti-rábico imunofluorescente

O conjugado anti-rábico imunofluorescente foi produzido no Laboratório de Raiva do VPS da FMVZ-USP, a partir de soro hiperimunizado de hamsters, conforme o Centro Panamericano de Zoonoses (1975), utilizando como antígeno a vacina anti-rábica comercial Defensor^{®2}. A imunoglobulina IgG foi marcada com o isotiocianato de fluoresceína - SIGMA^{®3} e o conjugado obtido foi comparado com o conjugado anti-rábico SANOFI^{®4}, antes da sua utilização, com a diluição de trabalho ajustada para 1:100.

2.1.7 Amostra CVS 31/2 (Challenge Virus Standard)

A amostra CVS-31/2 do vírus fixo de raiva foi obtida do Centro Panamericano de Zoonoses - CEPANZO, Argentina, na década de 80 do século passado e foi armazenada em temperatura de Nitrogênio líquido a -196°C , depois de duas passagens em camundongos por via IC. Uma vez descongelado, o vírus foi submetido a quatro passagens sucessivas pela via IC em camundongos, quando então foi armazenada à temperatura de -20°C . Para sua utilização, a amostra foi reativada em camundongos por via IC, e utilizada como antígeno na prova de soroneutralização e na prova de IFD para a absorção do conjugado anti-rábico.

² **Pfizer®** - Laboratório Pfizer Ltda. Vacina contra a raiva dos cães, gatos, bovinos e ovinos. Partida 008/2000 e fabricada em outubro de 2000.

³ **SIGMA®** - Chemical Company. Fluorecein isothiocyanate – Isome I. N° F – 7250.

⁴ **SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR – Antibodies anti-rabies nucleocapsid. Lot/ch.-B. 8h031.T**

2.1.8 Vacina comercial de vírus inativado

Para a imunização de asininos e eqüinos, foi utilizada a vacina Raí-Vet^{®5} de vírus inativado, gentilmente cedida pelo fabricante, na dose de 2 ml por via intramuscular na tábua do pescoço, com aplicação de um reforço após 30 dias.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Prova de inoculação intracerebral em camundongos (ICC)

A prova de ICC foi realizada em camundongos, com 0,03ml de inóculos variados. Os inóculos consistiram ora de uma suspensão a 20% (p/v) de cérebros de diferentes espécies animais, ora de diluições seriadas da mistura soro-vírus. Os animais inoculados foram observados por períodos variando de 21 a 30 dias, à procura de sinais de raiva. As observações diárias dos camundongos foram realizadas sempre na parte da manhã, com apenas uma leitura a cada 24 horas. Mortes ocorridas antes do quinto dia pós-inoculação não foram consideradas como sendo de raiva, conforme a metodologia descrita por Koprowski (1996).

⁵ **Laboratório BioVet.** Lote e partida 543/01. Fabricada em agosto de 2001 e vencimento em agosto de 2003.

2.2.2 Prova de imunofluorescência direta (IFD)

Os fragmentos de cérebro foram pressionados em lâminas de microscopia e as lâminas fixadas em acetona à temperatura de -20°C , por duas horas, para a obtenção da impressão do antígeno. Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram colocadas em caixas de madeira, para acondicionamento onde foram mantidas à temperatura de -20°C , e processadas em diferentes momentos. O conjugado anti-rábico foi colocado em contato com a impressão por 30 minutos à temperatura de 37°C , em seguida foram realizadas três lavagens com solução salina fosfatada (PBS, pH 7,4, 0,1mol/litro), secadas e montadas com lamínulas, utilizando glicerina tamponada, pH = 8,0. Na leitura em microscopia, as lâminas com inclusões intracitoplasmáticas fluorescentes foram registradas como sendo positivas, de conformidade com o método descrito por Goldwasser e Kissling (1958), com ligeira modificação, descrita por Dean; Abelseth e Atanasiu (1996).

2.2.3 Titulação do vírus

A amostra CVS 31/2 do vírus da raiva, após reativação por via IC em camundongos, foi titulada, em diluições seriadas de razão 10, com o diluente, partindo-se de uma suspensão inicial de cérebro de camundongos a 20% (p/v) e cada diluição do vírus foi inoculada pó via intracerebral (IC) em 10 camundongos, com um volume de 0,03mL, nas diluições que variavam de 10^{-2} a 10^{-7} . Os

camundongos inoculados foram observados por 21 dias à procura de sinais da raiva. Todos os camundongos mortos a partir do quinto dia pós-inoculação e manifestando sinais nervosos característicos da raiva foram considerados positivos. O título de vírus foi calculado de acordo com o método descrito por Reed e Muench (1938) e expressos em log da $DL_{50}/0,03\text{mL}/\text{IC}$ (dose letal 50% por 0,03mL/ via IC/ em camundongos).

2.2.4 Prova de soroneutralização

A prova de soroneutralização em camundongos foi realizada com o método de “dose fixa do vírus-diluição variada do soro”, de acordo com Atanasiu (1967). As amostras de soros foram submetidas à temperatura de 56°C por 30 minutos para inativação do complemento. Os soros de raposas foram diluídos em série na razão 2, com o diluente. Cada diluição de soro foi adicionada a um igual volume de vírus CVS, previamente titulado para conter aproximadamente 300 $DLIC_{50}/0,03\text{mL}$. Depois de incubado a 37°C por 90 minutos, cada diluição da mistura foi inoculada em cinco camundongos com um volume de 0,03mL por via IC. Cada prova foi acompanhada da titulação paralela do vírus CVS, incluindo-se o grupo de animais inoculados com o soro padrão positivo aferido em UI/mL. Os animais inoculados foram observados durante 21 dias em busca de sinais da raiva. Os cálculos dos títulos soroneutralizante 50% (SN_{50}) foram obtidos conforme o método descrito por Reed e Muench (1938) e expressos como recíproca da diluição.

2.2.5 Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para detecção de antígeno em órgãos

Foi realizada com os órgãos dos caprinos e ovinos colhidos após a necrópsia, para detectar a presença de nucleoproteína viral. Os primers usados foram P510/P784 e P510/P942 (P515: ATAGAGCAGATTTTCGAGACAGC; P784: CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA; P942: CCCATATAACATCCAACAAAGTG) As amostras foram diluídas a 20% em PBS e o RNA extraído pelo método do TRIzol[®] LS². A transcrição reversa e a amplificação da nucleoproteína foram realizadas, de acordo com o método descrito por Soares et al. (2002).

2.2.6 Caracterização antigênica com MABs

Amostras de vírus isoladas de raposa e de outros animais foram analisadas com um painel de 473 anticorpos monoclonais (MABs) direcionados contra as várias proteínas estruturais do vírus da raiva, desenvolvidos pelo Dr. Alex Wandeler e executados pelas Dras. Fernanda Bernardi, Susan Nadin-Davis e Janet Armstrong, no laboratório do "Canadian Food and Inspection Agency Fallowfield", de Ottawa, Canadá. Patrocinado pelo IICA – Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture. A técnica usada foi a imunofluorescência indireta em lâminas e cultivo celular a partir do material original.

² Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA 92008 (760) 603-7200. Part. N° 500650. MSDS N° 17207.

2.2.7 Caracterização genética

2.2.7.1 Com o gene da proteína M1

2.2.7.1.1 Extração do RNA

Amostras de cérebros originais ou de camundongos inoculados com o vírus isolado na sua primeira passagem, foram submetidos à extração do RNA usando o TRIzol[®] LS³, de acordo com o protocolo de Nadin-Davis (1998)

2.2.7.1.2 Reação de RT-PCR

Após extração do RNA, os materiais foram submetido à prova de RT-PCR, seguindo-se a metodologia descrita por Nadin-Davis (1998), com a utilização da seguinte sequência de primers:

P – for (#887) – PV co-ordinates 1249 – 1272

5' - CTACTTCTCCGGGAAACCAGAAG – 3'

³ Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA 92008 (760) 603-7200. Part. N° 500650. MSDS N° 17207.

P – rev (#888) – PV co-ordinates 2575 – 2596

5' – GG(AG)AGCCA(TC)AGGTC(AG)TCGTCAT – 3'

2.2.7.1.3 Seqüenciamento do gene da proteína M1

Após amplificação, os produtos do PCR foram seqüenciados de acordo com a metodologia descrita por Nadin-Davis et al (2002), no "Canadian Food and Inspection Agency", Fallowfield, Ottawa, Canadá, patrocinado pela IICA – "Inter-American Institutes for Cooperation on Agriculture", do governo canadense.

2.2.7.2 Com o gene da proteína N

2.2.7.2.1 Extração do RNA

Foi realizado diretamente de uma suspensão de cérebros de camundongos inoculados com o vírus isolado na sua primeira passagem, usando o reagente comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit.⁴, conforme descrito por Ito et al.(2001).

⁴ QIA-GEN K.K. Japan.

2.2.7.2.2 Reação de RT-PCR

Após extração do RNA, os materiais foram submetido à prova de RT-PCR, seguindo-se a metodologia descrita por Arai et al.(1997), com a utilização de um conjunto de primers RHN1/RHNS3.

- Primer RHN1, com seqüência do nucleotídeo 5' - 3':
ACAGACAGCTCAATTGCAAAGC, posição 28-50, messsenger RNA.
- Primer RHNS3, com seqüência do nucleotídeo 5' - 3':
CTAGGATTGACAAGATTTTGCTC, posição 1516-1539, genomic RNA.
- Os produtos de amplificação da RT-PCR foram enviados para o laboratório do "National Institute of Infectious Diseases", de Toyama, Tóquio, Japão, para serem seqüenciados geneticamente e analisados quanto à sua filogenia, em um projeto coordenado pelo Prof. Dr. Takeo Sakai e Prof. Dr. Takuya Itou, pesquisadores da Nihon University. de Kanagawa, Japão, através de convênio firmado entre a FMVZ-USP e o College of Bioresource Sciences – CBS da Nihon University.

2.2.7.2.3 Seqüenciamento do gene da proteína N

Com o uso do seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, Japan e com o emprego do "kit" comercial PRISMS Ready Reaction Dyedeoxy Terminator Cycle sequencing Kit

(Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, Japan), o produto amplificado de RT-PCR foi sequenciado pelo National Institute of Infectious Disease, Toyama, Tóquio, Japão. Para o seqüenciamento, seguiu-se a metodologia descrita por Ito et al. (2001).

2.2.8 Análise filogenética

Os resultados do seqüenciamento foram comparados com os resultados de outras amostras isoladas do Brasil, ou com outras amostras isoladas no Mundo através de dados disponíveis no GenBank/database (accession numbers) e os estudos do alinhamento de nucleotídeos entre as amostras pertencentes a diferentes genótipos M1 e N, relacionados a partes dos nucleotídeos codificadores das proteína M1 e N foram realizados com o emprego de ferramentas da bioinformática, como o programa CLUSTAL X, com a construção da árvore filogenética, segundo Thompson et al., (1997). Os agrupamentos foram testados segundo o método de "Bootstrap" com 100 replicações e valor do "Bootstrap" > 90 % para fosfoproteína e > 70 % para nucleoproteína foi interpretado como evidência de grupamento filogenético (HILLIS; BULL, 1993). Para a ilustração gráfica do dendrograma, foi utilizado o programa TREEVIEW, "free download", disponível na Internet.

2.2.9 Procedimento experimental

Os cérebros de animais domésticos e silvestres, colhidos após a necrópsia, foram submetidos ao diagnóstico da raiva por meio de IFD e ICC, no Laboratório de Virologia do CSTR-UFCG. Os materiais positivos foram conservados em glicerina tamponada a 50% e armazenados à temperatura de -20°C . As amostras isoladas foram enviadas ao Laboratório de Raiva do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ-USP, para extração do material nucléico, para fins de tipificação genética e estudo filogenético. Em seguida, estas amostras foram caracterizadas antigênicamente com uma bateria de MABs do Canadian Food and Inspection Agency, Fallowfield, Ottawa, Canadá, patrocinado pelo IICA - Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture. O estudo do comportamento biológico das amostras foi realizado em camundongos, pela inoculação por via intracerebral, avaliando-se o período de incubação e o período clínico, no seu primo-isolamento. Em seguida, uma amostra de raposa foi inoculada em caprinos e ovinos por via intramuscular, para verificação da patogenicidade, período de incubação, período clínico e viscerotropismo nessas espécies. Esta amostra também foi utilizada para o desafio de asininos e eqüinos vacinados com uma vacina comercial de vírus inativado, para estudar o comportamento imunológico e biológico nestas espécies animais bastante comuns no Nordeste brasileiro. Os níveis de anticorpos anti-rábicos soroneutralizantes de asininos e eqüinos vacinados e raposas capturadas vivas, foram avaliados em camundongos pela prova de soroneutralização.

Figura 17 Morcego insetívoro (*M. molossus*) após colheita do cérebro.

		3 RESULTADOS
--	--	---------------------

3 RESULTADOS

A implantação do laboratório de diagnóstico de raiva no CSTR - UFCG em Patos - PB, possibilitou o diagnóstico e o isolamento da primeira amostra do vírus da raiva da raposa *D. vetulus*, em outubro de 2000. A partir deste primeiro caso, outros casos foram se sucedendo, incluindo outras espécies animais, conforme demonstrado no Quadro 2.

Os resultados da IFD e ICC e avaliação antigênica com MABs de materiais procedentes de diferentes espécies animais, domésticos e silvestres, do semi-árido paraibano da região de Patos, estão ilustrados no Quadro 2.

Durante a captura das raposas vivas foi possível observar as características da região estudada. A cobertura vegetal é típica da caatinga (Figuras 4 e 5), sendo que prevalecem as áreas desmatadas, formando campos limpos ou em plena recuperação. Na região, está presente ainda parte do Planalto da Borborema com uma cadeia de montanhas que se estende da divisa do Estado do Rio Grande do Norte à divisa do Estado de Pernambuco ao leste, e ao longo da divisa com Pernambuco, ao sul (Figura 11). Na região são encontradas também cavernas naturais e minas abandonadas (Figuras 18 e 19), onde foram identificadas colônias de morcegos. Estes locais, para as raposas, servem de refugio e ao mesmo tempo, um local para se alimentarem.

Figura 18 Caverna no semi-árido paraibano, no município de Santa Luzia-PB.

Figura 19 Mina abandonada nas proximidades de Santa Luzia-PB.

Na região, é comum encontrar represas ao longo das estradas, que além de se prestarem como reservatórios de água nos períodos de seca, também favorecem a manutenção de uma grande variedade de pequenas espécies que se prestam para alimentação das raposas.

Espécie animal	IFD ⁽¹⁾	ICC ⁽¹⁾	MABs				
			Canino	Raposa		Morcego hematófago	Morcego insetívoro
				1	2		
Raposa	12/299	12/299y	nr ⁽²⁾	3	7	nr	nr
Caprino	2/6	1/6	nr	nr	nr	nr	nr
Ovino	1/5	1/5	nr	nr	nr	nr	nr
Morcego	9/200	8/200	nr	nr	nr	nr	6
Bovino	19/41	19/41	nr	nr	nr	5	nr
Eqüino	3/11	2/11	nr	nr	nr	3	nr
Asinino	2/5	2/5	nr	nr	nr	1	nr
Cão	2/6	2/6	1	nr	nr	nr	nr
Guaxinim	0/8	0/8	nr	nr	nr	nr	nr

Quadro 2 Resultados da prova de imunofluorescência (IFD), inoculação intracerebral em camundongos (ICC) e perfil antigênico com anticorpos monoclonais (MABs) anti-rábicos do Canadian Food and Inspection Agency Fallowfield, Ottawa, Canadá, de materiais procedentes de diferentes espécies animais, domésticos e silvestres, do semi-árido paraibano da região de Patos – PB. São Paulo - 2003

Nota:

⁽¹⁾positivo /Total amostras testadas

⁽²⁾nr = não realizado.

O Quadro 2 mostra que de 581 materiais examinados durante o período do experimento, 50 foram diagnosticados positivos na IFD e 47 se confirmaram na ICC o que equivale a 8,60% e 8,09%, respectivamente nas duas provas. Relativamente às espécies, 19/41 (46,34%) amostras de bovinos; 12/299 (4,01%) de raposas; 1/5

(20,00%) de ovinos e 2/6 (33,33%) de caninos apresentaram resultados positivos para ambas as provas. Amostras procedentes de caprinos, eqüinos e morcegos apresentaram resultados discrepantes entre as provas de IFD e ICC, de 2/6 (33,33%) e 1/6 (16,67%); 3/11 (27,27%) e 2/11 (18,18%); e 9/200 (4,50%) e 8/200 (4,00%), respectivamente.

À necrópsia, o conteúdo observado no estomago das raposas foi muito variado, dependendo da estação seca ou chuvosa. Foram observados fragmentos de diversas espécies como: insetos, répteis, anfíbios, roedores e aves, frutos do juazeiro, pedaços de melão, melancia, manga, cajú e frutos nativos não identificados. Na estação de seca, sobras de consumo humano eram mais freqüentemente encontrados, tais como ossos de animais (galinha, cabrito e porco), restos de comida (arroz e feijão) e até mesmo sacos plásticos, papéis e materiais não identificáveis.

Todas as amostras com isolamento positivo na prova de ICC apresentaram período de incubação entre 7 e 16 dias, na sua primeira passagem, com sinais de excitação, pelos eriçados, emagrecimento progressivo, paralisia e morte, de 1 a 8 dias após a citada manifestação. Todas estas amostras clinicamente positivas em camundongos foram confirmadas na prova de IFD.

A amostra viral da raposa, inoculada por via intramuscular em caprinos e ovinos apresentou um período de incubação entre 17 e 18 dias, com duração clínica de 1 a 5 dias.

Os sintomas apresentados pelos caprinos e ovinos foram:

Caprino 1: Ao décimo oitavo dia após o desafio o animal apresentou perda de apetite e constante reação de *flehmen* (Figura 20). No dia seguinte houve prurido na cabeça, aumento da libido e priapismo. Ao final desse dia foi separado do outro caprino, pois se tornou agressivo, com investidas constantes e tentativas de monta. Três dias após o início dos sintomas, o animal continuou agressivo, com reação de *flehmen*, olhos e orelhas atentos e investidas contra qualquer tentativa de aproximação. Ao longo do dia o quadro evoluiu para incoordenação motora, dificuldade em levantar-se, salivação intensa, decúbito lateral, diminuição da frequência respiratória, coma e morte.

Caprino 2: Os sintomas começaram aos dezoito dias pós-inoculação, com perda de apetite, ranger dos dentes e dificuldade de mastigação e apreensão. No dia seguinte apresentou exacerbação da libido, priapismo constante e prurido na cabeça. O animal teve dificuldade em se alimentar e apresentou bocejos. Ao final do dia evoluiu para incoordenação motora e sinais de tontura e perda de visão. No vigésimo dia após o desafio o animal amanheceu em decúbito lateral, com movimentos de pedalar e contrações musculares. Ainda continuou com prurido na cabeça, bocejos e priapismo. O quadro clínico evoluiu para opistótono, tentativa de emitir sons, respiração superficial, salivação intensa e olhos atentos, morrendo após cinco dias do início dos sintomas.

Ovino 1: Dezessete dias após a inoculação o animal apresentou apatia, perda de apetite, estertores, prurido na cabeça principalmente no local de inoculação, orelhas

caídas sacudindo-as repetidamente, dificuldade em abrir a boca e deglutir. Ao final do dia os sintomas evoluíram para salivação intensa, secreção nasal, tosse, movimentos de bocejo e tentativas de emitir sons e/ou deglutir. Durante todo o período esse ovino manteve-se em estação (Figura 21), morrendo no décimo oitavo dia pós-inoculação.

Ovino 2: Os sintomas iniciaram aos dezoito dias pós-inoculação com perda de apetite, prurido, orelhas caídas, sacudindo-as, depressão e decúbito esternal. No décimo nono dia pós-inoculação esse animal tentou manter-se em estação, ainda com balançar de orelhas e prurido na cabeça. Após 48 horas do início dos sintomas manteve-se em decúbito lateral, mordendo os cascos e a gaiola, apresentando movimentos de pedalar, salivação intensa e mastigação constante, presença de secreção nasal espumosa. A morte ocorreu no mesmo dia.

À necrópsia observou-se edema pulmonar e aumento de volume do líquido cefalo-raquidiano dos quatro animais. Todos os cérebros foram positivos para raiva pelas provas de IFD e ICC.

Pela técnica de RT-PCR foram encontrados resultados positivos para os materiais da glândula salivar, cérebro, fígado e coração dos dois caprinos. No primeiro caprino, o rim foi encontrado positivo e no segundo, o pulmão. No primeiro ovino, foram positivos os fragmentos do pulmão, cérebro, coração e glândula salivar. E para o segundo ovino, apenas o cérebro, coração e fígado foram positivos. Não foi possível isolar o vírus através da inoculação intracerebral em camundongos, a partir de macerados de nenhum órgão não nervoso.

Figura 20 Caprino inoculado com vírus rábico, apresentando reflexo de *flehmen*.

Figura 21 Ovino inoculado com vírus rábico, com evidente apatia.

As amostras de soro de raposa submetidas à soroneutralização em camundongos apresentaram títulos < 5. Os títulos soroneutralizantes dos asininos e eqüinos imunizados com a vacina comercial de vírus inativado estão apresentados no Quadro 3. Durante o período de 9 meses, nos quais os animais foram observados, após o desafio com uma amostra de vírus isolada de raposa, não foi registrada nenhuma morte por raiva nos grupos de animais vacinados. Já no grupo controle a mortalidade atingiu 100% dos animais no mesmo período. Os períodos de incubação observados foram de 92 a 99 dias para os asininos e de 179 a 190 dias para os eqüinos.

Animal	N° USP	20/4/2002	18/5/2002	15/6/2002	16/7/2002	17/8/2002	21/9/2002
		Vacinação	Reforço		Desafio		
E 0	1	< 5	537	320	80	245	141
E 1	2	< 5	320	1023	160	320	275
E 2	3	< 10	>1280	>1280	281	320	320
E 3	4	< 10	>1280	1023	281	320	320
¹ E 4	5	< 10	<80	<80	<80	<80	<80
E 5	6	< 10	>1280	>1280	320	281	320
E 6	7	< 5	<80	<320	112	269	123
¹ E 7	8	< 5	<80	<80	<80	<80	<80
E 8	9	< 5	117	<320	80	320	275
A 0	10	< 5	177	<320	257	257	320
A 11	11	< 5	407	>1280	141	320	320
A 12	12	< 5	218	537	80	320	320
A 13	13	< 5	190	741	112	204	320
¹ A 14	14	< 5	<80	<80	<80	<80	<80
A 15	15	< 5	160	640	112	144	320
A 16	16	< 5	134	489	134	204	320
¹ A 17	17	< 5	<80	<80	<80	<80	<80
A 18	18	< 5	109	320	80	269	320
A 19	19	< 5	281	891	141	320	320

Quadro 3 Título de anticorpos anti-rábico soroneutralizantes em asininos (A) e eqüinos (E) imunizados com vacina comercial de vírus inativado, em diferentes períodos pós-vacinação e desafiados com amostra de vírus rábico isolado de raposa, no semi-árido paraibano Nordeste do Brasil. São Paulo, 2004.

¹ Animais não vacinados e inoculados

> ou <: Título final não determinado.

Figura 22 Asininos inoculados por via intramuscular com vírus rábico originário de raposa, em diferentes fases após o aparecimento dos sintomas.

Da bateria de 473 MABs, foi possível selecionar 10 anticorpos capazes de diferenciar as amostras nos cinco grupos formados pelo seqüenciamento do gene da fosfoproteína. Na análise antigênica de 10 amostras de raposas, sete delas, embora diferentes, denominado de perfil raposa 1, se aproximaram do perfil canino e três amostras não foram compatíveis com o perfil do cão, formando um grupo mais diferenciado, denominado de perfil raposa 2. Todas as amostras submetidas à bateria de MABs foram diferenciadas em cinco grupos distintos, denominados de: cão, raposa 1, raposa 2, morcegos insetívoros e morcegos hematófagos (Quadro 4).

Os resultados da análise antigênica utilizando MABs desenvolvidos pela "Canadian Food and Inspection Agency" - Canadá, com as amostras obtidas na região de Patos, estão apresentados no Quadro 4.

Var.	Cã o	Raposa 1				Raposa 2						Morcego hematófago										Morcego insetívoro	
Esp.	Cão	Raposas				Raposas						Bovinos						Equínos		Asno	<i>Molossus molossus</i>		
Iden ¹	986	913	914	997	915	996	998	999	1000	1001	1002	938	940	951	963	978	984	945	968	911	990	994	
MABs																							
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	-	-	
4	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	-	-	2+	3+	-	3+	3+	
5	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	-	-	
6	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	
7	3+	3+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	
10	-	2+	2+	2+	2+	2+	-	-	2+	2+	2+	3+	-	3+	3+	2+	-	2+	3+	-	3+	2+	

Quadro 4 Grupos de variantes (Var.) resultantes da análise antigênica de amostras de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies (Esp.) de animais domésticos e silvestres, da região de Patos – PB, com anticorpos monoclonais (MABs) cedidos pelo "Canadian Food and Inspection Service" - Canadá. São Paulo, 2004.

¹ número de identificação.

- reação negativa

2+ reação positiva forte.

3+ reação positiva muito forte.

MABs:

1 – 1C5-5-2;

2 – 32HD2

3 – 32FF1

4 – M1590

5 – M1745

6 – M1318

7 – M1748

8 – M1495

9 – 11DD1

10 – M1386

Os resultados da análise do seqüenciamento do gene da proteína M1, tendo como referência a amostra CVS, estão representados no dendrograma da Figura 8. Estes resultados foram utilizados como referência para a seleção dos MABs.

Figura 23 Análise filogenética entre amostras de vírus rábico isoladas no Brasil, de diferentes espécies, tendo como referência a amostra CVS, com base na homologia de nucleotídeos do gene da proteína M1, usando-se uma seqüência de 350 bp. A aproximação genética foi obtida mediante aplicação do programa CLUSTAL X. Para definição dos grupos aplicou-se Método Bootstrap com 100 repetições, considerando-se um valor >90%. A relação das amostras encontra-se no Quadro 5.

Identificação	Ano de isolamento	Cidade	Estado	Hospedeiro
903	1989	São João da Boa Vista	São Paulo	Cão
904	1989	Mogi Guaçu	São Paulo	Cão
905	1999	Guararema	São Paulo	Eqüino
906	1995	Taubaté	São Paulo	<i>Desmodus rotundus</i>
907	1996	Não informada	Tocantins	Bovino
908	2002	Patos	Paraíba	<i>Molossus molossus</i>
909	1989	São João da Boa Vista	São Paulo	Gato
911	2001	Patos	Paraíba	Asinino
912	2001	Patos	Paraíba	Eqüino
913	2002	Patos	Paraíba	Raposa
914	2001	Patos	Paraíba	Raposa
915	2000	Patos	Paraíba	Raposa
939	1998	Taubaté	São Paulo	<i>Desmodus rotundus</i>
941	2001	Patos	Paraíba	Eqüino
943	2000	Guarulhos	São Paulo	<i>Desmodus rotundus</i>
953	1993	Santos	São Paulo	Ovino
959	2001	Jacareí	São Paulo	Bovino
963	2001	Santana do Parnaíba	São Paulo	Bovino
964	1998	Poços de Caldas	Minas Gerais	Bovino
969	?	Goiânia	Goiás	Cão
971	2002	Patos	Paraíba	Bovino
973	?	Cassilândia	Mato Grosso do Sul	Cão
976	1987	Londrina	Paraná	Cão
978	?	Ponta Porá	Mato Grosso do Sul	Bovino
981	1987	Poços de Caldas	Minas Gerais	Cão
982	2001	Juará	Mato Grosso	Bovino
986	2002	Patos	Paraíba	Cão
990	2002	Patos	Paraíba	<i>Molossus molossus</i>
996	2002	Patos	Paraíba	Raposa
1009	1995	Taubaté	São Paulo	<i>Desmodus rotundus</i>

Quadro 5 Relação de amostras de vírus rábico submetidas a análise filogenética após serem seqüenciadas no "Canadian Food and Inspection Service" - Canadá, com seus respectivos anos de isolamento, local e hospedeiro de origem. VPS – FMVZ – USP. São Paulo, março de 2004.

Figura 25. Dendrograma da relação filogenética estabelecida entre amostras de vírus rábico, com 100 replicações no "bootstrap". Vírus do Gênero *Lissavirus* genótipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, estão distribuídos na parte superior da árvore. Agrupamento por homologia de 203 bp do gene N, de amostras isoladas nos estados de São Paulo(SP), Goiás(GO), Minas Gerais(MG) e Paraíba(PB), em cão(dg), gato(ct), humano(hm), equino(hr), suíno(pg), bovino(bv), raposa(fx), *M. molossus*(Ms), *D. rotundus*(Dr), *Artibeus lituratus*(AL), *A. planirostris*(Ap) e ovino (sp). Foi considerado um Bootstrap > 70% para 100 replicações.

Figura 26 Dendrograma da relação filogenética estabelecida entre amostras de vírus rábico isoladas de carnívoros de diferentes continentes (GenBank) e carnívoros do Brasil (Quadro 6). Com base na sequência de 203 bp do gene N, considerando um Bootstrap > 70% para 1000 replicações.

Nome da amostra	Ano do isolamento	Cidade	Estado	Hospedeira	Accession number
P1	2002	Patos	Paraíba	Raposa	
P2	2000	Patos	Paraíba	Raposa	
P3	2001	Patos	Paraíba	Raposa	
P4	2002	Patos	Paraíba	Raposa	
P5	ND	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P6	ND	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P7	ND	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P8	ND	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P9	ND	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P10	ND	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P13	2002	Patos	Paraíba	Raposa	
P14	2002	Patos	Paraíba	Raposa	
P15	2002	Patos	Paraíba	Raposa	
P16	2002	Patos	Paraíba	Raposa	
P17	2003	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P18	2003	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P19	2003	Patos	Paraíba	<i>M. molossus</i>	
P20	2003	Patos	Paraíba	Caprino	
P21	2003	Patos	Paraíba	Ovino	
P22	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P23	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P24	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P25	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P26	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P27	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P28	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P29	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P30	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P31	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P32	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P33	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P34	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P37	2002	Patos	Paraíba	Bovino	
P40	2000	Patos	Paraíba	Asinino	
P41	2003	Patos	Paraíba	Bovino	
P42	2002	Patos	Paraíba	Bovino	
BRdg2	1999	Goiânia	Goiás	Cão	
BRct3	1999	Goiânia	Goiás	Gato	
BRct5	1998	Goiânia	Goiás	Gato	
BRhm6	1999	Goiânia	Goiás	Humano	
BRdg10	1987	Pocos de Caldas	Gerais	Cão	
BRdg12	1989	Mogi Guaçu	São Paulo	Cão	
BRdg15	1999	Anápolis	Goiás	Cão	
BRbv17	1998	Anápolis	Goiás	Bovino	
BRhr18	1999	Bela Vista	Goiás	Eqüino	

BRhm23	1999	Goiânia	Goiás	Humano	
BRpg28	1998	Nova Aurora	Goiás	Suíno	
BRbv30	1999	Morrinhos	Goiás	Bovino	
BRhr31	1998	Iporema	Goiás	Equino	
BRbv32	1994	São Paulo	São Paulo	Bovino	
BRDr33	ND	Taubaté	São Paulo	<i>Desmodus rotundus</i>	
BRDr34	1998	Pindamonhangaba	São Paulo	<i>Desmodus rotundus</i>	
BRsp35	1992	Apiaí	São Paulo	Ovino	
BRbv39	1999	Colinas	Tocantim	Bovino	
BRDr41	ND	ND	ND	<i>Desmodus rotundus</i>	
BRDr46	ND	ND	ND	<i>Desmodus rotundus</i>	
BRDr47	ND	Pindamonhangaba	ND	<i>Desmodus rotundus</i>	
BRbv49	1989	Piraju	São Paulo	Bovino	
BRbv50	1999	Corumbá	Goiás	Bovino	
BRAL-1	1998	Itapira	São Paulo	<i>Artibeus lituratus</i>	
BRAL-2	1998	S.J.Rio Preto	São Paulo	<i>Artibeus lituratus</i>	
BRAL-3	1998	Novo Horizonte	São Paulo	<i>Artibeus lituratus</i>	
BRAp-1	1998	S.J.Rio Preto	São Paulo	<i>Artibeus planirostris</i>	
BRNL-1	1998	S.J.Rio Preto	São Paulo	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	
BRNL-3	2001	Nova Granada	São Paulo	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	
Mokola		Mokola virus			Y09762
ABL		Australian bat lyssavirus			AF418014

Quadro 6 Relação de amostras de vírus rábico submetidas a análise filogenética após serem seqüenciadas no National Institute of Infectious Disease, Toyama, Tóquio, Japão, com seus respectivos anos de isolamento, local e hospedeiro de origem. VPS – FMVZ – USP. São Paulo, março de 2004.

4 DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que a raiva na região do semi-árido nordestino da região de Patos é causada por um Lyssavírus, do genótipo I, ou seja, o vírus clássico da raiva que ocorre tanto em animais domésticos como silvestres, onde até há pouco tempo, os veterinários que atuam na região insistiam na inexistência dessa enfermidade em animais, ou então a doença era raramente comunicada.

A inoculação IC das suspensões preparadas a partir dos cérebros de diferentes espécies animais provocou a morte dos camundongos com períodos de incubação variados, dentro do esperado para a espécie. Todas as amostras foram positivas à prova de IFD, com formação de corpúsculos de inclusão de formas e tamanhos variados de acordo com o preconizado por Dean; Abelseth e Atanasiu (1996). Resultados discrepantes entre as provas de IFD e ICC foram observados nas amostras procedentes de caprinos de 2/6 (33,33%) e 1/6 (16,67%), eqüinos 3/11 (27,27%) e 2/11 (18,18%) e morcegos 9/200 (4,50%) e 8/200 (4,00%), respectivamente. Estes resultados muito provavelmente aconteceram em virtude da má conservação do material, devido à alta temperatura e adiantado estado de putrefação.

Existe um risco potencialmente elevado da transmissão da raiva para humanos na região estudada, uma vez que é hábito das pessoas adotarem filhotes de raposas e de outras espécies de animais silvestres (Figura 8, 9 e 10) para criação em cativeiro, embora haja legislação específica do IBAMA proibindo tal prática.

Outros fatores agravantes são os relatos de agressão aos humanos envolvendo as raposas do Nordeste. Um outro fator que deve contribuir é o grande número de morcegos insetívoros presentes nos meios urbano e rural da região.

As características da região estudada, tais como: presença de micro-nichos em áreas de represas, o tipo de cobertura vegetal, presença de cavernas e minas abandonadas e grande variedade de animais silvestres, podem favorecer a transmissão entre espécies, principalmente da raiva de morcegos para raposas, como sugerido por Douts, Wandeler e Cassey (1996) no Canadá.

Badrane e Tordo (2001), estudando 36 amostras de carnívoros e 17 de quirópteros representando os principais genótipos e variantes do gênero *Lyssavirus*, através da reconstrução filogenética, reforçam a hipótese da mudança ("spillover") de hospedeiro ao longo da história dos vírus desse gênero.

No estudo do comportamento biológico das amostras isoladas, todas se mostraram altamente patogênicas para camundongos por via IC, matando todos os animais dentro do período de observação de 21 dias.

Nilsson, Sugay e Pasqualin (1968) estudando o comportamento biológico do vírus da raiva em camundongos, pela via IC, encontrou períodos de incubação de 4 a 19 dias, e período clínico da doença, entre 1 e 9 dias. Os autores ainda afirmaram que, variações nas amostras de vírus e a quantidade de vírus inoculada, poderiam afetar o período de incubação.

Atanasiu (1975), apontou um período de incubação em camundongos de 9 a 12 dias, por via IC, com vírus de “rua”, podendo haver variações de 7 a 20 dias, e um período de doença clínica variando de 1 a 3 dias.

Oliveira (1992) observou período de incubação que oscilou de 4 a 23 dias e duração clínica entre 1 e 8 dias. Em função do período de incubação ser superior a 21 dias, para algumas amostras, existem laboratórios de diagnóstico da raiva que adotam o período de observação de 30 dias, na prova de ICC. Neste aspecto em particular, Peixoto et al. (2000) recomendam que o período de observação dos camundongos inoculados com amostras de origem eqüina não seja inferior a 30 dias.

A inoculação IC das suspensões preparadas a partir dos cérebros de diferentes espécies animais provocou a morte dos camundongos com períodos de incubação e de manifestações clínicas variados, mas, dentro do esperado para a espécie. Os limites observados foram, entre 7 e 16 dias e entre 1 e 8 dias respectivamente. Estes intervalos, não devem ser considerados diferentes do observado por Nilsson, Sugay e Pasqualin (1968), Atanasiu (1975) e Oliveira (1992). Pequenas variações podem estar associadas tanto à dose do vírus (NILSSON; SUGAY; PASQUALIN, 1968) como à adaptação das amostras ao sistema biológico utilizado (GERMANO et al., 1988)

A amostra de vírus rábico de raposa se mostrou patogênica para os caprinos e ovinos, matando os quatro (100%) animais inoculados. Os animais inoculados adoeceram e morreram, representando 100% de suscetibilidade, porém, Baltazar,

Blancou e Artois (1988) observaram um ovino doente (10%) entre dez inoculados na musculatura do masséter.

O período de incubação de 17 e 18 dias é coerente com as observações de outros autores (BALTAZAR; BLANCOU; ARTOIS, 1988; PÉPIN et al., 1984). Enquanto que nesse trabalho observou-se uma curta duração dos sintomas até a morte para os ovinos (24 e 48 horas), Baltazar, Blancou e Artois (1988) referem que um ovino desafiado no masséter com um vírus originado de morcego insetívoro *Epitesicus serotinus* morreu após oito dias de sintomas. Pépin et al. (1984) relataram que em bovinos inoculados na musculatura do masséter com amostra originada de raposa, o período de incubação variou entre 14 e 26 dias, sem relação significativa com o título do vírus.

Os sintomas da raiva, como perda de apetite, dificuldade de apreensão e mastigação, ranger dos dentes, salivação, prurido intenso no local de inoculação, incoordenação motora, decúbito lateral, contrações musculares e movimentos de pedalar foram descritos em trabalhos realizados experimentalmente em bovinos e ovinos (BALTAZAR; BLANCOU; ARTOIS, 1988; MARTELL et al., 1974; PÉPIN et al., 1984). Entretanto, embora um dos ovinos mordesse os cascos e a gaiola, a forma agressiva descrita em alguns casos em eqüinos, bovinos e ovinos (HUDSON et al., 1996a; HUDSON et al., 1996b), não foi observada nos ovinos (Figura 19).

A agressividade observada em um dos caprinos, também foi relatada por Hudson et al (1996a) em 43% de eqüinos experimentalmente inoculados e por Hudson et al (1996b) em 70% de bovinos e 80% de ovinos. Os relatos sobre a raiva

em caprinos são escassos e por este motivo, os veterinários da região do semi-árido nordestino reclamam da dificuldade em estabelecer o diagnóstico clínico nesta espécie.

A presença de vírus da raiva em outros órgãos não nervosos não constitui um risco de transmissão para seres humanos, exceto em casos de profissionais como magarefes ou pacientes receptores de órgãos para transplante (BALACHANDRAN; CHARLTON, 1994). Neste estudo, através da técnica de RT-PCR, a positividade foi constatada em fragmentos do SNC e em diferentes órgãos não nervosos, tais como no cérebro e coração dos dois ovinos, pulmão e glândula salivar do ovino 1 e fígado do ovino 2. Nos caprinos, resultados positivos foram encontrados nos fragmentos da glândula salivar, cérebro, fígado e coração dos dois animais, rim (caprino 1) e pulmão (caprino 2). Através dessa técnica não é necessária a viabilidade do vírus, uma vez que podem ser amplificadas frações das proteínas e de fato, somente foi possível recuperar o vírus pela inoculação intracerebral em camundongos nos macerados de cérebro dos quatro animais.

Shirakawa (2003) encontrou resultados de RT-PCR positivos para materiais colhidos do SNC e órgãos não nervosos como pulmão, rim, coração e glândula salivar de gatos inoculados experimentalmente por via intramuscular com um isolado de morcego *D. rotundus*. Por outro lado, gatos que consumiram cérebros de camundongos infectados pela mesma amostra do vírus da raiva não apresentaram sinais de infecção pelas provas de IFD e ICC, porém, apresentaram resultados positivos para RT-PCR, notadamente nos materiais do pulmão, rim e coração.

Souza (2003) utilizou a técnica de RT-PCR em materiais colhidos de morcegos hematófagos *D. rotundus* que se alimentaram de sangue desfibrinado contendo vírus rábico, encontrando resultados positivos para materiais do cérebro, pulmão, fígado, coração, glândula salivar, língua, rim e gordura marrom. Shirakawa (2003) e Souza (2003) alegaram que a prova de RT-PCR identificam os fragmentos do RNA viral para explicar os resultados negativos para as provas de IFD e ICC. Para Orciari et al. (2001), este resultado positivo para RT-PCR após administração do vírus pela via oral pode estar relacionado com o mecanismo de "clearance" do vírus.

Em relação aos ovinos experimentalmente inoculados com o vírus da raiva, Baltazar, Blancou e Artois (1988) recuperaram vírus apenas de fragmentos de cérebro e o isolamento a partir de macerado de glândula salivar foi impossível.

Pelos resultados do presente estudo verificou-se a suscetibilidade de ovinos e caprinos ao vírus originário de raposa e uma vez que na região de Patos-PB, ovelhas e cabras estão expostas ao risco de infecção, sugere-se a realização de outros estudos envolvendo um número maior de animais inoculados experimentalmente, para melhor conhecer o desenvolvimento da doença nesses animais.

Neste estudo, foi verificado que os eqüinos não vacinados se mostraram mais resistentes que os asininos, apresentando um período de incubação mais prolongado, apesar dos eqüinos serem considerados mamíferos suscetíveis ao vírus da raiva (GREEN, 1997). A maior patogenicidade desta amostra de raposa nos

eqüinos pode ter sido em consequência de fatores intrínsecos relacionados à espécie.

Os estudos realizados sobre a eficácia de vacinas comerciais na prevenção da doença em herbívoros limitam-se em sua maioria à titulação de anticorpos neutralizantes (BLANCOU, 1985) e poucos trabalhos envolvem o desafio. Modernamente, no ser humano, títulos > 0.5 UI/mL são interpretados como evidência de uma resposta à vacinação, conforme preconizado pelos especialistas da OMS e são aceitos como indicativo de imunidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). Nos animais, ainda não há uma definição de um título indicativo da imunidade, expressos em UI/mL. A diferença nos títulos encontrados dos animais não vacinados, antes de receberem a vacina, de < 5 e < 10 , e < 80 nos animais do grupo controle são resultados de titulação realizada em ocasiões diferentes e em função da diluição inicial utilizada.

Em uma revisão de dados de 21 cavalos mortos por raiva, realizada nos Estados Unidos, foi verificado que cinco animais haviam sido vacinados entre quatro e 12 meses antes do início dos sintomas (GREEN et al., 1992) e há relato de casos de raiva em potros primo-vacinados, sugerindo a necessidade de se estudar o esquema de vacinação mais adequado para esses animais (GREEN, 1997). No entanto, a proteção conferida pela vacina nesse estudo pode ser em parte atribuída ao reforço após trinta dias da primeira dose. Esta proteção pode estar associada também à baixa patogenicidade da amostra utilizada para o desafio nessas espécies.

A amostra isolada de raposa, quando utilizada para desafiar os eqüídeos vacinados com uma vacina anti-rábica comercial de vírus inativado apresentou uma proteção de 100%, indicando que os animais porventura agredidos por uma raposa portando este perfil de vírus, poderá ser eficazmente protegido quando previamente imunizados com o uso de vacinas convencionais. No entanto, diante dos resultados observados, sugere-se a realização de novos testes, com mais amostras procedentes da região estudada.

Wiktor e Koprowski (1980) também utilizando MABs, identificaram variantes antigênicas de vírus da raiva e questionaram a validade das vacinas produzidas com amostras fixas tradicionalmente empregadas para a produção de vacinas.

Hayashi et al. (1984) verificaram diferenças antigênicas em amostras de vírus rábico de diversas espécies, procedentes de diferentes áreas endêmicas do Brasil. Em um teste de proteção cruzada, diferenciaram três grupos: 1 vírus clássico da raiva; 2 variante envolvida no sistema homem-cão; 3 variante de bovino do sul do país. O que levou os autores a sugerirem a necessidade de estudos complementares para melhor caracterização das variantes.

Germano et al. (1988), utilizando MABs do Instituto Pasteur de Paris, encontraram variações antigênicas entre três amostras de vírus rábico isoladas, sendo duas de cães (Brasil e Nigéria) e uma de morcego (Brasil). Germano et al. (1990) em um trabalho com 13 amostras de vírus rábico, isoladas de diferentes espécies e oriundas de diversas regiões do Brasil, utilizando MABs do CDC de Atlanta, identificaram cinco variantes do vírus da raiva e os possíveis fracassos de vacinação foram associadas às variações antigênicas.

Oliveira (1992), em um estudo de caracterização imunológica de amostras de vírus rábico procedentes de áreas endêmicas do Brasil, não encontrou diferenças antigênicas e imunológicas, trabalhando com 35 amostras de animais domésticos, procedentes de três Estados diferentes: São Paulo, Minas Gerais e Goiás.

A variação antigênica entre amostras de vírus rábico de diferentes espécies animais e regiões geográficas tem sido demonstrada por diversos pesquisadores, mediante o uso de MABs (DIAZ, et al.; GERMANO, et al. 1990; 1994WIKTOR; KOPROWSKI, 1980). No presente experimento foi possível demonstrar a existência de variantes distintas, sob o ponto de vista antigênico, variações estas que se confirmaram pela análise genética das amostras. Estes resultados diferem dos encontrados por Sureau, Rollin e Wiktor (1983) que analisando amostras de diferentes espécies animais de uma mesma área geográfica, classificou-as como idênticas do ponto de vista antigênico.

Os resultados da seleção de MABs para caracterização antigênica das amostras do vírus da raiva isoladas no semi-árido nordestino de Patos permitiram a distinção de cinco variantes antigênicas distintas: canino, raposa 1, raposa 2, morcego insetívoro e morcego hematófago.

Geneticamente, tanto com base no gene M1 como no gene N, foram encontradas variações que permitem agrupar as amostra associando-as a espécies diferentes.

Ito et al.(2003) em um trabalho de caracterização genética com 45 amostras de vírus rábico isoladas de diferentes espécies animais em diferentes Estados do

Brasil, agruparam-nas em dois grupos geneticamente distintos: cão e morcego hematófago.

Os resultados da caracterização antigênica das amostras do vírus da raiva isoladas no semi-árido nordestino de Patos, que indicam até o momento, a ocorrência de cinco variantes distintas, divergem de certa forma dos resultados obtidos por Schaefer et al (2003), que em um trabalho de caracterização antigênica e genética de setenta e cinco amostra de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies (10 de cães, 1 de humano, 47 de bovinos, 3 de raposa, 9 de morcegos, 2 de gatos, 2 de cavalos e 2 não identificadas), de diferentes regiões do Brasil, utilizando a combinação MABs anti-nucleopapside e caracterização por RT-PCR do gene da proteína N, diferenciou as amostras em dois grupos distintos: um de cães e raposas, o outro, de bovinos e morcegos.

A análise da seqüência do gene M1 (Figura 23), considerando um “bootstrap” > 90%, devido à sua alta variabilidade, permitiu evidenciar 5 grupos distintos em uma mesma região. Embora pareçam estar relacionados os grupos: raposa 1 com raposa 2 e morcegos insetívoros com morcegos hematófagos, sugerindo uma origem comum, as ferramentas utilizadas para o estudo da epidemiologia molecular pode viabilizar a determinação da origem da ocorrência do vírus da raiva, em novas espécies hospedeiras.

O seqüenciamento do gene N (Figura 24) mostra que pelo menos 5 grupos distintos circulam nas espécies da região estudada: um em cão, dois em raposas, um em morcegos insetívoros e um em morcegos hematófagos.

A presença de grupos filogenéticos distintos sugere alterações ao longo de ano. Os achados sugerem que na natureza, os vírus estão sujeitos a uma constante e forte seleção, indicando uma certa estabilidade para com a espécie hospedeira (Figuras 25 e 26), tropismo celular e condições ecológicas.

Pelos dendrogramas, pode-se perceber que as amostras analisadas formam um grupo que possui um ancestral hipotético comum, pertencente ao Gênero *Lyssavirus* – genótipo 1. Este grupo diferencia-se em dois ramos: um associado aos carnívoros e outro, a quirópteros de diversas espécies. Essa observação sugere que pelo menos dois grupos de vírus co-existem na mesma região, com diferentes ecologias, sendo um terrestre e outro aéreo, em carnívoros e quirópteros respectivamente. Os dois grupos, no entanto, apresentam uma variabilidade genética.

O grupo dos carnívoros divide-se em três ramos distintos (Figuras 23 e 24), um formado por carnívoros domésticos, denominado “Cão” e os outros dois por raposas, denominados de “Raposa 1” e “Raposa 2”. No entanto, o grupo denominado de “Raposa 2”, está mais próximo do grupo “Cão”, por homologia de nucleotídeos do gene N.

O grupo dos quirópteros se divide em dois grupos bem distintos (Figuras 23, 24 e 25) denominados de “Morcegos insetívoros” e “Morcegos hematófagos”.

No semi-árido nordestino de Patos, a prática de vacinação de caprinos, ovinos ou mesmo de asininos é incomum, pois, os criadores acreditam que estes animais são resistentes à raiva. A maioria das pessoas que reside no sertão e que

lida com os animais desconhece que a doença existe na região, fato este causado, principalmente, pela ausência de um serviço diagnóstico voltado à raiva. Devido ao desconhecimento, o hábito de criar animais silvestres em cativeiro pode aumentar o risco de transmissão da raiva.

Na vigilância epidemiológica passiva é fundamental que a comunidade envolvida esteja ciente do problema, para que a informação seja enviada adequadamente às autoridades sanitárias.

Na região de Patos, enquanto o serviço diagnóstico não era acessível à comunidade, era comum a afirmação de que a raiva não estava ocorrendo. Após o estabelecimento do primeiro diagnóstico positivo de raiva, sucederam-se outros casos. O Setor de Patologia, do Hospital Veterinário passou a dar mais atenção aos casos suspeitos de raiva, enviando materiais para o diagnóstico laboratorial.

A veiculação da informação sobre a ocorrência da raiva na região despertou o interesse da comunidade sobre doença, passando a colaborar na colheita e envio de amostras para o estudo. Este fato demonstra que há a necessidade de incrementar a educação em saúde e a transmissão do conhecimento a cerca da doença para os habitantes da região. A prática de vacinação dos animais domésticos poderá contribuir para diminuir a incidência da doença, evitando desta forma os prejuízos econômicos. Urge também a necessidade de alertar a população da região, por meio de trabalhos educativos, sobre a possibilidade de transmissão da raiva envolvendo os animais silvestres e desestimulando a manutenção dos mesmos em cativeiro.

		5 CONCLUSÕES
--	--	---------------------

5 CONCLUSÕES

- 1) A raiva é endêmica na região de Patos, com a ocorrência registrada em diferentes animais domésticos e silvestres.
- 2) Todas as amostras isoladas da região estudada pertencem ao gênero *Lyssavirus*, genótipo I, amostra clássica ou vírus da raiva;
- 3) A raposa do Nordeste é um “reservatório” silvestre do vírus da raiva na região estudada.
- 4) A amostra de vírus rábico isolada de raposa é patogênica para caprinos, ovinos, eqüinos, asininos e camundongos, apresentando comportamento biológico compatível com a amostra clássica do vírus da raiva.
- 5) O vírus rábico isolado de raposa apresentou identidade imunológica com amostra vacinal de vírus fixo PV, uma vez que a vacina testada protegeu eqüinos e asininos.
- 6) Com o uso de anticorpos monoclonais é possível distinguir cinco variantes antigênicas entre as amostras isoladas de diversas espécies da região estudada.
- 7) Filogeneticamente, com a análise dos genes M1 e N, foi confirmada a existência de cinco variantes do vírus da raiva na região: canina, raposa 1, raposa 2, morcegos insetívoros e morcegos hematófagos, distintas de amostras do Brasil e do mundo, disponíveis no GenBank.

REFERÊNCIAS*

ABREU, V. L. V.; LEMOS, H. N.; SOUZA, M. M. Estudo experimental da resposta imune na vacinação anti-rábica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 3, p. 183 – 189, 1992.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 2 ed. Washinton, Organización Panamericana de la Salud, 1986. p. 502 – 526.

ALBUQUERQUE, R. D.; BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatórios selvagens e vetores de *Trypanosoma cruzi*. XLIV. Infecção natural em raposa do campo *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* (Lung, 1842) por *T. cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo. v. 12, n. 6, p. 375-382, 1970.

ARAI, Y. T.; KAMEOKA, Y.; HORIMOTO, T.; YAMAMOTO, K.; YABE, S.; NAKAYAMA, M.; TASHIRO, M. Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. **Archives of Virology**, v.142, p.1787-1796, 1997.

ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A. D. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 333-337, 2003.

ARAÚJO, F. A. A. **Raiva humana no Brasil: 1992-2001**. 2002. 90 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas gerais, 2002.

ATANASIU, P. Titrage des anticorps rabiques pratiqué sur les sérums humains. **Bulletin Office International des Epizooties**, v. 67, p. 383-387, 1967.

ATANASIU, P.; FUENZALIDA, E.; ACHA, P. SZYFRES, B. Inmunidad antirrabica en bovinos vacunados. **Revista Veterinaria Venezolana**, v. 24, n. 142, p. 316 – 334, 1968.

ATANASIU, P. Animal inoculation and the Negri body. In: In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York, Academic Press, 1975. v.1. p. 374-400.

*De acordo com a NBR 6023.

BACON, P. J. **Population dynamics of rabies in wildlife**. Orlando, Academic Press, 1985. 358 p.

BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in *Lyssavirus* history from the chiroptera to the carnivore orders. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p.8096 – 8104. 2001.

BAER, G.M. Pathogenesis to the central nervous system. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York, Academic Press, 1975. v.1. p. 181 – 98.

BAER, G. M.; SMITH, J. S. Rabies in nonhematophagous bats. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York, Academic Press, 1975. v.2. p. 79 – 97.

BAER, G. M.; YAGER, P. A. A mouse model for post-exposure rabies prophylaxis: the comparative efficacy of two vaccines and of antiserum administration. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 51 – 58, 1977.

BALACHANDRAN, A.; CHARLTON, K. Experimental rabies infection of non-nervous tissues in skunks (*Mephitis mephitis*) and foxes (*Vulpes vulpes*). **Veterinary Pathology**, v.31, p.93-102, 1994.

BALTAZAR, R. S.; BLANCOU, J.; ARTOIS, M. Étude du virus de la rage isolé d'une chauve-souris européenne "*Epitesicus serotinus*": pouvoir pathogène pour les ovins et le renard roux. **Revue Médecine Veterinaire**, v.139, n.7, p.615-621, 1988.

BARROS, J. S.; FREITAS, C. E. A. A. de; SOUSA, F. S. de. Raiva em animais silvestres no Estado do Ceará particularmente na raposa (*Dusicyon vetulus*). **Zoonoses revista internacional**, v. I, n.1, p. 9-13, 1989.

BLANCOU, J. Las vacunas y la vacunación antirrábica de los animales domésticos y salvajes en Europa. **Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties**, v.4, n.2, p.261-272, 1985.

BLANCOU, J.; ANDRAL, L.; LAGRANGE, P. H.; TSIANG, H. Kinetics of different specific immunological parameters after rabies vaccination in mice. **Infection and Immunity**, v. 24, n. 3, p. 600 – 605, 1979.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N.; BADRANE, H.; SACRAMENTO, D. Molecular epidemiological tools and phylogenetic analysis of bacteria and viruses with special emphasis on lyssaviruses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 25, p. 161-81, 1995.

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

BOURHY, H.; SUREAU, P.; TORDO, N. From rabies to rabies-related viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 115 - 128, 1990.

BRASS, D. A. **Rabies in bats. Natural history and public health implications.** Redgefield. Connecticut, Livia Press, 1994. 335 p.

CAREY, .A. B. Multispecies rabies in the easter United States. In: BACON, P.J. 1985. **Population dynamics of rabies in wildlife.** Orlando, Academic Press, 1985. p. 23-41.

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

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. **Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia.** Buenos Aires. Nota técnica, n. 8, ver.2, 1975.

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

DALPONTE, J. C. The hoary fox in Brazil. **Canid News**, v. 3, p. 23-24, 1995.

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

DIAZ, A-M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin América and Caribbean. **Journal of Veterinary Medicine**, B. 41, p. 153-160, 1994.

DOUST, P. Y.; WANDELER, A. I.; CASSEY, G. A. Cluster of rabies cases of probable bat origin among red fox in Prince Edward Island, **Canada. Journal of Wildlife Deseases**, v. 32, n. 2, p 403-406, 1996.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; CARRIERI, M. L.; DE MATTOS, C. A.; CUNHA, E. M. S.; AGUIAR, E. A. C.; SILVA, L. H. Q.; SODRÉ, M. M. ; SOUZA, M. C. A. M.; KOTAIT, I. **Caracterização de variantes no Brasil e países vizinhos.** In:

Seminário Internacional da Raiva, v.1, 2000, São Paulo. Programas e Resumos. São Paulo, De Paula Print Artes Gráficas Ltda., 2000.p. 59-61.

FENNER, R.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Virologia veterinária**, Zaragoza, Acribia, 1992. p.551-556.

FLAMAND, A.; RAUX, H.; GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W. H. Mechanisms of rabies virus neutralization. **Virology**, v. 194, p. 302 – 313, 1993.

FLAMAND A.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. II. The nucleocapsid protein. **Journal of General Virology**, v. 48, n. 1, p. 105-109, 1980.

GERBER, J. D.; SHARPEE, T. C.; SWIECZKOWSKI, T. C.; BECKENHAUER, W. H. Cell-mediated immune response to rabies virus in dog following vaccination and challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 9, p. 13 – 22, 1985.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M. M.; SILVA, E. V. Avaliação de três cepas de vírus rábico antigenicamente distintas, em camundongos. I. Estudo dos períodos de observação clínica. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, p. 375-383, 1988.

GERMANO, P. M. L.; SILVA, E. V.; SILVA, E. V.; MIGUEL, O., SUREAU, P. Variantes antigênicas del virus de la rabia aisladas en el Nordeste y Sudeste del Brasil. Estudio preliminar. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.108, nº 1, 1990.

GOULD, A. R.; HYATT, A. D.; LUNT, R.; KATTENBELT, J. A.; HENGSTBERGE, S.; BLACKSELL, S. D. Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. **Virus Research**, V. 54, p. 165 – 187, 1998.

GOLDWASSER, R. A.; KISSLING, R. E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. **Proceedings of the Society Experimental Biology Medicine**, v. 98, p. 219-223, 1958.

GREEN, S. L. Rabies. **Veterinary Clinician North American Equine Practice**, v. 13, n. 1, p. 1 – 11, 1997.

GREEN, S. L.; SMITH, L. L.; VERNAU, W.; BEACOCK, S. M. Rabies in horses: 21 cases (1970-1990). **Journal of American Veterinary Medicine Association.**, v. 200, n. 8, p. 1133 – 1137. 1992

HAUPT, H.; REHAAG, H. Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina, transmitida por morcegos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 2, p. 17-47, 1925.

HAYASHI, Y.; MORA, E.; CNANDELIER, E. L.; MONTAÑO, J. A.; OHI, M. Estudo de proteção cruzada de 24 cepas de vírus rábico isoladas de diferentes espécies animais no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 27, p. 27-35, 1984.

HILLIS, D. M.; BULL, J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, v. 42, p. 182-192, 1993.

HUDSON, L. C.; WEINSTOCK, D.; JORDAN, T.; BOLD-FLETCHER, N. O. Clinical features of experimentally induced rabies in cattle and sheep. **Zentralbl für Veterinärmedizin [B]**, v.43, n.2, p.85-95, 1996b.

HUDSON, L. C.; WEINSTOCK, D.; JORDAN, T.; BOLD-FLETCHER, N. O. Clinical presentation of experimentally induced rabies in horses. **Zentralblat für Veterinärmedizin [B]**, v.43, n.5, p.277-85, 1996a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. 1996. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/bda/tabela>>. Acesso em: 06 de maio 2004.

ITO, M.; ITOU, T.; SAKAI, T.; SANTOS, M. F. C.; ARAI, Y. T.; TAKASAKI, T.; KURANE, I.; ITO, F. H. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 63, n. 12, p. 1309-1313, 2001.

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

JÁCOMO, A. T. A; SILVEIRA, L.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Niche separation between the maned-wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and

the hoary-fox (*Dusicyon vetulus*) in the central Brazil. **Journal of Zoology**, v. 262, p. 99-106, 2004.

KAPLAN, C. Rabies: a worldwide disease. In: BACON, P. J. **Population dynamics of rabies in wildlife**. London: Academic Press, 1985. p. 1-21.

KAPLAN, C.; TURNER, G. S.; WARRELL, D. A. **Rabies**: The facts. 2. ed. Oxford, Oxford University Press, 1986. 126 p.

KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. Rabies. **Scientific America**, v. 242, n. 1, p. 104-113, 1980.

KAWANO, H.; MIFUNE, K.; OHUCHI, M.; MANNEN, K.; CHO, S.; HIRAMATSU, K.; SHICHIJO, A. Protection against rabies in mice by a cytotoxic T cell clone recognizing the glycoprotein of rabies virus. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 281 – 287, 1990.

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

KOPROWSKI, H.; MOCARELLI, P.; WIKTOR, T. J. Antibody response "in vitro" to an animal virus: production of rabies neutralizing antibodies by mouse cells in culture. **Proceedings of National Academy Science**.v. 69, p. 2433-2436, 1972.

KENTUCKY COOPERATIVE EXTENSION SERVICE. Rabies in horses. **University of Kentucky, College of Agriculture**. Disponível em <<http://www.uky.edu/Agriculture/AnimalSciences/extension/pubpdfs/asc125.pdf>> Acesso em: 12 mai. 2004.

MACDONALD, D. W.; VOIGT, D. R. The biological basis of rabies model. In: BACON, P. J. 1985. **Population dynamics of rabies in wildlife**. Orlando, Academic Press, 1985. p. 71-108.

MACFARLAN, R. I. Immune responses to rabies virus: vaccines and natural infection. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K.M. ed. **Rabies**. Boston, Kluwer Academic, 1988. p. 163 - 176.

MARTELL, M. A.; DI BATALLA, C.; BAER, G. M.; BENIGNOS Y ACUNA, J. Experimental bovine paralytic rabies - derriengue. **Veterinar Records**, v.95, p.527-530, 1974.

MENDONÇA, R. Z.; PEREIRA, C. A. Relationship of interferon synthesis and the resistance of mice infected with street rabies virus. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 27, p. 691 – 695, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Nota técnica de 16/04/2004. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs/destaques/raiva/htm>>. Acesso em: 19 abril 2004.

MONTAÑO-HIROSE, J. A.; LAFAGE, M.; WEBER, P.; BADRANE, H.; TORDO, N.; LAFON, M. Protective activity of a murine monoclonal antibody against European bat lyssavirus 1 (EBL1) infection in mice. **Vaccine**, v. 11, n. 12, p. 1259 – 1266, 1993.

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

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

NADIN-DAVIS, S. A.; ABDEL-MALIK, M.; ARMOSTRONG, J.; WANDELER, A. I. Lyssavirus P gene characterization provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. **Virology**, v. 298, p. 286 – 305, 2002.

NILSSON, M. R.; SUGAY, W.; PASQUALIN, O. L. Diagnóstico da raiva, observações sobre o tempo de incubação e a duração da doença em camundongos, no período de 1960 a 1966. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 25, p. 1-7, 1968.

OLIVEIRA, A. G. F.; CLEMENTINO, I. J.; FREITAS, T. D.; ALVES, C. J.; GOMES, A. A. B. **Comportamento biológico de amostras de vírus rábico isoladas de raposa (*Dusicyon vetulus*), da região do semi-árido do Brasil**. In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2001. Salvador-Bahia.

OLIVEIRA, P. R. **Caracterização de amostras do vírus da raiva isoladas a partir de material cerebral de animais domésticos procedentes de áreas endêmicas da doença no Brasil, visando estabelecer sua identidade imunológica com a estirpe clássica desse vírus**. 1992. 68 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)

– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1992.

ORCIARI, L. A.; NIESGODA, M.; HANLON, C.A.; SHADDOCK, J. H.; SANDERLIN, D. W.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E.; Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v. 19, p. 4511-4518, 2001.

ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD (Rio de Janeiro) **Boletín: Vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas**. v. XXXIII, 2001. 40 p.

PASTORET, P. P.; BROCHIER, B.; THOMAS, I.; LEVEAU, T.; BAUDUIN, B.; COSTY, F.; Fox rabies in Europe. **Irish Veterinary Journal**, v. 42, p. 93 -95, 1989.

PEIXOTO, Z. M. P.; CUNHA, E. M. S.; SOUZA, M. C. A. M.; DA SILVA, L. H. Q.; CARRIERI, M. L.; LAZARINI, S. R. F.; AMATUZZI, E. A.; GERMANO, P. M. L.; KOTAIT, I. **Diagnóstico laboratorial da raiva dos herbívoros: aspectos peculiares**. In: Seminário Internacional da Raiva, v.1, 2000, São Paulo. **Programas e Resumos**. São Paulo, De Paula Print Artes Gráficas Ltda., 2000.p. 50-51.

PÉPIN, M.; BLANCOU, J.; AUBERT, M. F. A. Rage expérimentale des bovins: sensibilité, symptômes, réactions immunitaires humores, lésions et excrétion du virus. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v.15, n.3, p.325-333, 1984.

PILLE, E. R.; VAGABOV, M. A.; KARAKUYUMCHAN, M. K.; OSYAN, K. S. H. M. Characteristics of cellular and humoral immune responses after immunization with different rabies vaccines. **Acta Virology**, v. 29, p. 137-142, 1985.

REDE INTERAGENCIAL DE INFORMAÇÃO PARA A SAÚDE (Brasília). **Indicadores básicos de saúde no Brasil: conceitos e aplicações**. Organização Pan-Americana de Saúde, DF – Brasil, p.150 – 151, 2002.

REED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints **American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

SCHAEFER, R.; BATISTA, H. B. R.; RIJSEWIJK, F. A. M.; FRANCO, A. C.; KING, A. A.; ROEHE, P. M. **Antigenic and genomic characterization of brazilian rabies virus isolates**. In: Seminário Internacional de raiva – Centenário do Instituto Pasteur (Programa e resumos). São Paulo 5 -7 agosto de 2003

SHANKAR, V.; DIETZCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2736 – 2738, 1991.

SHIRAKAWA, R. K. **Ensaio sobre inoculação intramuscular e alimentação de gatos domésticos (*Felis catus*) com cérebros de camundongos previamente inoculados com vírus da raiva**. 2003. 56 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

SILVA, R. A.; BRECKENFELD, S. G. B. Ocorrência da raiva em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815). Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Centro-Sul. EPE, Ministério da Agricultura. Boletim Técnico nº 70, Separata da **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.03, 1968.

SILVA, R. A.; SOUZA, A. M. A ocorrência de vírus rábico em morcegos hematófagos da espécie *Diaemus uoungii* (Jentink) no Brasil. **Veterinaria** (Órgão oficial do D.A. da Escola Nacional de Veterinária) Ano XXI-Número Único - 1968. Rio de Janeiro.

SMITH, J. S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 3, p. 166-76, 1996.

SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. v. 1 e 2. São Paulo. Manole, 1994. p. 921 – 924.

SMITH, J. S. Rabies virus epitopic variation: use in ecologic studies. **Advances in virus research**, v. 36, p. 215 – 253, 1989.

SMITH, J. S.; BAER, G. M. Epizootiology of rabies: the Americas. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. ed. **Rabies**. Boston, Kluwer Academic, 1988. p. 267 - 299.

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**, v.97, n.1, p.109-111, 2002.

SOUZA, M. C. A. M. **Infecção experimental de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy) mantidos em cativeiro pela ingestão de sangue desfibrinado acrescentado de amostras de vírus da raiva**. 2003. 90 f.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

SOUSA, M. H. **Livro de Registro Permanente de Controle da Vacina Anti-rábica Humana**. Unidade Básica de Saúde Aderban Martins, Patos-PB, p. 01 – 18, 2003

SUREAU, P.; ROLLIN, P.; WIKTOR, T. Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: detection by monoclonal antibodies. **American Journal of Epidemiology**, v.117, n° 5, p. 605 – 609, 1983

THOMPSON, J. D.; GIBSON, K. J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. Clustal X widows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acid Research**, v. 2, p. 4876-4882, 1997.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinaria**. Zaragoza, Acribia, 1990. p. 191 – 205.

TOMA, B.; ANDRAL, L. Epidemiology of fox rabies. *In*: LAUFFER, M. A.; BANG, F. B.; MARAMOROSCH, K.; SMITH, K. N. **Advances in virus research**. London: Academic Press, 1977. p. 1 - 36.

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

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; GÉRARD, K. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV, **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 6, p. 2671-2683, 1986.

TORDO, N.; POCH, O. Structure of rabies virus. *In*: CAMPBELL J.B.; CHARLTON, K.M. **Rabies**. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 25 – 45.

TORDO N.; SACRAMENTO, D.; BADRANE, H.; BAHLOU, C.; AGUILAR-SETIEN, A.; LOZA-RUBIO, E.; GAVILAN-SALINAS, A.; BROCHIER, B.; PASTORET, P. P.; DESMEZIERES, E.; JACOB, Y.; PERRIN, P. **Genetic diversity of lyssaviruses: implications in vaccinology**. *In*: Seminário Internacional da Raiva, v.1, 2000, São Paulo. Programas e Resumos. São Paulo, De Paula Print Artes Gráficas Ltda., 2000.p. 26-27.

TORRES, S.; QUEIROZ LIMA, E. A raiva e sua transmissão por morcegos hematófagos infectados naturalmente. **Revista do Departamento Nacional de Produção Animal**. Publicação oficial do ministério da Agricultura, Ano II, 1935, Nos. 1, 2 e 3.

TSIANG, H. Interaction of rabies virus and host cell. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. **Rabies**. Norwell, Kluwer Academic, 1988. p. 67 – 100.

UIEDA, W.; HARMANI, N. M.; SILVA, M. M. Rabies in insectivorous (*Mollossidae*) bats of southeastern Brazil. **Revista da Saúde Pública**, v. 29, n. 5, p. 393-397, 1995.

WANDELER, A. I. Control of wildlife rabies: Europe. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. **Rabies**. Norwell, Kluwer Academic, 1988. p. 365 – 380.

WILKISON, L. Understanding the nature of rabies: an historical perspective. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. ed. **Rabies**. Boston, Kluwer Academic, 1988. p. 1-23.

WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Antigenic variants of rabies virus, **Journal of Experimental Medicine**, v. 152, n° 1, p. 99 – 112, 1980.

WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 8, p. 3938 – 3942, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert committee on rabies**. Geneva. Eighth Report. Technical Report Series. 824. 1992. 88 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO workshop on genetic and antigenic molecular epidemiology of Lyssaviruses**. Geneva World Health Organization Veterinary Public Health Unit, 1994. p.7.

ANEXO

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO / FILMAGEM			
NÚMERO DA LICENÇA 332/2001-CGEF	Nº DE REGISTRO NO IBAMA XXXXXXXXXX	PERÍODO DE VALIDADE 16/11/2001 a 15/11/2002	PROCESSO IBAMA 02016.001803/01-00
OBJETO: ☒ CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO ☒ TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO ☐ COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) ☐ TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA ☐ EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES ☐ MANUTENÇÃO TEMPORÁRIA DE ANIMAIS EM CATIVEIRO ☐ OUTROS:		FAVORECIDO: ☐ ZOOLOGICO ☒ INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA ☒ PESQUISADOR ☐ EXPOSITOR/CONCURSO ☐ CRIADOURO COMERCIAL ☐ CRIADOURO CIENTÍFICO ☐ OUTROS:	
FAVORECIDO (ESPECIFICAÇÃO): NOME: Albério Antônio de Barros Gomes, Fumio Honma Ito, Clebert José Alves, Fernanda Bernardi INSTITUIÇÃO: Universidade Federal da Paraíba ENDEREÇO: Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal da Paraíba – UFPB Patos PB. CEP: 58700-000 Cx. Postal 64 RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO: Albério Antonio de Barros Gomes			
TRANSPORTADOR: Os pesquisadores favorecidos MEIO DE TRANSPORTE: AÉREO/TERRESTRE PROCEDÊNCIA / LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA: Estradas e rodovias que cortam o semi árido nordestino nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco.			
DESTINO: Laboratório de Virologia do CSTR-UFPB e Laboratório de Raiva do VPS- USP			
LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE / TIPO Coleta de até 200 indivíduos por espécie, encontrados atropelados em rodovias para exames laboratoriais ao longo do período de validade da licença. Captura de até doze indivíduos por espécie para coleta e sacrifício ao longo dos próximos doze meses (uma por mês).	NOME CIENTÍFICO <i>Dusicyon vetulus</i> <i>Dusicyon vetulus</i>	NOME COMUM Raposa Raposa	
OBSERVAÇÕES/CONDICIONANTES: 1. Esta licença autoriza a coleta e transporte de 200 raposas (<i>Dusicyon vetulus</i>) encontradas mortas nas estradas e rodovias da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco. 2. Esta licença autoriza a captura e transporte de doze raposas ao longo dos próximos doze meses, totalizando uma por mês, e seu transporte e depósito no Laboratório de Virologia do CSTR- UFPB e Laboratório de Raiva do VPS – USP. 3. Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições <i>in situ</i> , inclusive domesticada, ou mantidos em coleções <i>ex situ</i> , desde que coletados em condições <i>in situ</i> , no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial. 4. O Responsável pela Expedição deverá apresentar relatório final ao término da validade desta Licença, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto da presente licença.			
LOCAL E DATA DE EMISSÃO Brasília (DF), 16/11/2001	AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO) Fernando Dal'ava Coordenador Geral de Fauna Coordenador Substituto Port. 1356 de 16/08/01		
• VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO. • ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA: 1. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO CONSTANTE DE PROJETO ESPECÍFICO APROVADO; 2. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO. 3. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL; 4. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE; 5. EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS OU MATERIAL ZOOLOGICO. • SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS. • VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.			