KARIN CORRÊA SCHEFFER

# Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, *Hemi-Nested* RT-PCR e *Real Time* RT-PCR

São Paulo

2011

KARIN CORRÊA SCHEFFER

# Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, *Hemi-Nested* RT-PCR e *Real Time* RT-PCR

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

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

São Paulo

2011

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

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO**

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2483
FMVZ

Scheffer, Karin Corrêa
Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, *Hemi-Nested* RT-PCR e *Real Time* RT-PCR / Karin Corrêa Scheffer. -- 2011.
145 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fumio Honma Ito.

1. Raiva. 2. Diagnóstico. 3. Morcegos. 4. RT-PCR. 5. *Hemi-Nested* RT-PCR. 6. *Real Time* RT-PCR. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
*Comissão Bioética*

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Quantificação de vírus da raiva presentes em órgãos de morcegos naturalmente infectados pela técnica de realtime RT-PCR", protocolado sob o nº1275/2007, utilizando 2500 (dois mil e quinhentos) camundongos, 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 na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research "Quantification of rabies virus by realtime RT-PCR technique in organs of naturally infected bats", protocol number 1275/2007, under the responsibility Prof. Dr. Fumio Honma Ito, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP
SP, ___/___/___

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

**FOLHA DE AVALIAÇÃO**

Nome: Karin Corrêa Scheffer

Título do trabalho: Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach**,** 1821)por meio de RT-PCR, *Hemi-Nested* RT-PCR e *Real Time* RT-PCR

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

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: _____

δεδιχατορια ----------DEDICATÓRIA

*Ao meu querido marido **Elpidio Ferreira**. Obrigada por seu companheirismo, paciência e amor e principalmente por sempre confiar que era possível. Eu amo você!!!*

*Aos meus pais **Carmen** e **Hermes** por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, me ensinando a caminhar e por serem o alicerce da minha vida. Amo vocês!!!*

αγραδεχιμεντοσ ----------AGRADECIMENTOS

## Agradecimentos

Primeiramente a **DEUS** que por tantas vezes durante este estudo abriu os caminhos para que as coisas dessem certo e por isso sempre acredito no texto que diz: “Tudo posso nAquele que me fortalece”. Obrigada meu Deus por mais essa etapa!!!

Ao Prof. Dr. **Fumio Honma Ito** por acreditar em mim desde o mestrado, por sua orientação e por me ensinar sempre. Levarei sempre comigo os seus preciosos ensinamentos!

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** por meio do curso de pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, pela oportunidade oferecida.

Aos Prof. **Silvio Arruda Vasconcellos** e **Solange Maria Gennari** por toda a dedicação com o departamento do VPS e por darem a chance de cursarmos uma belíssima pós-graduação.

Ao **Instituto Pasteur** em nome da diretora **Neide Y. Takaoka**, da supervisora do Laboratório **Ivanete Kotait** e da chefia do Laboratório **Maria Luiza Carrieri** por acreditarem nesse trabalho e dispor de todas as condições para a realização do mesmo.

Aos grandes amigos e quiçá colegas de trabalho **Keila Iamamoto Nogi** e **Willian de Oliveira Fahl** por todo tempo que disponibilizaram me ajudando, me ensinando e pensando junto comigo. Sem vocês não sei o que faria. Com vocês aprendi que “Em todo tempo ama o amigo e na angústia nasce o irmão”. Obrigada meus irmãos!!!

Às amigas e colegas de trabalho **Andréa de Cássia Rodrigues da Silva**, **Graciane Maria Medeiros Caporale** e **Luciana Botelho Chaves** por suas valorosas contribuições, mas principalmente por formarmos uma equipe que apóia uma a outra. Obrigada queridas amigas!!!

Aos queridos colegas do Laboratório de Biologia Molecular **Pedro Carnieli Junior**, **Felipe de Paula Nogueira Cruz**, **Rafael de Novaes Oliveira** pelos conselhos e pela disposição de sempre estarem prontos para ajudar. Obrigada por colocarem à disposição o laboratório, os protocolos utilizados e tudo o mais que foi necessário para a realização deste trabalho.

À amiga **Adriana Cândido Rodrigues** por me ajudar com “nossas amiguinhas” as células e por ter tido muita paciência durante esse período – Obrigada minha amiga!!!

À amiga **Maria Sousa Cavalcante** (**Fátima**) por estar sempre disposta a ajudar. Obrigada por cuidar dos “nossos bebês” com tanto carinho.

À **Cristina Costa de Sá** por me ajudar a adquirir todo o material necessário sempre em tempo hábil. Obrigada por sua dedicação.

À amiga e colega de trabalho **Samira M. Achkar** por sua grande ajuda com a parte de patogenia. Obrigada!!!

À amiga e colega de trabalho **Juliana Galera Castilho** por seus conselhos e sugestões desde o início até o último minuto deste trabalho. Obrigada!!!

Ao grande amigo e professor **Paulo Eduardo Brandão** por todas as suas idéias e por me "escutar" por todos esses anos.

Ao professor **Marcos Amaku** pelas orientções na parte estatística deste trabalho.

Ao meu querido irmão **Dennis Corrêa Scheffer** que com seu jeito brincalhão me ajudou a seguir adiante e manter o foco.

A minha querida prima **Vivian Bradaschia Corrêa** que mesmo virtualmente esteve sempre me apoiando e incentivando. Logo, logo é sua vez!!! Obrigada!!!

Aos **funcionários-amigos e aprimorandos do Instituto Pasteur** que estiveram torcendo por mim por todos esses anos. Obrigada pela convivência e os ensinamentos que aprendi com cada um de vocês.

Ao suporte técnico da Applied Biosystems em nome da **Veridiana Cano**, **Cinthia Moysés**, **Camila Ornelas** e **Ana Paula**. Obrigada por esclarecerem "todas" as dúvidas. E como tive dúvidas!

A todos aqueles que acreditaram e que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

*MUITO OBRIGADA A TODOS VOCÊS!!!*

επί γραφε ----------EPÍGRAFE

*“Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar seu último limite e dar o melhor de si mesmo”.*

*Ayrton Senna*

*(1960 – 1994)*

## RESUMO

SCHEFFER, K. C. **Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, *Hemi-Nested* RT-PCR e *Real Time* RT-PCR.** [Detection of rabies virus in organs of bats of the genus *Artibeus* (Leach, 1821) using RT-PCR, *Hemi- Nested* RT-PCR and *Real Time* RT-PCR]. 2011. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

Este estudo teve como objetivo detectar a presença do vírus da raiva em diferentes órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* empregando as técnicas moleculares como RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR. De aproximadamente 4000 espécimes de morcegos recebidas no Instituto Pasteur para o diagnóstico da raiva, foram selecionados 30 morcegos do gênero *Artibeus*, com resultados positivos para raiva pelas técnicas tradicionais de IFD e inoculação em células N2A utilizando suspensões feitas a partir do SNC. Para as técnicas moleculares, foram retirados glândulas salivares, bexigas urinárias, rins, pulmões e conteúdos fecais e ainda foram lavadas as calotas cranianas dos espécimes. Os órgãos e conteúdos fecais foram diluídos a 1:10 (P/V) e as bexigas urinárias a 1:20 (P/V). As suspensões foram inoculadas em células N2A para o isolamento viral. Foi realizada a extração do RNA total usando o *TRIzol*®, foram realizadas a transcrição reversa seguida da PCR e hnRT-PCR com utilização de *primers* específicos para o gene codificante da proteína N. A partir do produto da transcrição reversa foi realizada a técnica de *Real Time* RT-PCR, utilizando *primers* e sonda específicos para variante antigênica 3. Das 30 suspensões de lavado cerebral, 28 (93,33%) resultaram positivos, na inoculação em cultura de células, seguido de glândulas salivares (36,67%), bexigas (16,67%) e conteúdos fecais (3,33%). Os resultados encontrados da sensibilidade nas técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR foram 56,25%, 82,57% e 82,19% quando avaliadas as 180 amostras analisadas. A comparação das técnicas de hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR feita pelo teste exato de Fisher quanto a proporção de positivos detectados mostrou que para o lavado cerebral, órgãos e conteúdos fecais a proporção foi igual (P>0,05). Em relação à positividade os resultados encontrados nas técnicas de hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR foram 100% em lavado cerebral; 90% e 93,33% em glândulas salivares; 83,33% e 90% em bexigas; 80% e 93,33% em rins; 76,67% e 50% em pulmões e 43,33% em ambas as técnicas em conteúdos fecais. Esses resultados sugerem que tanto as

técnicas de hnRT-PCR como *Real Time* RT-PCR podem ser utilizadas como métodos complementares para o diagnóstico da raiva e são sensíveis o bastante para o uso em estudos de patogênese. A técnica de *Real Time* RT-PCR realizada neste estudo se mostrou eficiente em detectar o RABV em diferentes órgãos e tecidos extraneurais com a vantagem de ser uma técnica mais rápida e sensível.

Palavras-chave: Raiva. Diagnóstico. Morcegos. RT-PCR. *Hemi-Nested* RT-PCR. *Real Time* RT-PCR.

αβτραχτ

# ABSTRACT

## ABSTRACT

SCHEFFER, K. C. **Detection of rabies virus in organs of bats of the genus *Artibeus* (Leach, 1821) using RT-PCR, *Hemi- Nested* RT-PCR and *Real Time* RT-PCR.** [Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, *Hemi-Nested* RT-PCR e *Real Time* RT-PCR]. 2011. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

This study was aimed to detect the presence of rabies virus in different organs of the genus *Artibeus* bats using molecular techniques such as RT-PCR, hnRT-PCR, and the Real Time RT-PCR. From about 4,000 specimens of bats received for rabies diagnosis at the Pasteur Institute, 30 bats of the genus *Artibeus* were then selected. The selected bats presented positive results by the traditional DFA and N2A-cells inoculation test using brain tissue suspensions. Samples of salivary glands, urinary bladders, kidneys, lungs, and fecal contents and washings of the skulls were collected for the molecular techniques testing. The organs and the fecal contents were diluted at 1:10 (w/v) and the urinary bladder, at 1:20 (w/v) and these suspensions were inoculated into N2A cells for viral isolation. The extraction of the total RNA was performed by using TRIzol® and followed by the reverse transcription and the PCR and the hnRT-PCR were performed by using specific primers for the gene encoding the protein N. The product obtained by the reverse transcription technique was submitted to the Real Time RT-PCR technique, using primers and probe specific for antigenic variant 3 of the rabies virus. Of the 30 suspensions of the brain washings, 28 (93.33%) were positive in N2A cell culture inoculation, followed by the suspensions of the salivary glands (36.67%), bladders (16.67%) and fecal contents (3.33%). For the 180 samples evaluated, the results of sensitivity found for the RT-PCR, hnRT-PCR and Real Time RT-PCR techniques were 56.25%, 82.57%, and 82.19%, respectively. A comparison of hnRT-PCR and Real Time RT-PCR techniques performed by Fisher's exact test showed that the proportion of positives detected by the brain washings, organs and of the fecal content was non-significant ($P > 0.05$). Regarding the results found in hnRT-PCR and Real Time RT-PCR techniques, 100% positives were in brain washing, 90% and 93.33% in salivary glands, 83.33% and 90% in bladders, 80% and 93.33% in kidneys, 76.67% and 50% in lungs and 43.33% for both techniques on fecal contents. These results suggest that both hnRT-PCR and Real-Time PCR techniques can be used as complementary methods for the diagnosis of rabies and are sensitive enough for use in pathogenesis

studies. The Real Time RT-PCR technique performed in this study proved to be faster and more sensitive and effective in detecting RABV in different organs and extra neural tissues of bats.

Key words: Rabies. Diagnosis. Bats. RT-PCR. Hemi-Nested RT-PCR. Real Time RT-PCR.

λιστα δε φιγυρασ——————————————LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da obtenção do lavado cerebral. **A**. Raspagem da calota craniana com auxílio de ponteira. **B**. Lavagem da calota craniana com diluente. **C**. Lavado Cerebral em tubo tipo *eppendorff*® RNAse *free*.....**71**

Figura 2 – Etapas realizadas para colheita dos órgãos e conteúdo fecal. Material preparado previamente e submetido à radiação UV. O procedimento foi realizado em CSB - classe IIA, com coletores preparados em papel alumínio, colocados em gelo e posterior coleta dos órgãos e conteúdo fecal .....**72**

Figura 3 – Isolamento viral em cultura de células N2A de amostras de lavado cerebral de morcegos do gênero *Artibeus*. A. Tapete de células N2A com intensa infecção viral. **B**. Tapete de células N2A com moderada infecção viral. **C**. Tapete de células N2A com pouca infecção viral. **D**. Tapete de células N2A sem infecção viral – negativo.....**95**

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo das reações de RT-PCR e hnRT-PCR da amostra 2242V/09. **A**. Reação de RT-PCR. L – Ladder – Marcador molecular com 100pb; 1 – Lavado Cerebral; 2 – Glândulas Salivares; 3 – Bexiga; 4 – Rins; 5 – Pulmões; 6 – Conteúdo Fecal; 7 – CVS (Controle Positivo) e 8 – Água Ultra-pura (Controle Negativo). **B**. Reação de hnRT-PCR. L – Ladder – Marcador molecular com 100pb; 1 – Lavado Cerebral; 2 – Glândulas Salivares; 3 – Bexiga; 4 – Rins; 5 – Pulmões; 6 – Conteúdo Fecal; 7 – CVS (Controle Positivo) e 8 – Água Ultra-pura (Controle Negativo).....**98**

Figura 5 – Gráficos de presença e ausência das reações de *Real Time* RT-PCR das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com RABV. **A**. Lavado Cerebral; **B**. Glândulas Salivares; **C**. Bexiga; **D**. Rins; **E**. Pulmões e **F**. Conteúdo Fecal.....**100**

Figura 6 – Gráficos (*amplification plot*) das reações de *Real Time* RT-PCR das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com RABV. **A**. Lavado Cerebral; **B**. Glândulas Salivares; **C**. Bexiga; **D**. Rins; **E**. Pulmões e **F**. Conteúdo Fecal.....**101**

Figura 7 – Gráfico (*amplification plot*) da reação de *Real Time* RT-PCR da amostra de lavado cerebral do espécime 5059V/09 mostrando a curva de amplificação da amostra e do IPC .....**102**

Figura 8 – Gráfico (*amplification plot*) da reação de *Real Time* RT-PCR da amostra de glândula do espécime 3852V/09 mostrando a curva de amplificação da amostra e do IPC .....**102**

Figura 9 – Gráficos multicomponente da reação de *Real Time* RT-PCR mostrando a fluorescência emitida das amostras de lavado cerebral, órgãos e

conteúdo fecal (fluorescência FAM); IPC (VIC) e controle negativo de fluorescência (ROX). **A**. Lavado Cerebral; **B**. Glândulas Salivares; **C**. Bexiga; **D**. Rins; **E**. Pulmões e **F**. Conteúdo Fecal .....**104**

Figura 10 – Gráficos (*amplification plot*) da reação de *Real Time* RT-PCR no teste de interferência das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal. **A.** Lavado Cerebral; **B.** Glândulas Salivares; **C.** Bexiga; **D.** Rins; **E.** Pulmões; **F.** Conteúdo Fecal e **G.** Controle Negativo (Água Ultrapura) .....**107**

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, referente às reações de RT-PCR e hnRT-PCR para a determinação do limiar de detecção da amostra de campo utilizada como padrão na reação de *Real Time* RT-PCR (4255V/10). **A**. Reação de RT-PCR. L – Ladder – Marcador molecular com 100pb; 1 – Diluição 10-1 - Positiva; 2 – Diluição 10-2 - Positiva (banda com baixa intensidade de brilho); 3 – Diluição 10-3 – Positiva (banda com baixa intensidade de brilho); 4 – Diluição 10-4 - Negativa; 5 – Diluição 10-5 - Negativa; 6 – Diluição 10-6 - Negativa; 7 – CVS (Controle Positivo) e 8 – Água Ultra-pura (Controle Negativo). **B**. Reação de hnRT-PCR. L – Ladder – Marcador molecular com 100pb; 1 – Diluição 10-1 - Positiva; 2 – Diluição 10-2 - Positiva (banda com baixa intensidade de brilho); 3 – Diluição 10-3 – Positiva (banda com baixa intensidade de brilho); 4 – Água Ultrapura (Controle de contaminação da reação); 5 – Diluição 10-4 - Negativa; 6 – Diluição 10-5 - Negativa; 7 – Diluição 10-6 - Negativa; 8 – Água Ultrapura (Controle de contaminação da reação); 9 – CVS (Controle Positivo) e 10 – Água Ultra-pura (Controle Negativo) .....**108**

Figura 12 – Gráficos (*amplification plot*) da reação de *Real Time* RT-PCR para a determinação do limiar de detecção da amostra de campo utilizada como padrão positivo (4255V/10). **A**. Diluição 10-1 - Positiva; **B**. Diluição 10-2 - Positiva; **C**. Diluição 10-3 – Positiva; **D**. Diluição 10-4 - Positiva; **E**. Diluição 10-5 - Negativa; **F**. Diluição 10-6 - Negativa.....**109**

λιστα δε θυαδροσ——————————————LISTA DE QUADROS

## LISTA DE QUADROS

*Quadro 1* – Classificação dos *Lyssavirus, adaptado de* McElhinney, Fooks e Radford (2008) ..... **44**

*Quadro 2* – Relação dos isolados de RABV de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus,* espécie e procedência dos mesmos, nos anos de 2009 e 2010 - São Paulo – 2011 ..... **70**

Quadro 3 - Padrão de reações do painel de anticorpos monoclonais do CDC para caracterização das variantes antigênicas encontradas na América Latina ..... **74**

Quadro 4 - Relação de *primers* utilizados na RT-PCR e hnRT-PCR para a identificação do RABV direcionados à região do gene codificador da proteína N e as respectivas regiões de hibridização ..... **79**

Quadro 5 - Ciclos da reação de PCR e hnRT-PCR para amplificação do gene N do RABV isolado de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos *Artibeus* spp. naturalmente infectados ..... **80**

Quadro 6 - Relação dos isolados de RABV de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionadas a morcegos hematófagos, utilizados para a escolha da área adequada para síntese dos primers e da sonda, identificando o hospedeiro original, município onde foram encontrados e nomenclatura dos isolados do estudo realizado por Fahl (2009) ..... **83**

Quadro 7 – Primers e sonda utilizados para a identificação do RABV na reação de *Real Time* RT-PCR e suas respectivas regiões de hibridização ..... **83**

Quadro 8 – Ciclos da reação de *Real Time* RT-PCR para amplificação do gene N do RABV isolado de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero Artibeus naturalmente infectados ..... **85**

Quadro 9 - Reagentes utilizados na reação de sequenciamento do DNA do RABV isolado de lavado cerebral de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados ..... **88**

Quadro 10 – Ciclos da reação de sequenciamento do RABV isolados de lavado cerebral de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados .... **88**

Quadro 11 - Reagentes utilizados na reação controle do sequenciamento ..... **89**

Quadro 12 – Concentração expressa em µg/mL, de RNA total extraído pela técnica utilizando *TRIzol®,* de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero *Artibeus*, positivos para raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011 ..... **96**

Quadro 13 - Dados da quantificação, expressos em µg/mL, do cDNA de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero

*Artibeus*, positivos para raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011 ..... **97**

Quadro 14 – Resultados gerados nos gráficos de presença e ausência e *amplification plot* na reação de *Real Time* RT-PCR nas amostras de bexiga, rins, pulmões e conteúdo fecal de morcegos, do gênero *Artibeus*, diagnosticados positivos para raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011 ..... **103**

Quadro 15 – Sensibilidade diagnóstica em % das técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR para a detecção do RABV em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados ..... **110**

Quadro 16 – Resultados em P valor do teste exato de Fisher aplicado para avaliar a proporção de positivos detectados pelas técnicas de hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR nos órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com o RABV..... **111**

λιστα δε ταβελασ——————————————LISTA DE TABELAS

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição e proporção (%) das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal positivos e negativos à técnica de isolamento viral em cultura de células N2A (IVCC), de morcegos, do gênero Artibeus, diagnosticados positivos para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011 .....**94**

Tabela 2 - Distribuição e proporção (%) das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal positivos e negativos na técnica de RT-PCR, de morcegos, do gênero Artibeus, diagnosticados positivos para raiva pela imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011 .....**98**

Tabela 3 - Distribuição e proporção (%) das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal positivos e negativos na técnica de hnRT-PCR, de morcegos, do gênero Artibeus, diagnosticados positivos para raiva pela imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011 .....**99**

Tabela 4- Distribuição e proporção (%) das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal positivos e negativos na técnica de Real Time RT-PCR, de morcegos, do gênero Artibeus, diagnosticados positivos para raiva pela imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011 .....**105**

λιστα δε γρ〈φιχοσ----------LISTA DE GRÁFICOS

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição de amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero Artibeus, diagnosticados positivos para a prova de isolamento viral em cultura de células (IVCC), Instituto Pasteur de São Paulo, - São Paulo – 2011 ..... **94**

Gráfico 2 - Distribuição das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero Artibeus, diagnosticados positivos pelas técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e Real Time RT-PCR, Instituto Pasteur de São Paulo, - São Paulo – 2011 ..... **105**

Gráfico 3 - Distribuição das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero Artibeus, diagnosticados negativos pelas técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e Real Time RT-PCR, Instituto Pasteur de São Paulo, - São Paulo – 2011 ..... **106**

# λιστα δε αβρεϖιατυρασ——————LISTA DE ABREVIATURAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| aa | Aminoácidos |
| ABLV | *Australian bat lyssavirus* |
| AcM | Anticorpos Monoclonais |
| AcN | Anticorpos Neutralizantes |
| AgV | Variante Antigênica |
| ARAV | *Aravan virus* |
| ATCC | *American Type Culture Collection* |
| BHK | *Baby Hamster Kidney* |
| CDC | *Center for Disease Control and Prevention* |
| cDNA | DNA Complementar |
| CER | *Chicken Embryo Related cells* |
| CSB | Cabine de Segurança Biológica |
| CVS | *Challenge Virus Standard* |
| $DL_{50}$ | Dose Letal 50% |
| $DLIC_{50}$ | Dose Letal Intracerebral 50% |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| dNTP | Trifosfato de Desoxinucleosídeo |
| DUVV | *Duvenhage virus* |
| EBLV | *European bat lyssavirus* |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FMVZ/USP | Faculdade de Medicina Vetrinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo |
| G | Glicoproteína do vírus da raiva |
| hn-PCR | *Hemi-Nested* PCR |
| hnRT-PCR | *Hemi-Nested* RT-PCR |
| IC | Intracerebral |
| IFD | Imunofluorescência Direta |

| | |
|---|---|
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| IP-SP | Instituto Pasteur de São Paulo |
| IPC | *Internal Positive Controle* / Controle Interno Positivo |
| IRKV | *Irkut virus* |
| IV | Isolamento Viral |
| IVC | Isolamento Viral em Camundongos |
| IVCC | Isolamento Viral em Cultura de Células |
| KHUV | *Khujand virus* |
| L | RNA-polimerase do vírus da raiva |
| LBV | *Lagos bat virus* |
| M | Proteína Matriz do vírus da raiva |
| MEM | Meio Essencial Mínimo de Eagle |
| MGB | *Minor Groove Binder* |
| $MgCl_2$ | Cloreto de Magnésio |
| MOKV | *Mokola virus* |
| mPCR | Multiplex PCR |
| N | Nucleoproteína do vírus da raiva |
| N2A | Neuroblastoma Murino |
| NCAM | *Neural Cell Adhesion Molecule* |
| nt | Nucleotídeo |
| OIE | Organização Mundial da Saúde Animal |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| P | Fosfoproteína do vírus da raiva |
| pb | Pares de Bases |
| PBS | *Phosphate Buffered Saline* / Solução Salina Tamponada |
| PCR | Reação em Cadeia pela Polimerase |
| PCR-RFLP | Fragmento de restrição previamente amplificado por PCR |

| | |
|---|---|
| PFGE | Eletroforese em gel de campo pulsante |
| PV | *Pasteur Virus* |
| q.s.p | Quantidade suficiente para |
| RABV | *Rabies Virus* / Vírus da Raiva |
| RAPD-PCR | DNA Polimórfico Aleatoriamente Amplificado |
| REA | Digestão por Enzimas de Restrição |
| RNP | Ribonucleoproteína |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| RT | Transcrição Reversa |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SHIBV | *Shimoni virus* |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| spp | Espécie |
| SNP | Sistema Nervoso Periférico |
| TBE | Tampão Tris/Borato/EDTA |
| UV | Ultravioleta |
| WCBV | *West Caucasian bat virus* |

λιστα δε σύμβολοσ

# LISTA DE SÍMBOLOS

## LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| α | Alfa |
| % | Porcentagem |
| ® | Marca Registrada |
| + | Reação Positiva |
| - | Reação Negativa |
| °C | Graus Celsius |
| cm | Centímetro |
| $CO_2$ | Dióxido de Carbono |
| kDa | Kilodalton |
| L | *Ladder* / Marcador molecular |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µM | Micrometro |
| M | Molar |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mm | Milimetro |
| mM | Milimolar |
| ng | Nanograma |
| nm | Nanômetro |
| P | P-valor |
| pH | Potencial Hidrogênio Iônico |
| P/V | Peso/Volume |
| TM | *Trendmark* |
| U | Unidade |
| V | Reatividade Variável |

| | |
|---|---|
| v | Versão |
| X | Vezes |
| xg | Força Gravitacional |

## SUMÁRIO


**1 INTRODUÇÃO** ..... **40**

**1.1 Raiva** ..... **40**

**1.2 Vírus da raiva** ..... **41**

1.2.1 Classificação ..... 42

1.2.2 Estrutura e morfologia ..... 44

**1.3 Morcegos e a raiva** ..... **47**

**1.4 Ordem *Chiroptera*** ..... **50**

**1.5 Família *Phyllostomidae* e o Gênero *Artibeus*** ..... **51**

**1.6 Transmissão do vírus da raiva em morcegos** ..... **53**

**1.7 Patogenia do vírus da raiva em morcegos** ..... **55**

**1.8 Diagnóstico da raiva** ..... **59**

**2 OBJETIVOS** ..... **66**

**3 MATERIAL E MÉTODOS** ..... **68**

**3.1 Amostras de vírus** ..... **68**

3.1.1 Vírus Fixo Padrão ..... 68

3.1.2 Vírus de campo ..... 68

*3.1.2.1 Titulação do vírus de campo* ..... 69

3.1.3 Morcegos ..... 69

**3.2 Preparo das Suspensões** ..... **70**

3.2.1 Lavado da Calota Craniana ..... 70

3.2.2 Órgãos e conteúdo fecal ..... 71

**3.3 Tipificação Antigênica** ..... **73**

**3.4 Isolamento Viral em Cultura de Células (IVCC)** ..... **74**

3.4.1 Cultura Celular ..... 74

3.4.2 Isolamento Viral em Cultura de Células ..... 75

**3.5 Extração do RNA Total pelo protocolo do *TRIzol*®** ..... **76**

**3.6 Quantificações** ..... **77**

3.6.1 RNA Total ..... 77

3.6.2 cDNA ..... 78

**3.7 *Hemi-Nested* RT-PCR** ..... **78**

3.7.1 *Primers* ..... 78

3.7.2 Transcrição Reversa - Síntese de DNA complementar ..... 79

3.7.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) ..... 80

3.7.4 *Hemi-Nested* PCR (hnRT-PCR) ..... 81

**3.8 *Real Time* RT-PCR** ..... **81**

3.8.1 Síntese dos *primers* e sonda para amplificação e detecção do gene N da nucleoproteína do RABV ..... 82
3.8.2 Controle de Amplificação ..... 84
3.8.3 Reação de *Real Time* RT-PCR ..... 84
3.8.4 Teste de Interferência do lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal na amplificação do IPC ..... 85
**3.9 Determinação do limiar de detecção da amostra de campo ..... 86**
**3.10 Sequenciamento do DNA ..... 86**
3.10.1 Purificação do produto da hnRT-PCR a partir do gel ..... 86
3.10.2 Quantificação de DNA ..... 87
3.10.3 Reação de Sequenciamento ..... 88
3.10.4 Purificação da reação de sequenciamento por *Sephadex*® ..... 89
3.10.5 Confirmação da Identidade genética das sequências ..... 90
**3.11 Análise Estatística ..... 90**
3.11.1 Teste de sensibilidade diagnóstica ..... 90
3.11.2 Teste exato de Fisher ..... 91
**4 RESULTADOS ..... 93**
**4.1 Titulação do Vírus de Campo ..... 93**
**4.2 Tipificação Antigênica ..... 93**
**4.3 Isolamento Viral em Cultura de Células ..... 93**
**4.4 Quantificação do RNA total e cDNA ..... 95**
**4.5 Técnicas de RT-PCR e hnRT- PCR ..... 97**
**4.6 Técnica de *Real Time* RT-PCR ..... 99**
4.6.1 Reação de *Real Time* RT-PCR ..... 99
4.6.2 Teste de Interferência do lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal na amplificação do IPC ..... 106
**4.7 Determinação do limiar de detecção da amostra de campo ..... 107**
**4.8 Sequenciamento do DNA - Confirmação da identidade genética das sequências ..... 109**
**4.9 Análise Estatística ..... 109**
4.8.1 Teste de sensibilidade diagnóstica ..... 110
4.8.2 Teste exato de Fisher ..... 110
**5 DISCUSSÃO ..... 113**
**6 CONCLUSÕES ..... 124**
**REFERÊNCIAS 126**

ιντροδυ| ©o----------INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

Serão abordados os temas referentes à raiva e seu agente etiológico, além de um histórico sobre a raiva e os morcegos; a transmissão do vírus da raiva em morcegos, patogenia e os principais métodos de diagnóstico laboratorial.

## 1.1 Raiva

A raiva é definida como uma antropozoonose viral (WHO, 1959) e é considerada uma doença negligenciada no mundo todo (FOOKS et al., 2003; DODET, 2006). Conhecida desde os tempos remotos, a doença é caracterizada por uma encefalomielite aguda fatal nos animais e no ser humano (ACHA; SZYFRES, 2003).

Apresenta um prognóstico letal e mesmo com todos os subsídios existentes para o seu controle e com o advento da vacina antivírus da raiva, produzida há 125 anos por Pasteur, é ainda considerada um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, onde os casos não são habitualmente notificados, dificultando assim o conhecimento da sua real incidência (COLEMAN; FÉVRE; CLEAVELAND, 2004).

A importância da raiva para saúde pública não se dá apenas pelo grande número de casos, mas também pela sua alta mortalidade e pelos elevados custos com tratamentos (KAPLAN; TURNER; WARREL, 1986), diagnósticos laboratoriais e reações adversas às vacinas (WHO, 2005).

Embora possa ser prevenida com a utilização de esquemas vacinais (BRIGGS; HANLON, 2007), a raiva está entre as dez principais causas de morte humana dentre as doenças infecciosas (WHO, 2000). Anualmente, aproximadamente dez milhões de pessoas são submetidas à profilaxia pós-exposição e a cada 15 minutos uma pessoa morre de raiva e outras 300 são expostas ao vírus (PLOTKIN, 2000; RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDA, 2002).

Dietzschold et al. (2008) relatam que ocorrem aproximadamente 70.000 óbitos humanos por raiva no mundo, porém a Organização Mundial da Saúde (OMS)

estima que anualmente ocorram aproximadamente, 55.000 óbitos por raiva, com um intervalo de confiança de 24.500 a 90.800 (α = 0,10), principalmente nas áreas rurais dos continentes asiático e africano, sendo suas vítimas na maioria crianças (WHO, 2005).

Na América Latina, a incidência anual da raiva por 100.000 habitantes varia entre 0 e 0,09 na América do Sul; 0 e 0,10 na América Central e 0 e 0,06 nas ilhas do Caribe. Na maioria dos casos, o cão foi identificado como o principal animal agressor (CHILDS; REAL, 2007).

No Brasil, entre 1986 e setembro de 2008, ocorreram 761 óbitos por raiva humana, sendo que destes, 516 tiveram o cão como animal agressor, seguido dos quirópteros que foram responsáveis por 135 casos[1].

A raiva é uma doença mantida e perpetuada na natureza por diferentes espécies de animais carnívoros domésticos e silvestres, denominados de "reservatórios", incluindo também morcegos de diferentes hábitos alimentares (SMITH,1996).

A raiva está distribuída em todos os continentes, com exceção da Antártida. Os países ou pequenas ilhas como a Antígua, Austrália, Bahamas, Barbados, Bermuda, Ilhas Cayman, Fiji, Finlândia, Islândia, República da Irlanda, Jamaica, Japão, Nova Zelândia, Noruega, Saint Kitts-Nevis-Anguilla, Santa Lúcia, Saint Martin (Antilhas Holandesas), Ilhas São Pedro e Miquelon, São Vicente, Suécia, Taiwan, Turquia e Ilhas Caico, Reino Unido, e Uruguai são considerados livres da raiva clássica (CANADIAN FOOD AND INSPECTION SERVICE, 2008).

## 1.2 Vírus da Raiva

Serão abordados aspectos sobre classificação, estrutura e morfologia do vírus da raiva.

### 1.2.1 Classificação

[1] Dados cedidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil – SVS/MS.

O vírus da raiva, pertence ao gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae* a qual junto com as Famílias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* e *Bornaviridae*, constitui a Ordem *Mononegavirales* (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV, 2009; CARSTENS, 2010).

Na classificação atual, o gênero *Lyssavirus* é constituído por onze espécies (Quadro 1) (CARSTENS, 2010). A espécie I – *Rabies virus* (RABV), compreende as amostras clássicas vacinais, chamadas "fixas" ou laboratoriais, e os isolados de vírus da maioria dos mamíferos terrestres e de morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros das Américas. Apresenta maior importância epidemiológica por sua associação com um grande número de casos de raiva em relação a outras espécies e por ser mais amplamente distribuída no mundo (TORDO, 1996; WUNNER, 2002).

Espécie II – *Lagos bat virus* (LBV), vírus isolado de morcegos frugívoros (*Eidolon helvum*, *Micropterus pusillus* e *Epomorphorus wahlbergi*) sendo o primeiro relato feito em 1956, na região de Lagos, na Nigéria (BINGHAM, 2001; WUNNER, 2002). Espécie III – *Mokola virus* (MOKV), o primeiro isolamento foi feito em 1968 em um *pool* de órgãos de musaranhos (*Crocidura* sp) seguido por isolamentos em humanos na Nigéria, e felinos do Zimbábue e Etiópia (NEL, 2001). Espécie IV – *Duvenhage virus* (DUVV), que em 1970 foi isolado de humano em *Warmbaths*, na região norte da Pretoria e, posteriormente isolado de morcegos insetívoros (*Miniopterus schreibersii* e *Nycteris thebaica*) da África do Sul e Zimbábue (BINGHAM, 2001).

Os vírus isolados na Europa, ambos em 1985, os "*European bat lyssaviruses*" (MESLIN; KAPLAN, 1996), também foram isolados de morcegos, um deles recebeu a denominação de espécie V – *European bat lyssavirus 1* (EBLV-1), agrupando os isolamentos feitos em morcegos do gênero *Eptesicus* e o outro, espécie VI – *European bat lyssavirus 2* (EBLV-2), constituído pelo agrupamento de vírus isolados do gênero *Myotis* (WHO, 1994; KING, 2001; POUNDER, 2003).

Em 1996, um *Lyssavirus* foi isolado do morcego frugívoro *Pteropus alecto*, na costa leste da Austrália, um país considerado livre de raiva desde 1867. Este vírus foi classificado como espécie VII – *Australian bat lyssavirus* (ABLV) (KING, 2001; POUNDER, 2003). Em 2003, foi descrita a espécie *Aravan virus* (ARAV), isolada de um morcego insetívoro (*Myotis blythi*) do Quirguistão, Ásia Central, em 1991 (ARAI et al., 2003; KUZMIN et al., 2003). A outra espécie, *Khujand virus* (KHUV), isolada em 2001, no Noroeste do Tadjiquistão, Ásia Central, também de um

morcego insetívoro (*Myotis mystacinus*) (KUZMIN; BOTVINKIN; KHABILOV, 2001; KUZMIN et al., 2003). As outras duas espécies foram isoladas na Rússia, uma obtida na cidade de Irkutsk, denominada *Irkut virus* (IRKV), isolada de um morcego *Murina leucogaster* e a outra, obtida da região Oeste das Montanhas do Cáucaso (cerca de 100 km a Sudeste da cidade de Krasnodar), denominada *West Caucasian bat virus* (WCBV), isolada a partir de um morcego *Miniopterus schreibersi* (BOTVINKIN et al., 2003).

Em 2009 foi isolado de um morcego insetívoro (*Hipposideros commersoni*), encontrado em uma caverna na região do Quênia, um novo lissavírus descrito como *Shimoni virus* (SHIBV), o qual foi sugerido como uma nova espécie (KUZMIN et al., 2010).

Até o presente momento, no continente americano, dentre as 11 espécies descritas do gênero *Lyssavirus*, somente foram diagnosticados casos de raiva atribuídos ao vírus da espécie I. Desta forma, tanto a Organização Mundial da Saúde (OMS) quanto a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) apenas consideram como raiva a doença determinada por vírus da espécie *Rabies virus* (WHO, 2005).

| Espécies | Filogrupo | Nomes | Abreviatura (ICTV*) | Distribuição | Reservatórios |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | I | *Rabies virus* | RABV | Mundial (exceção de algumas ilhas) | Carnívoros (mundo) e morcegos (Américas) |
| 2 | II | *Lagos bat virus* | LBV | África | Morcegos frugívoros |
| 3 | II | *Mokola virus* | MOKV | África | Desconhecido (isolado de musaranhos) |
| 4 | I | *Duvenhage virus* | DUVV | África | Morcegos insetívoros |
| 5 | I | *European bat lyssavirus 1* | EBLV-1 | Europa | Morcegos insetívoros (*Eptesicus serotinus*) |
| 6 | I | *European bat lyssavirus 2* | EBLV-2 | Europa | Morcegos insetívoros (*Myotis* sp) |
| 7 | I | *Australian bat lyssavirus* | ABLV | Australia | Morcegos insetívoros e frugívoros |
| 8 | I | *Aravan virus* | ARAV | Ásia Central | Morcego insetívoro (isolado de *Myotis blythi*) |
| 9 | I | *Khujand virus* | KHUV | Ásia Central | Morcego insetívoro (isolado de *Myotis mystacinus*) |
| 10 | I | *Irkut virus* | IRKV | Leste da Sibéria | Morcego insetívoro (isolado de *Murina leucogaster*) |
| 11 | II ou III | *West Caucasian bat virus* | WCBV | Região do Cáucaso | Morcego insetívoro (isolado de *Miniopterus schreibersi*) |
| Proposto | ? | *Shimoni virus* | SHIBV | Kenya | Morcego insetívoro (isolado de *Hipposideros commersoni*) |

*ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

Quadro 1 – Classificação dos *Lyssavirus*, adaptado de McElhinney, Fooks e Radford (2008)

### 1.2.2 Estrutura e morfologia

O *virion* possui em média 180 nanômetros (nm) (variando de 130 a 250 nm) de comprimento, incluindo as projeções de superfície, e a média do diâmetro é de 75 nm, que pode variar entre 60 e 110 nm. A simetria cilíndrica do *virion* é formada por um nucleocapsídeo helicoidal que mede aproximadamente 165 X 50 nm e possui entre 30 e 35 espirais (WUNNER, 2007). Sua morfologia é baciliforme, semelhante à “bala de revólver”, com uma extremidade arredondada ou cônica e a outra plana ou convexa, sendo constituído de nucleocapsídeo helicoidal ou ribonucleoproteínas (RNP) e o envelope viral coberto de glicoproteínas espiculadas (KAPLAN, 1996).

A RNP é filamentosa, composta por uma fita simples de RNA genômico de forma helicoidal não segmentado e de senso negativo, associadas às nucleoproteínas (N), fosfoproteína (P) e RNA-polimerase viral (L) (TORDO et al., 1986; FAUQUET et al., 2005).

As diferentes espécies do gênero *Lyssavirus* são formadas por cinco proteínas estruturais: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e a RNA-polimerase (L), de modo que a partícula viral completa contém ácido ribonucléico (RNA) (entre 2 e 3%), proteínas (entre 67 e 74%), lipídeos (entre 20 e 26%) e carboidratos (3%) (WUNNER, 2007).

O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica, composta por fosfolipídeos, lipídeos neutros e glicolipídeos, em proporções que variam de acordo com o tipo celular do hospedeiro utilizado para a replicação viral. A essa estrutura lipídica dupla estão associadas duas proteínas: a proteína M e a glicoproteína G. A glicoproteína é uma proteína transmembranária que se projeta para o exterior com espículas glicosiladas em forma de trímeros (WUNNER et al., 1985; WUNNER, 2002).

O papel da proteína G como proteína de fusão é facilitar a entrada do vírus à célula hospedeira. Após a ligação específica do vírus com a célula hospedeira, o vírus é internalizado com o auxílio das espículas glicosiladas que desencadeiam uma fusão dependente do baixo pH para a entrada do endossomo (WUNNER, 2007). Ainda auxilia o desnudamento viral, catalisa a fusão da membrana endocítica e é o principal antígeno viral (DE MATTOS; DE MATTOS; RUPPRECHT, 2001; ROSE; WHITT, 2001).

A nucleoproteína N é um polipeptídeo constituído de 450 aminoácidos (aa), e apresenta massa molecular de aproximadamente 57 kilodaltons (kDa) (TORDO et al., 1986). O maior grau de similaridade entre sequências de aa (98-99%) ocorre entre as diferentes amostras de RABV. Os vírus que apresentam menos que 80% de similaridade na sequência de nucleotídeos (nt) ou menos que 92% na sequência de aa pertencem a diferentes espécies virais (KISSI; TORDO; BOURHY, 1995; WUNNER, 2002).

A proteína N é a segunda mais estudada com relação a sua função e sua estrutura imunogênica e antigênica. Forma o capsídeo e está fortemente associada ao RNA viral, protegendo-o das ações das ribonucleases. Possui grande importância estrutural na encapsidação do RNA genômico, além de estar envolvida nas etapas de transcrição e replicação, já que estas etapas não se iniciam sem que a quantidade suficiente de proteína N esteja unida ao RNA genômico. Pelo fato da nucleoproteína ser uma região gênica muito conservada, esta facilita o desenho de

iniciadores (*primers*) competentes na amplificação de inúmeras espécies virais (TORDO et al., 1986; TORDO; POCH, 1988; CREPIN et al., 1998; WUNNER, 2002).

É altamente imunogênica, sendo fundamental para a resposta imune contra o RABV, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes (AcN), ativação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos e atua na patogênese da doença (WUNNER, 2007).

A proteína P é um polipeptídeo fosforilado que contém 297 aa, é altamente conservado (maior que 97%) entre os lissavírus da espécie *Rabies virus*. Possui massa molecular entre 38 e 41 kDa, interage com as proteínas N e L e acredita-se que atue como cofator da RNA-polimerase (WUNNER, 2007). A proteína P é multifuncional, ligando-se a outras proteínas virais para auxiliar na replicação do genoma viral e também interagir com fatores celulares e, possivelmente, está associada à disseminação e patogênese viral (LAFON; WIKTOR, 1985; MEBATSION, 2001).

A proteína M é a menor e a mais abundante do RABV e contém aproximadamente 202 aa com massa molecular de 25 kDa (TORDO et al., 1986; AMEYAMA et al., 2003). Aproximadamente 1200 a 1500 moléculas de proteína M se ligam às RNP, condensando-a e formando o arcabouço do *virion*. O tropismo da RNP pela membrana celular é determinado por esta proteína, possibilitando seu brotamento. Além da proteína M ligada à RNP ser responsável pelo brotamento do vírus, a interação desta proteína com a proteína G, presente nas membranas celulares, estimula fortemente esse processo (MEBATSION; WEILAND; CONZELMANN, 1999).

A RNA-polimerase é a maior proteína do vírus, com 2.142 aa e massa molecular de 244,2 kDa, originando assim o nome *"large".* O grande tamanho desta proteína é justificado pela complexidade das reações que catalisa e a multifuncionalidade que ela apresenta. É responsável pelas atividades enzimáticas necessárias à transcrição e replicação do RNA viral (TORDO et al., 1988). A proteína L é o componente catalítico do complexo polimerase que, juntamente com o cofator P, é responsável pela maioria das atividades enzimáticas que ocorrem tanto na transcrição quanto na replicação do genoma do RABV.

## 1.3 Morcegos e a raiva

A possibilidade de os morcegos hematófagos desempenharem importante papel na propagação da raiva foi, pela primeira vez, levantada no início do século passado, após a ocorrência de uma grave epizootia de raiva na faixa compreendida entre a serra e o mar, em frente à Ilha de Santa Catarina, no Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil, na qual morreram cerca de 4.000 bovinos e 1.000 equinos e muares, que eram destinados aos trabalhos de campo e transporte de produtos agrícolas, causando elevado prejuízo econômico à população local (CARINI, 1911). Por meio de informações de produtores locais, soube-se da ocorrência de óbitos de animais dos dois lados do Rio Itajaí, demonstrando assim que o cão não poderia estar envolvido na transmissão da doença. Neste mesmo período foi confirmada a presença de morcegos que atacavam bovinos e equinos durante o dia e foram observadas brigas entre esses animais (HAUPT; REHAAG, 1925).

Haupt e Rehaag (1925), pesquisando na mesma região onde Carini havia diagnosticado raiva em bovinos, identificaram a presença de corpúsculos de Negri no sistema nervoso central (SNC) de um morcego hematófago, que estava se alimentando em um bovino, confirmando a hipótese de Carini. Coube também aos dois pesquisadores alemães a primeira descrição, em 1916, no Brasil, da presença do RABV em um morcego não hematófago da espécie *Phyllostoma superciliatum*, atualmente classificado como *Artibeus lituratus*, no entanto, o fato só foi relatado em 1935 (TORRES; QUEIROZ LIMA, 1935). Contestações surgiram em torno da identificação da espécie do morcego envolvido, se era mesmo um morcego frugívoro *Phyllostoma superciliatum* (*A. lituratus*) ou um hematófago *Desmodus rotundus*.

Após serem iniciadas as primeiras pesquisas, o RABV começou a ser isolado de outros morcegos, entre eles os hematófagos das espécies *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata* (LIMA, 1934; TORRES, 1934). O espécime *Diphylla ecaudata* diagnosticado positivo estava no mesmo abrigo de cinco espécimes de *Desmodus rotundus*, sendo que dois apresentaram sintomas de paralisia e dificuldade de voo, outros dois morreram sem manifestarem sintomas e um permaneceu vivo disseminando o vírus (TORRES; QUEIROZ LIMA, 1935).

Passado pouco mais de uma década depois da epidemia de raiva no Estado de Santa Catarina, uma doença misteriosa acometeu os bovinos da ilha de Trinidad, no Caribe, atingindo inclusive os seres humanos, sendo mais tarde diagnosticada

como raiva (CARNEIRO, 1936). Os episódios da raiva humana na ilha de Trinidad foram descritos por Hurst e Pawan (1931). O RABV foi isolado do morcego hematófago *D. rotundus* e de morcegos frugívoros *Artibeus planirostris trinitalis, Diclidurus albus* e *Hemiderma* sp e neste mesmo período foi possível infectar experimentalmente com o RABV os morcegos *D. rotundus* e *A. lituratus* (PAWAN, 1936a).

Ocorrências da raiva transmitida pelos morcegos hematófagos foram registradas na Colômbia, Bolívia, México, Venezuela, Paraguai e Argentina (CARNEIRO, 1936; TELLEZ GIRON, 1944) e em estados do Brasil (CARNEIRO; FREITAS LIMA, 1927), porém, aparentemente, o relato de Pawan (1936a) foi a primeira descrição sobre raiva em morcegos não hematófagos da América Latina. O fato, no entanto, não despertou muito interesse, comparado à grande repercussão e preocupação demonstrada pelos pesquisadores em relação à raiva transmitida pelos morcegos hematófagos (BAER, 1975).

A preocupação com os morcegos hematófagos na América Latina era compreensível, devido ao enorme prejuízo econômico em decorrência da morte dos animais por raiva. Além disso, houve uma perceptível diminuição da produtividade por repetidos ataques que causavam debilidade do gado, principalmente devido à perda de sangue, infecções secundárias nas feridas, miíases e depreciação do couro (ACHA, 1967; ARELLANO-SOTA; SUREAU; GREENHAL, 1971).

Desta forma, os morcegos hematófagos, especialmente o *D. rotundus* como reservatórios do RABV, passaram a ocupar posição de destaque nos países da América Latina (TORRES; QUEIROZ LIMA, 1936), afinal, os mesmos são encontrados desde o Norte do Chile e Argentina até o Norte do México e parte do Caribe, não existindo em outras regiões do globo terrestre (KOOPMAN, 1988).

Um pequeno incidente ocorrido na Flórida, EUA, em 1953, quando um menino foi atacado por um morcego insetívoro *Dasypterus floridanus* (atualmente denominado de *Lasiurus intermedius*), fez com que os pesquisadores norte-americanos voltassem suas atenções à questão da raiva em morcegos não hematófagos (BIGLER; HOFF; BUFF, 1974). O morcego agressor foi diagnosticado positivo para raiva e o menino recebeu tratamento antivírus da raiva de pós-exposição, não desenvolvendo a doença (SCATTERDAY, 1954; VENTERS et al., 1954). Pouco tempo depois deste incidente, outros morcegos não hematófagos das

espécies *Lasiurus cinereus* e *Lasiurus seminola*, ambos insetívoros, foram diagnosticados positivos para raiva no Estado da Pennsylvania (WITTE, 1954). A partir de então, as autoridades de saúde pública dos EUA se interessaram em conhecer a extensão da raiva nos morcegos não hematófagos e a infecção pelo RABV foi confirmada em diferentes espécies de morcegos de hábitos alimentares distintos, incluindo os insetívoros, frugívoros, onívoros, polinívoros e piscívoros.

Os gêneros de morcegos mais frequentemente diagnosticados positivos para raiva incluíam os *Lasiurus*, *Tadarida*, *Eptesicus*, *Myotis*, *Plecotus*, *Pipistrellus*, *Mormoops*, *Euderma*, entre outros. Na década de 1960, um grande número de morcegos de diferentes hábitos alimentares foram diagnosticados positivos para raiva nos EUA, Canadá, México, Guatemala, Panamá, Honduras, Colômbia e Venezuela no continente americano, e também na Europa (Alemanha, Turquia e antiga Iugoslávia), Ásia (Tailândia) e África (África do Sul) (BAER, 1975).

Na mesma época, no Brasil, houve registro de isolamento do RABV do morcego *Phyllostomus hastatus hastatus*, procedente de Itaguaí, Rio de Janeiro (SILVA; RIVELLO; NILSSON, 1961) e vários casos positivos em diferentes espécies, como *Tadarida brasiliensis*, capturado com sintomas de paralisia, no interior de uma residência em São Leopoldo, Rio Grande do Sul (UIEDA et al., 1992); no morcego hematófago *Diaemus youngi*, no Estado de Alagoas (SILVA; SOUZA, 1968a); em um morcego insetívoro, *Histiotus velatus*, capturado em uma furna, em Alfredo Wagner, Santa Catarina (AMORIM; SILVA; SILVA, 1970) e no *Chrotopterus auritus*, capturado aparentemente sadio no Estado do Rio de Janeiro (SILVA; ALENCAR, 1968). Outros diagnósticos positivos em morcegos insetívoros e frugívoros foram constatados na década de 70, onde um morcego da espécie *Molossus molossus* foi capturado em pleno dia impossibilitado de voar, no pátio de uma casa em uma fazenda em Campinas - SP (RODRIGUES et al., 1975) e três espécimes de *Artibeus lituratus* foram capturados em uma mangueira, em Itajaí, Rio de Janeiro (SILVA; SILVA, 1974).

No Estado de São Paulo, entre os anos de 1984 e 1991 ocorreram mais sete casos de positividade em morcegos, sendo três frugívoros e quatro insetívoros (UIEDA et al., 1992; UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995). Entre esses casos estava o primeiro registro de raiva em *Nyctinomops macrotis* no Brasil (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995). Até o final de 1998, mais um caso em morcego frugívoro (PASSOS et al., 1999) e oito casos em morcegos insetívoros, incluindo espécies como: *Myotis*

*nigricans*, *Lasiurus borealis*, *Nyctinomops macrotis*, *Molossus ater*, *Histiotus velatus* e o primeiro caso no Estado de São Paulo em *Tadarida brasiliensis* foram diagnosticados por meio de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos (MARTORELLI et al., 1995, 1996; BERNARDI et al., 1998; PASSOS et al., 1998; UIEDA, 1998; SILVA et al., 1999).

Até 1996 relatos mostravam que no Brasil havia registros de 27 espécies de morcegos de diferentes hábitos alimentares com diagnóstico positivo para raiva, sendo que a maioria destas notificações eram procedentes dos Estados da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Rio Grande do Sul (UIEDA et al., 1996).

Em 2010, Sodré, Gama e Almeida relataram que no Brasil há registros de 41 espécies de morcegos de diferentes hábitos alimentares com diagnóstico positivo para raiva. Ainda em 2010, foi identificado e diagnosticado positivo para raiva um espécime *Artibeus obscurus*, proveniente do município de Ribeirão Preto, aumentando assim a lista para 42 espécies positivas para raiva[2].

## 1.4 Ordem *Chiroptera*

Os morcegos representam um dos grupos mais antigos com notáveis peculiaridades e compõem uma das ordens mais características entre os mamíferos, pois são os únicos a apresentar estruturas especializadas que permitem um voo verdadeiro (NOWAK, 1991; PERACCHI et al., 2006).

Pertencem à ordem *Chiroptera* que é a segunda maior ordem entre os mamíferos, possuindo 1113 espécies, o que representa cerca de 20% dos mamíferos da atualidade, sendo ultrapassada apenas pela ordem *Rodentia* (NOWAK, 1999; SIMMONS, 2005).

Tradicionalmente a ordem *Chiroptera* é dividida em duas subordens: *Megachiroptera* e *Microchiroptera*. A subordem *Megachiroptera* possui apenas uma família, *Pteropodidae*, com 150 espécies que habitam exclusivamente o Velho Mundo, na região tropical da África, Índia, sudeste da Ásia e Austrália (FENTON, 1992) e os seus representantes possuem hábitos crepusculares, são frugívoros e

[2] Dados não publicados, Instituto Pasteur de São Paulo

pelo seu tamanho e a similaridade de suas faces com as das raposas, são chamados de “raposas voadoras” (REIS et al., 2007).

Os morcegos da subordem *Microchiroptera* apresentam um tamanho relativamente pequeno quando comparados aos grandes morcegos frugívoros do Velho Mundo. Possui a maior diversidade de morcegos, variedade em tamanhos e hábitos alimentares (PERACCHI et al., 2006). São utilizados como alimentos por esses animais, insetos e outros artrópodes (como escorpiões), pequenos peixes, anfíbios (rãs e pererecas), pássaros, frutos, sementes, folhas, flores, pólen, néctar, pequenos vertebrados e sangue (GARDNER, 1977; HILL; SMITH, 1988; FENTON, 1992; PERACCHI et al., 2006). A maioria dos seus representantes encontra-se no continente americano, tem ampla distribuição geográfica, habitando todos os continentes. Estão distribuídos em 17 famílias, e 930 espécies no mundo (SIMMONS, 2005). A ordem tem, portanto, 18 famílias, nas quais se distribuem aproximadamente 199 gêneros e 1113 espécies (SIMMONS, 2005; PERACCHI et al., 2006).

O Brasil é o maior país da região neotropical e essa região é considerada a maior zona biodiversa do mundo, incluindo os morcegos. Das dezoito famílias de morcegos existentes, nove estão presentes nos neotrópicos, com cerca de 290 espécies (HUTSON; MICKLEBURGH; RACEY, 2001).

No Brasil, os morcegos estão incluídos em nove famílias, 64 gêneros e 168 espécies (REIS et al., 2007). A família mais numerosa é a *Phyllostomidae*, com 90 espécies registradas, seguida de *Molossidae* com 26, *Vespertilionidae* com 24, *Emballonuridae* com 15 espécies e as famílias *Noctilionidae*, *Mormoopidae*, *Natalidae*, *Furipteridae* e *Thyropteridae*, totalizando outras 13 espécies (PERACCHI et al., 2006).

## 1.5 Família *Phyllostomidae* e o Gênero *Artibeus*

A família *Phyllostomidae* é a mais diversificada da região neotropical incluindo cerca de 57 gêneros e 160 espécies, na sua maioria adaptadas a baixas altitudes e regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo (SIMMONS, 2005). No Brasil, os filostomídeos estão representados por 90 espécies e 40 gêneros, que

correspondem a 55,76% e 62,5%, respectivamente, dos morcegos já registrados no país (PERACCHI et al., 2006).

A principal característica para o reconhecimento dos morcegos desta família é a presença de um apêndice dérmico que se projeta acima das narinas. Essa estrutura conhecida como “folha nasal” é uma protuberância carnosa do nariz com forma de ponta de lança, pode ser bem desenvolvida em algumas espécies, sendo longa e ultrapassando a cabeça do animal em tamanho ou bastante modificada, em forma de ferradura, sendo quase ausente nos desmodontíneos (NOWAK, 1999; PERACCHI et al., 2006).

Apresentam grande diversidade quanto aos hábitos alimentares como néctar, pólen, frutos, partes florais, insetos, peixes, anfíbios, pequenos mamíferos, inclusive outros morcegos e sangue (NOWAK, 1999; PERACCHI et al., 2006).

A oferta de alimento para morcegos frugívoros pode ser elevada em áreas urbanas. Estudos realizados por Sazima et al. (1994) registraram na área urbana de Campinas-SP, o consumo de frutos de 15 espécies diferentes, sendo quatro exóticos e 11 nativos, por *Artibeus lituratus.* Além de fornecer alimento, a vegetação também é utilizada como abrigo diurno por várias espécies, incluindo *A. lituratus*, que podem se abrigar nas copas de mangueiras, jaqueiras, cássias, sibipirunas, jabuticabeiras e sob folhas de palmeiras (TADDEI, 1983; SAZIMA et al., 1994). A colonização de cidades por morcegos frugívoros se deve, entre outros fatores, à contínua urbanização, ao uso de plantas nativas no processo de arborização urbana e à destruição dos remanescentes de vegetação nativa, principalmente no entorno das cidades (SAZIMA et al., 1994; BREDT; UIEDA, 1996).

Dentre os frugívoros, as espécies do gênero *Artibeus*, Leach, 1821, incluída na subfamília *Stenodermatinae*, destacam-se por desempenharem importante função ao utilizar diversos tipos de plantas e frutos em sua dieta, pois em consequência deste hábito, promovem a dispersão de sementes, por defecação ou descarte, em áreas desflorestadas ou por deixarem cair sementes ao levarem o alimento para o abrigo. Portanto, os morcegos frugívoros agem como dispersores de sementes, contribuindo para o estabelecimento de muitas espécies de plantas, o que possibilita o processo de regeneração e sucessão na formação de florestas (GALETTI; MORELLATO, 1994; PASSOS et al., 2003; ZORTÉA, 2007).

Nove das 18 espécies do gênero ocorrem no Brasil (REIS et al., 2007). Apresentam orelhas bastante desenvolvidas, que auxiliam na ecolocalização e na

percepção dos sinais sonoros de suas presas, além de asas largas e curtas que permitem um voo mais lento e manobrável em meio à vegetação (REID, 1997). Apresentam, também, folha nasal desenvolvida, de tamanho mediano, o que deve ter importância para a ecolocalização nesse grupo, e não apresentam cauda (ZHUANG; MÜLLER, 2006; REIS et al., 2007).

Os morcegos do gênero *Artibeus* apresentam uma ampla distribuição, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina, Bolívia, Trinidad e Tobago, Pequenas Antilhas, Ilhas Três Marias e em todas as regiões do Brasil (KOOPMAN, 1982; SIMMONS, 2005).

## 1.6 Transmissão do vírus da raiva em morcegos

Segundo Kotait[3] (2003) os morcegos são responsáveis pela manutenção do RABV no ciclo aéreo, e todas as espécies podem se infectar e, consequentemente, transmitir o RABV por possuírem características especiais, como alta densidade populacional, grande capacidade de deslocamento, intensa interatividade social e hábitos sinantrópicos (informação verbal).

Provavelmente os morcegos hematófagos já estavam infectados com o RABV muito antes da descoberta da América pelos colonizadores europeus e os seres humanos e animais sofriam, continuamente, devido a raiva transmitida pelos morcegos na América tropical (CONSTANTINE, 1988).

A transmissão do vírus ocorre principalmente pelo contato direto do suscetível com o animal infectado e as principais formas de transmissão entre as espécies de morcegos hematófagos são por mordedura e lambedura, já que estes animais possuem hábitos gregários, caracterizados principalmente por este tipo de interação (PASSOS et al., 1999).

Os morcegos não hematófagos podem ser infectados ao compartilharem o mesmo abrigo com os morcegos hematófagos infectados com RABV, ou mesmo ao disputarem território com esses morcegos. Os morcegos não hematófagos infectados, quando encontrados vivos, mortos ou prostrados, em ambientes

[3] Seminário do Centenário do Instituto Pasteur, 2003.

urbanos, podem transmitir acidentalmente a doença à espécie humana e a outros animais (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995).

Essa transmissão ocorre normalmente por mordedura, podendo ser um mecanismo de defesa, ou como forma de se alimentar, mais comumente nas espécies hematófagas. Contatos defensivos são mais frequentes entre as espécies não hematófagas, em que podem ser observados ferimentos mínimos dos dentes das espécies de morcegos de pequeno porte, que muitas vezes não são facilmente vistos sem um exame cuidadoso, podendo levar à impressão de ausência de mordedura no suscetível (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995).

Morcegos da espécie *Lasionycteris noctivagans* têm grande envolvimento na transmissão do RABV, especialmente nos EUA, e tem como característica esta suposta ausência de mordedura na transmissão. Estudos experimentais utilizando vírus isolados desta espécie insetívora indicam que ocorre uma replicação local eficiente na derme, incluindo a infecção de fibroblastos e células epiteliais, o que pode justificar o sucesso de uma infecção em que não se tem evidência de agressão por mordedura. No entanto, após a exposição superficial não é claro como ou por quais sítios exatamente o vírus invade os nervos periféricos na pele ou tecidos subcutâneos (MORIMOTO et al., 1996).

Ainda baseado nestes estudos, foram levantadas hipóteses de que isolados destas espécies têm sofrido mudanças genéticas que podem permitir uma maior probabilidade de infecção após contato superficial. Foram realizados experimentos utilizando estes isolados comparados com outros de cães domésticos e coiotes, e verificou-se que o vírus isolado desta espécie de morcego apresentou títulos maiores em células epiteliais e em tecido muscular, quando comparado com as demais espécies. Além disso, mudanças na estrutura molecular da glicoproteína, que podem estar ligadas ao aumento da infectividade, também foram observadas (MESSENGER et al., 2003).

No Brasil, o envolvimento de morcegos hematófagos na transmissão da raiva aos seres humanos, no início da década de 80, era de 2%, do total destes casos (SCHNEIDER, 1990). Nos anos de 2004 e 2005 ocorreu um surto de raiva humana, na região nordeste do país, sendo registrados respectivamente 22 e 42 casos de raiva transmitida por morcegos hematófagos. Nos últimos 10 anos foram notificados 163 casos de raiva em humanos no Brasil, sendo que 45% (43 casos) foram transmitidos por morcegos (BRASIL, 2009). Na década anterior foram

registrados 412 casos, dos quais 12% (49 casos) tiveram os morcegos como transmissores (SCHNEIDER et al., 2009). Por outro lado, a transmissão do RABV pelos morcegos não hematófagos aos animais terrestres silvestres continua sendo uma grande indagação e, caso ocorra esta transmissão, Baer (1975) já sugeria que deveriam ser levadas em consideração medidas de controle a serem adotadas para essas espécies.

Por meio de investigações epidemiológicas da raiva em animais silvestres, foi demonstrado que o vírus pode ser transmitido especificamente para uma determinada espécie de hospedeiro, tornando-se extremamente adaptado à esta espécie e menos capacitado para infectar outras espécies. Esta relação hospedeiro-parasita tornou-se conhecida como "compartimentalização" do RABV (CONSTANTINE, 1988; WINKLER, 1975). Sugere-se que existe compartimentalização quando o RABV de determinada espécie de morcego não apresenta características semelhantes às dos vírus isolados de outras espécies de morcegos. Estes estudos foram grandemente facilitados com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e técnicas de caracterização genética (CONSTANTINE, 1988).

Portanto, a transmissão eficiente da doença depende da quantidade de vírus presente na saliva do animal infectado e particularmente da gravidade da mordedura, principalmente se esta alcança o tecido muscular onde há alta concentração de receptores celulares específicos, como o da acetilcolina (JACKSON, 2002).

## 1.7 Patogenia do vírus da raiva em morcegos

Ao ocorrer o contato direto do animal infectado com um suscetível, acontece inicialmente a fixação do RABV à superfície da célula do hospedeiro (TSIANG, 1993), posteriormente ocorre a replicação viral nos miócitos, podendo também ocorrer no tecido subepitelial, dependendo da espécie acometida. Murphy e Bauer (1974) sugeriram que esta etapa serve para amplificar, em número suficiente, a quantidade de partículas infecciosas, para futura invasão do Sistema Nervoso

Periférico (SNP). Ao atingir altas concentrações antigênicas, ocorre a replicação extraneural, onde as terminações nervosas são atingidas (FEKADU et al., 1988).

Estudos em animais de experimentação com a utilização de amostras do vírus fixo da raiva indicam que o vírus é capaz de entrar direto nos nervos periféricos, sem a necessidade de um ciclo replicativo em células extraneurais e isso estaria associado a um período de incubação mais curto (SHANKAR; DIETZSCHOLD; KOPROWSKI, 1991).

A partir deste momento, a glicoproteína viral se liga aos receptores específicos, como o receptor nicotínico da acelticolina, na altura das junções neuromusculares, e penetra nas terminações nervosas sensitivas. Estudos utilizando co-culturas nervo-músculo indicam que a junção neuromuscular é o principal sítio de entrada em neurônios (LEWIS; FU; LENTZ, 2000).

Outros dois prováveis receptores responsáveis pela interação do RABV com a célula hospedeira têm sido descritos na literatura: a molécula de adesão da célula neural (NCAM - *neural cell adhesion molecule*) e o receptor neurotrófico p75 (TUFFEREAU et al., 1998). A NCAM é expressa em três isoformas principais e está presente no músculo e em junções neuromusculares (MOSCOSO; CREMER; SANES, 1998). Pesquisadores têm investigado a real importância do receptor neurotrófico p75 na patogenia da raiva (LANGEVIN et al., 2002).

Uma vez no SNP, o vírus é transportado aos gânglios sensitivos por trajeto centrípeto e atinge o SNC, sendo a propagação viral por fluxo axoplasmático retrógrado por meio de junções sinápticas (KUCERA et al., 1985; TSIANG; CECCALDI; LYCKE, 1991). No SNC ocorre uma intensa disseminação, entretanto, a mesma não é homogênea, podendo afetar de diferentes maneiras as diversas estruturas deste órgão. Posteriormente, o vírus migra por trajeto centrífugo em direção aos diferentes órgãos, envolvendo particularmente o sistema nervoso parassimpático (JACKSON, 2002).

A difusão centrífuga do vírus alcança outros tecidos não nervosos. O caminho viral para as glândulas salivares é por meio dos nervos que se originam próximo aos centros nervosos vitais, e essa difusão geralmente coincide com o comportamento agressivo do animal (SCHNEIDER, 1991). Este fato está relacionado, principalmente, ao comprometimento do hipotálamo medial e dos núcleos da rafe localizados no tronco encefálico, já que esses são centros inibitórios que regulam o comportamento agressivo (CHARLTON, 1988).

Em diversas espécies de mamíferos estudadas, verificou-se que os órgãos envolvidos pelo vírus durante a migração centrífuga, além das glândulas salivares, incluem o coração, fígado, pele, timo, rins, pâncreas, ovários, útero, glândula adrenal, pulmão, baço, intestinos, músculos liso e esquelético, folículos pilosos, epitélio da língua, mucosa nasal e oral, papilas gustativas, retina e córnea (MURPHY et al., 1973; BRASS, 1994; AWASTHI et al., 2001; DE MATTOS; DE MATTOS; RUPPRECHT, 2001).

Scheffer et al., em 2007, ao estudarem a patogenia da raiva em morcegos, evidenciaram a presença do RABV em fragmentos de SNC, glândula salivar, músculo peitoral, coração, pulmões, estômago, rins, bexiga urinária, trato genital, língua e gordura interescapular, utilizando técnicas de isolamento viral em camundongos (IVC) e em cultivo celular (IVCC).

Além da pele lesada, outras portas de entrada são raras, porém, em 1956, foi registrado um caso de raiva humana, em um indivíduo que trabalhava em cavernas com morcegos, porém sem histórico de mordedura ou outro contato com algum animal suspeito. Após investigação epidemiológica, aventou-se a hipótese de que o indivíduo se infectara por meio da inalação de partículas virais em suspensão na caverna (BRASS, 1994; WARRELL; WARRELL, 2004). A infecção por via aérea também foi demonstrada, em condições naturais, quando animais sadios foram colocados dentro de grutas onde viviam grandes colônias de morcegos infectados. Antígenos do RABV foram observados em células de receptores olfativos de morcegos, por meio de infecção ocorrida em cavernas, sugerindo que a mucosa nasal é uma importante porta de entrada da infecção natural (CONSTANTINE, 1962). No entanto, acredita-se que seja necessário um número muito grande de morcegos infectados, em uma área sem ventilação, para que ocorra a transmissão por via aerógena do RABV (JACKSON, 2002).

O período de incubação da raiva em morcegos hematófagos infectados experimentalmente é variável, de 7 a 171 dias, e este fato pode estar relacionado à quantidade inoculada de vírus por meio da mordedura, lambedura ou arranhadura; local da porta de entrada; estado imune do indivíduo, à gravidade da lesão e ao fato destes animais apresentarem taxa metabólica elevada e possuírem características de hipotermia (LUNA; CHAHUAYO; MARREROS, 1985; ACHA; SZYFRES, 1986; BRASS, 1994).

As manifestações clínicas da raiva em morcegos hematófagos foram descritas por Pawan (1936b) de seis formas, sendo: 1- forma clássica, com estágio predominante de fúria, seguida de paralisia e morte; 2 - forma paralítica clássica, com raiva silenciosa, a fúria não está presente. A paralisia é seguida por morte; 3 - forma furiosa onde a paralisia não existe. A fúria é seguida de morte; 4 - ausência completa de sintomas e morte repentina; 5 - forma furiosa, onde a fúria é seguida de recuperação e 6 - forma assintomática, onde o morcego não apresenta sinal de anormalidade, mas ainda é capaz de transmitir a doença.

Constantine (1967), no entanto, relatou que os sinais clínicos em morcegos naturalmente infectados são predominantemente paralíticos ao invés de furiosos e incluem: irritabilidade ou prostração, debilidade, anorexia, hipotermia e paralisia. A paralisia inicial pode envolver as pernas, asas, pescoço, pálpebras, cabeça ou maxilar. Prejuízos neurais podem se estender à bexiga, resultando em incontinência urinária; podendo ocorrer também incontinência fecal. A paralisia evolui por todo corpo na fase terminal e a morte acontece em alguns dias (BRASS, 1994).

São poucos os experimentos de inoculação do RABV em morcegos não hematófagos. Os morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis mexicana* e *Antrozous pallidus* foram suscetíveis à infecção experimental com vírus isolado de um morcego do gênero *Tadarida*. Inoculados por via intracerebral, subcutânea e intramuscular, os morcegos apresentaram sinais de raiva e morreram entre 6 e 23 dias pós-inoculação. O vírus foi isolado de um *pool* de tecido cerebral e de glândula salivar de morcegos encontrados mortos (SULKIN; ALLEN, 1975).

Em relação à raiva de morcegos hematófagos, Silva e Souza (1968b,c) pesquisaram a presença do RABV em diferentes órgãos não nervosos, assim como fizeram Nilsson e Nagata (1975), isolando o vírus de cérebro, glândulas salivares, gordura interescapular, coração, pulmão, testículos e fetos.

O conhecimento de aspectos ligados à transmissão e patogenia da raiva nas diferentes espécies de morcegos constitui importante instrumento para o controle da enfermidade nesses animais, bem como em herbívoros, animais de estimação e humanos (SCHEFFER et al., 2007).

## 1.8 Diagnóstico da raiva

Para o diagnóstico conclusivo de um caso suspeito, além de um exame clínico detalhado e um histórico completo, juntamente com o estudo da situação epidemiológica da região é necessário realizar o diagnóstico laboratorial (LIMA et al., 2005a).

O diagnóstico laboratorial da raiva é de fundamental importância tanto para a confirmação do caso suspeito, bem como para o diagnóstico diferencial com outras encefalites. Deve ser rápido e preciso, uma vez que os resultados laboratoriais influenciam não só a decisão médica de se instituir o tratamento profilático em humanos, como também a elaboração de medidas de controle de uma possível epizootia em uma comunidade (MESLIN; KAPLAN, 1996).

Em 1903, Aldechi Negri observou a presença de corpúsculos de inclusão em tecido nervoso, apontando-os como o agente da doença (BERAN, 1994). Os corpúsculos de Negri tornaram-se achados patognômonicos para a raiva (PERL; GOOD, 1991; LÉPINE; ATANASIU, 1996). A partir de 1927, foi utilizada no diagnóstico da raiva a coloração de Sellers para a observação dessas inclusões (RUPPRECHT; HANLONE; HEMACHUDA, 2002). Esta técnica não vem sendo mais utilizada rotineiramente, visto que a OMS tem como técnicas recomendadas a imunofluorescência direta (IFD) e o isolamento viral (IV) (TIERKEL; ATANASIU, 1996).

A IFD é o teste de referência internacional, sendo considerado como “padrão ouro” tanto pela OMS quanto pela OIE (TRIMARCHI; SMITH, 2002; OIE, 2008) e é utilizado como método preferencial, em escala global (RUDD et al., 2005).

É o teste de eleição por ter uma alta facilidade operacional e fornecer resultados rápidos e acurados (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996). A sensibilidade do teste é de 99,78% quando realizada de maneira adequada e por profissionais devidamente capacitados (TEPSUMETHANON; LUMLERTDACHA; MITMOONPITAK, 1997).

Embora esta técnica apresente muitas vantagens, a utilidade da IFD fica restrita a amostras adequadamente conservadas, pois o estado da amostra é um fator que pode ser limitante para a obtenção de resultados conclusivos, principalmente em países tropicais. Além deste fator, os custos dos microscópios de

fluorescência e os conjugados podem ser também limitantes para a implantação desta técnica em países em desenvolvimento (HAMIR; MOSER, 1994).

A confirmação do resultado obtido por IFD pode ser obtida por inoculação intracerebral em camundongos recém nascidos, de até três dias de idade, ou camundongos recém desmamados de 21 dias, com uma suspensão a 20% de SNC de animais suspeitos de infecção pelo RABV. A via intracerebral é de escolha para a inoculação em camundongos pelo fato do RABV ser neurotrópico. Após a inoculação, os camundongos são observados diariamente por até 30 dias e em casos positivos, os animais adoecem e morrem geralmente em torno de 10 a 20 dias após inoculação. O SNC de todo camundongo morto é submetido à IFD para confirmação da doença (KOPROWSKI, 1996).

O isolamento do vírus por inoculação intracerebral em camundongos (IVC) apresenta um alto grau de especificidade e por sua alta sensibilidade ainda representa um meio eficiente de detecção do RABV em amostras de animais suspeitos, principalmente quando associada com a IFD, embora ocorram desvantagens como, demora para a obtenção dos resultados, altos custos operacionais e para a manutenção de animais (KOPROWSKI, 1996).

O uso de linhagens celulares para o cultivo do RABV foi descrito pela primeira vez em 1913, por Levaditi. E em 1956, Vieuchange et al. foram os primeiros a propagar o RABV em cultura de células de origem não-nervosa (PÉREZ; PAOLAZZI, 1997). Em 1958, Kissling relatou a passagem seriada de amostras de vírus fixo da raiva e de vírus de rua em células de tecido primário de rim de *hamster* (KISSLING, 1958).

Em 1975, Larghi et al. aumentaram a sensibilidade das células BHK-21 (clone 13) à infecção das amostras de vírus da raiva de rua, tendo em vista o seu uso na rotina diagnóstica. Segundo este experimento, o sistema de cultura celular apresentou uma sensibilidade maior em relação à inoculação intracerebral em camundongos. A partir de então, outros estudos surgiram com várias linhagens celulares, entre elas, as células de embrião de galinha (CER), McKoy e o neuroblastoma murino (N2A).

Outros estudos foram realizados, utilizando a linhagem celular de origem neural e comparando as técnicas de IFD, IVC e isolamento viral em cultura celular (IVCC). Os resultados indicaram que o isolamento do vírus da raiva de rua em cultura celular é no mínimo tão sensível quanto à inoculação em camundongos

(WEBSTER, 1986; RUDD; TRIMARCHI, 1987). Desta forma, a substituição do IVC pelo IVCC já tem ocorrido em alguns laboratórios de diagnóstico de raiva (WEBSTER; CASEY, 1996), principalmente em países desenvolvidos.

O IVCC apresenta algumas vantagens em relação ao IVC, como a relativa facilidade e rapidez para se realizar a técnica, a possibilidade de ser desenvolvida em um pequeno espaço físico, um custo inferior em relação ao teste de inoculação em camundongos e a obtenção do resultado em apenas 4 dias (CASTILHO et al., 2007).

Por outro lado, existem fatores que podem afetar a sensibilidade do teste de IVCC, tais como: contaminação, preservação e conservação das amostras, células com o número de passagens muito alto, qualidade dos reagentes e a temperatura da estufa. Além disso, a qualidade do conjugado é um fator extremamente importante para a realização da IFD, que permitirá a leitura da reação (WEBSTER; CASEY 1996).

As primeiras técnicas moleculares utilizadas foram fundamentadas na extração e tratamento de ácidos nucléicos e podem-se destacar a análise de DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição (REA); ribotipagem; análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (RFLP); eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE); *western blot* e *fingerprinting*. Em 1985 foi desenvolvida a reação em cadeia pela polimerase (PCR) o que permitiu a detecção das sequências de ácidos nucléicos específicos da cadeia de DNA, aumentando as chances de sucesso nas investigações moleculares. Com o passar do tempo a técnica de PCR foi sendo aperfeiçoada e hoje existem derivações desta metodologia usadas para a detecção e identificação do RABV. Podem-se destacar dentre as derivações o DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD-PCR); transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR); *nested* ou *hemi-nested* PCR (hn-PCR); PCR-ELISA, *multiplex* PCR (mPCR) e *Real Time* PCR (SAIKI et al., 1985; MULLIS; FALOONA, 1987; BLACK et al., 2000; KONEMAM et al., 2001).

Um grande avanço no diagnóstico e na tipificação de amostras de lissavírus ocorreu a partir de 1991 quando Sacramento e colaboradores desenvolveram o primeiro protocolo de RT-PCR para o RABV. Mais do que uma ferramenta de diagnóstico sensível e específica, a RT-PCR não exige isolamento viral e permite a caracterização genética do vírus, a qual é de grande importância para estudos

epidemiológicos da raiva humana e/ou animal (SACRAMENTO; BOURHY; TORDO, 1991).

Outra técnica de interesse para o diagnóstico da raiva é a *hemi-nested* RT-PCR (hnRT-PCR). É uma técnica na qual são realizados diversos ciclos de amplificação com um grupo de *primers* e o produto dessa amplificação é então, reamplificado, utilizando-se outro grupo de *primers* dirigidos para uma sequência que se encontra dentro da sequência amplificada pela primeira amplificação (KONEMAM et al., 2001). O primeiro relato de um protocolo de hnRT-PCR descrito para o RABV foi de Heaton et al. (1997), o qual foi capaz de detectar seis espécies do RABV e vírus relacionados. Estudos demonstram que a habilidade para detectar o RABV pode ser aumentada com o uso de uma segunda etapa de amplificação (KAMOLVARIN et al., 1993; HEATON et al., 1997; ALLENDORFF et al., 2010a).

A utilização das técnicas de RT-PCR, *nested* ou *hemi-nested* RT-PCR e outras técnicas baseadas em amplificação do material genético são cada vez mais descritas, mas não são recomendadas pela OMS para diagnóstico de rotina da raiva (WHO, 2005). No entanto, laboratórios com rígidos procedimentos de controle de qualidade e comprovada experiência e conhecimento, têm aplicado com sucesso as técnicas moleculares para confirmação do diagnóstico e levantamentos epidemiológicos (MCELHINNEY; FOOKS; RADFORD, 2008).

A reação de amplificação em tempo real (*Real Time* PCR) foi desenvolvida devido a uma limitação da PCR tradicional para estudos quantitativos e representa um grande avanço nos métodos moleculares que auxiliam no diagnóstico. Esta metodologia refere-se à utilização de processos químicos automatizados de monitoramento do acúmulo de produtos de PCR em uma reação em tempo real, utilizando sondas químicas fluorescentes (GLYNN et al., 2006)

Quando comparada com a PCR tradicional a PCR em tempo real confere maior reprodutibilidade e precisão devido à possibilidade de monitorar a quantidade de produto formado a cada ciclo de amplificação e de quantificar este produto durante sua fase ótima de formação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Para Rodríguez-Lázaro et al. (2007) as principais vantagens desta técnica estão na possibilidade de execução de estudos quantitativos, e não apenas qualitativos e na eliminação do risco de contaminação, visto que a reação ocorre em um sistema fechado, não havendo também a necessidade de eletroforese para visualização das amplificações.

Uma das tecnologias que se destaca na PCR em tempo real é a utilização de uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmento de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são então detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'-3' da *Taq* DNA polimerase (NOVAIS, PIRES-ALVES, 2004).

A reação com a sonda TaqMan® é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de sequências específicas (HOLLAND et al., 1991; NOVAIS, PIRES-ALVES, 2004).

Estudos utilizando as tecnologias da PCR em tempo real para detecção e quantificação do RABV estão sendo desenvolvidos. Hughes et al. (2004) descreveram um método baseado na tecnologia TaqMan® para detecção do vírus da raiva em SNC de mamíferos silvestres terrestres para a identificação de quatro espécies de lissavírus diferentes. Em 2005, Wakeley et al. descreveram um método *onestep* utilizando a tecnologia TaqMan® para distinguir as espécies I, V e VI dos lissavírus. Também foi desenvolvida uma comparação entre a técnica de RT-PCR convencional e *Real Time* RT-PCR para o diagnóstico *ante-mortem* utilizando amostras de saliva (NAGARAJ et al., 2006).

Em 2010, Carneiro et al. pesquisaram a presença de RABV em órgãos e tecidos de morcegos hematófagos naturalmente infectados e quantificaram as concentrações de vírus por meio de *Real Time* RT-PCR *onestep*. Szanto et al. (2011) descreveram um método de *Real Time* RT-PCR quantitativo para a detecção de RABV em amostras de SNC de guaxinim que foram diagnosticados negativos pela IFD.

Para tanto, este estudo visa analisar a questão do diagnóstico da raiva em morcegos frugívoros, do gênero *Artibeus*, naturalmente infectados. Como já citado, os morcegos encontrados no Brasil pertencem à subordem *microchiroptera* e geralmente são animais de pequeno porte. Por isso, em muitas situações há limitações em se conseguir material suficiente para a realização do diagnóstico laboratorial da raiva. Nessa circunstância, o uso de órgãos, como glândulas salivares, bexigas, pulmões entre outros, poderiam representar uma alternativa para o diagnóstico. Como a concentração de vírus nestes órgãos pode ser pequena, as

técnicas de diagnóstico convencionais poderiam não identificar ou isolar o vírus. Assim, o uso de técnicas moleculares, com amplificação do material genético, e posterior detecção, contribuiriam com um diagnóstico mais preciso e adequado. Além disso, o desenvolvimento desse trabalho contribuiu para a implantação e aplicação da técnica de *Real Time* RT-PCR no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur sendo de grande importância também para o diagnóstico *ante-mortem*.

# OBJETIVOS

οβφετιϖοσ

# 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Detectar o vírus da raiva em lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* pelas técnicas de RT-PCR, *Hemi-Nested* RT-PCR e *Real Time* RT-PCR e
- Comparar as técnicas de RT-PCR, *Hemi-Nested* RT-PCR e *Real Time* RT-PCR em relação à sensibilidade e à proporção de positivos detectados.

# ματεριασλ ε μ⌠τοδοσ----------MATERIAL E MÉTODOS

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

Devido à utilização de animais nos procedimentos deste estudo o projeto foi submetido à Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sendo aprovado em 20 de fevereiro de 2008 (Protocolo nº1275/2007).

## 3.1 Amostras de vírus

Foram utilizados como controles positivos, vírus fixo padrão para as reações de isolamento viral em cultura de células de neuroblastoma murino (N2A), RT-PCR e hnRT-PCR, e vírus de campo para a reação de *Real Time* RT-PCR.

### 3.1.1 Vírus Fixo Padrão

O vírus fixo utilizado como padrão positivo nas extrações de RNA total e na técnica de isolamento viral em cultura de células foi o *Challenge Virus Standard* (CVS), amostra CVS/31, lote IP 05/10, procedente do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fio Cruz, adaptado em cérebro de camundongo, com título de $10^7$ $DLIC_{50}$/0,03mL.

### 3.1.2 Vírus de campo

Para controle positivo das reações de *Real Time* RT-PCR foi selecionada a amostra de RABV 4255V/10, proveniente de morcego do gênero *Artibeus* e isolada em SNC de camundongos.

#### *3.1.2.1 Titulação do vírus de campo*

Foram selecionados três tubos tipo *eppendorff*® contendo cérebros de camundongos inoculados com a amostra 4255V/10. Fez-se um *pool* dessas amostras, o qual foi pesado e triturado com auxílio de graal e pistilo estéreis. Foram feitas diluições seriadas do *pool* na razão 10, de $10^{-2}$ até a diluição $10^{-6}$, e foram inoculadas em grupos de 10 camundongos albinos suíços, com 21 dias de idade, em doses de 0,03mL pela via intracerebral (IC). Os camundongos inoculados foram observados durante 30 dias para a verificação da presença de sinais clínicos de raiva. Os animais mortos a partir do 5º dia após a inoculação e que manifestaram sinais característicos da doença foram considerados positivos. A Dose Letal 50% (DL50) foi calculada pelo método de Reed e Müench (1938) e expressa em $\log_{10}DLIC_{50}$/0,03mL.

### 3.1.3 Morcegos

Dos morcegos recebidos pelo IP-SP, para o diagnóstico da raiva, enviados por profissionais da área da saúde ou da agricultura e por moradores dos municípios de São Paulo, foram selecionados 30 espécimes que apresentaram diagnóstico positivo na técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) e que foram classificados, segundo a chave de identificação descrita por Vizotto e Taddei (1973), como pertencentes ao gênero *Artibeus* (Quadro 2). Os morcegos foram mantidos a -20ºC até o momento de sua utilização.

| AMOSTRA | ESPÉCIE | PROCEDÊNCIA |
|---|---|---|
| 1110V/09 | *Artibeus fimbriatus* | Ribeirão Preto |
| 2242V/09 | *Artibeus fimbriatus* | Ribeirão Preto |
| 2470V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 2734V/09 | *Artibeus planirostris* | Ribeirão Preto |
| 2939V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3017V/09 | *Artibeus fimbriatus* | Ribeirão Preto |
| 3173V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3174V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3175V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3401V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3405V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3406V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3852V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3933V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3970V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 4506V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 4606V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 4607V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 4925V/09 | *Artibeus lituratus* | Campinas |
| 4987V/09 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 5059V/09 | *Artibeus lituratus* | Assis |
| 5610V/09 | *Artibeus fimbriatus* | Jales |
| 7204V/09 | *Artibeus obscurus* | Ribeirão Preto |
| 2202V/10 | *Artibeus* sp | Ribeirão Preto |
| 3015V/10 | *Artibeus lituratus* | Jales |
| 3088V/10 | *Artibeus lituratus* | Campinas |
| 3208V/10 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 3848V/10 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |
| 5378V/10 | *Artibeus lituratus* | Campinas |
| 5731V/10 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto |

Quadro 2 – Relação dos isolados de RABV de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus,* espécie e procedência dos mesmos, nos anos de 2009 e 2010 - São Paulo – 2011

## 3.2 Preparo das Suspensões

Serão descritas as etapas realizadas para a obtenção do lavado cerebral, colheita dos órgãos e conteúdo fecal além do preparo das suspensões.

### 3.2.1 Lavado da Calota Craniana

Pelo fato dos morcegos utilizados neste estudo já terem tido o SNC utilizado para a realização da IFD, exame de rotina do Laboratório, foi utilizado o lavado da calota craniana. Para isso, após o descongelamento dos morcegos foi realizada a

raspagem da calota craniana com auxílio de ponteiras estéreis e em seguida foram adicionados 1000µL de diluente, composto de solução fisiológica a 0.85%, adicionada de 2% de Soro Fetal Bovino (SFB), isento de anticorpos antivírus da raiva e 0,1% de garamicina. A solução contendo o lavado cerebral foi acondicionada em tubo do tipo *eppendorff*® RNAse *free* (Figura 1) e mantida a -80ºC até o momento da sua utilização. Todo o procedimento foi realizado em Cabine de Segurança Biológica – Classe IIA (CSB).

Depois de descongelada, a suspensão foi centrifugada a 12000xg a 4ºC por 5 minutos. Foi reservado o volume de 130µL para o isolamento do vírus em cultura de células, o restante desta suspensão foi homogeneizada e o volume de 300µL foi separado para a extração do RNA total por método com uso de *TRIzol*®.

Figura 1 – Etapas da obtenção do lavado cerebral. **A**. Raspagem da calota craniana com auxílio de ponteira. **B**. Lavagem da calota craniana com diluente. **C**. Lavado Cerebral em tubo tipo *eppendorff*® RNAse *free*

### 3.2.2 Órgãos e conteúdo fecal

Após a lavagem da calota craniana, cada morcego foi fixado, com auxílio de agulhas estéreis, em isopor recoberto com papel alumínio e a parte ventral do animal foi descontaminada com álcool 70%. Foi providenciado um *kit* composto por um coletor feito de papel alumínio, um bisturi estéril e uma pinça que foram utilizados para cada órgão e conteúdo fecal retirados, com o intuito de diminuir possíveis resíduos de material genético como fontes de contaminação (Figura 2). Foram retirados glândulas salivares (submandibular), pulmões, rins, bexiga e todo o intestino (delgado e grosso). O intestino foi raspado com auxílio de pinças e o conteúdo fecal foi recolhido.

Os órgãos e o conteúdo fecal foram pesados, triturados com auxílio de bisturi, macerados com a tampa do bisturi e acrescentados de diluente. Para serem utilizados no isolamento viral em cultura de células N2A e submetidos às técnicas de Transcrição Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR), *hemi-nested* RT-PCR (hnRT-PCR) e *Real Time* RT-PCR, foi realizada uma diluição 1:10 para as glândulas, rins, pulmões e conteúdo fecal, e para a bexiga, uma diluição 1:20 para que fosse possível obter o volume necessário para realizar todas as reações. As suspensões foram mantidas a 4ºC por 30 minutos e centrifugadas a 800xg, por 30 minutos a 4ºC. As suspensões referentes ao conteúdo fecal foram filtradas com auxílio de seringa de 5mL e filtro *Millex*® de 33mm, com porosidade de 0.45µm. As suspensões foram aliquotadas em tubos tipo *eppendorff*®*,* os que seriam utilizados nas técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR em tubos RNAse *free* e o restante da suspensão em tubo *eppendorff*® comum, e armazenados a -80ºC até o momento do uso. Todos os materiais utilizados foram preparados previamente e submetidos à radiação ultravioleta (UV) por pelo menos 15 minutos sendo o procedimento realizado em CSB.

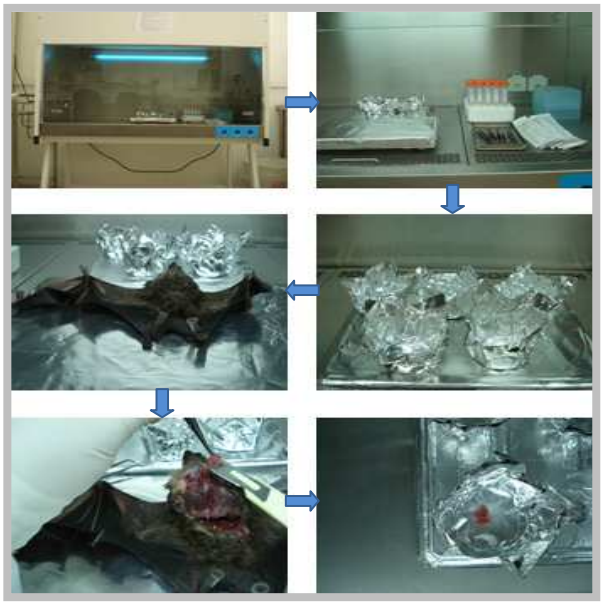

Figura 2 – Etapas realizadas para colheita dos órgãos e conteúdo fecal. Material preparado previamente e submetido à radiação UV. O procedimento foi realizado em CSB - classe IIA, com coletores preparados em papel alumínio, colocados em gelo e posterior coleta dos órgãos e conteúdo fecal

## 3.3 Tipificação Antigênica

Foi realizada a tipificação antigênica pela técnica de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais conforme protocolo descrito por De Mattos e De Mattos (1998) com algumas modificações. Decalques do SNC de camundongos inoculados com vírus isolados de SNC dos morcegos foram feitos em 4 lâminas contendo 2 campos de leitura. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos e fixadas em acetona PA a -20ºC *overnight*, e após a retirada da acetona foram colocadas em estufa 37ºC por 15 minutos para secarem. Foi utilizado o painel reduzido contendo 8 anticorpos monoclonais (1, 4, 9, 10, 12, 15, 18 e 19), procedente do *Center of Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta (EUA). Colocaram-se 15µL da diluição de trabalho de cada um dos anticorpos monoclonais em cada decalque. As lâminas foram então incubadas a 37ºC por 30 minutos em câmara úmida. Lavou-se cada lâmina com solução salina tamponada (PBS) 0,01 molar e pH 7,6, com auxílio de pisseta. Cada decalque foi lavado duas vezes. As lâminas foram então mantidas submersas em PBS por 10 minutos e após este tempo, foram secas. Em cada decalque foram colocados 25µL de conjugado anticamundongo diluído de acordo com título previamente estabelecido. As lâminas então foram incubadas novamente a 37ºC por 30 minutos e a lavagem foi realizada conforme procedimento anterior. Após a secagem das lâminas foi adicionada glicerina tamponada pH 8,5 e lamínulas. A leitura foi realizada em microscópio LEICA® DML, de fluorescência, com lâmpada HBO-50, com aumento de 400X. Os resultados foram então determinados segundo o painel reduzido de padrões das diferentes variantes antigênicas conforme apresentado no quadro 3.

| Reservatório | Padrão de reatividade com os seguintes AcMs | | | | | | | | Variantes Antigênicas |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | C1 | C4 | C9 | C10 | C12 | C15 | C18 | C19 | |
| Cão / Mangusto | + | + | + | + | + | + | - | + | 1 |
| Cão | + | + | - | + | + | + | - | + | 2 |
| *Desmodus rotundus* | - | + | + | + | + | - | - | + | 3 |
| *Tadarida brasiliensis* | - | + | + | + | + | - | - | - | 4 |
| *Desmodus rotundus* Venezuela | - | + | V | + | + | V | - | V | 5 |
| *Lasiurus cinereus* | V | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| Raposa do Arizona | + | + | + | - | + | + | - | + | 7 |
| Camgambá Centro/Sul EUA | - | + | + | + | + | + | + | + | 8 |
| *Tadarida brasiliensis* México | + | + | + | + | + | - | - | - | 9 |
| Cangambá da Baixa Califórnia/ México | + | + | + | + | - | + | - | + | 10 |
| *Desmodus rotundus* México | - | + | + | + | - | - | - | + | 11 |
| CVS/SAD/PV/ERA | + | + | + | + | + | + | + | + | Amostra laboratorial |

**(+) reação positiva; (-) reação negativa; (V) reatividade variável.**
Fontes: (Diaz, Rodriguez, Smith, 1994; Delpietro et al., 1997; De Mattos CA, De Mattos CC, 1998).
Quadro 3 - Padrão de reações do painel de anticorpos monoclonais do CDC para caracterização das variantes antigênicas encontradas na América Latina

## 3.4 Isolamento Viral em Cultura de Células (IVCC)

Serão descritos as etapas desde a manutenção da cultura celular de neuroblastoma murino (N2A) até a realização da técnica de isolamento viral em cultura de células.

### 3.4.1 Cultura Celular

A cultura de células utilizada foi a N2A, proveniente da *American Type Culture Collection, Rockville, Md*. (ATCC), e foi armazenada em nitrogênio líquido

até o momento do uso. As monocamadas estacionárias da linhagem N2A foram mantidas a 37ºC em frascos de poliestireno por no máximo 4 dias. Para a manutenção da cultura celular, as células foram lavadas e dispersas com 5mL de tripsina e ressuspendidas com 4mL de Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM) adicionado de 10% de SFB estéril. Os 4mL da suspensão celular foram distribuídos em quatro novas garrafas de 25cm (1mL em cada garrafa), o volume foi completado com 9mL de MEM acrescido de 10% de SFB estéril e foram adicionados 10µL de aminoácidos não essenciais. Todo o procedimento foi realizado em CSB. Após o procedimento os frascos foram mantidos em estufa a 37ºC até o momento de sua utilização na técnica ou até o novo repique em três ou quatro dias.

### 3.4.2 Isolamento Viral em Cultura de Células

O IVCC foi realizado conforme Webster e Casey (1996) com modificações feitas por Castilho et al. (2007). As suspensões foram descongeladas e distribuídas em placas de cultura celular de fundo chato, com 96 orifícios da marca *Costar*® ou similar. Para cada suspensão o teste foi feito em triplicata, sendo que em cada orifício, colocaram-se 40µL da suspensão, e adicionaram-se 160µL de MEM acrescido de 10% de SFB, gentamicina e aminoácidos não essenciais. Após a homogeneização, acrescentaram-se 100µL, de suspensão de células N2A contendo 5 X $10^5$ células, em cada orifício. As placas foram incubadas em estufa de $CO_2$ a 5%, a 37ºC por 96 horas. Aspirou-se o sobrenadante com bomba a vácuo e fixaram-se as células com 200µL de acetona 80%, a 4ºC, e mantendo-se as placas por 15 minutos em banho de gelo. As placas foram secas e acrescentaram-se 40µL de conjugado policlonal antinucleocapsídeo de RABV, marcado com isotiocianato de fluoresceína, produzido a partir de soro de coelho hiperimune pelo Instituto Pasteur de São Paulo (IP-SP) (CAPORALE et al., 2009), lote IP 02/07 em diluição 1:220 em PBS contendo 0,001% de azul de evans, incubando-se, novamente, as placas a 37$^o$C, por 1 hora. Desprezou-se o sobrenadante, por inversão das placas e estas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 molar e 3 vezes em água tipo III (osmose reversa - *RiOs 5/8/16 Water Purification Systems*®). Após secarem-se as placas, colocou-se glicerina tamponada pH 8,5, para leitura. A leitura da reação foi realizada

em microscópio invertido LEICA® DML, de fluorescência, com lâmpada HBO-50, com aumento de 200X. Seguiu-se o seguinte protocolo: a leitura foi realizada em cada orifício e tendo observado pelo menos uma célula infectada o orifício foi considerado positivo, os orifícios sem células infectadas foram considerados negativos. Se pelo menos um orifício da triplicata fosse positivo a suspensão foi considerada positiva.

### 3.5 Extração do RNA Total pelo protocolo do *TRIzol*®

Para a técnica de extração utilizou-se o protocolo do *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*®). Foram utilizados 300µL de cada suspensão, sendo acrescentado 1,0mL de *TRIzol*® em cada tubo contendo a suspensão, homogeneizado com o auxílio do agitador de tubos por aproximadamente 20 segundos, após a agitação foi mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Acrescentaram-se 200µL de clorofórmio no tubo contendo o *TRIzol*® e a amostra. O tubo foi então homogeneizado e mantido por 3 minutos em temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 12000xg e 4ºC. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida, com auxílio de micropipeta, para outro tubo tipo *eppendorff*® de 1,5mL. Para a precipitação do RNA, álcool isopropílico foi acrescido no mesmo volume da fase aquosa retirada anteriormente. Após 10 minutos em temperatura ambiente os materiais foram centrifugados a 12000xg, por 10 minutos, a 4ºC, e em seguida o sobrenadante foi desprezado pela inversão do tubo, ficando o precipitado no fundo do tubo. Posteriormente, o precipitado foi lavado com 1,0mL de etanol 75%, centrifugado a 12000xg, por 5 minutos, a 4ºC, o álcool foi desprezado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente, e finalmente, ressuspendido em 25µL de água livre de DNAse/RNAse. Em cada extração foi acrescentado um controle negativo, utilizando 300µL de água destilada *UltraPure*® livre de RNAse/DNAse (*Invitrogen*®) e um controle positivo, sendo amostras de vírus fixo padrão (CVS) em SNC de camundongos, utilizada também em suspensão. Todo o procedimento foi realizado em CSB. Os tubos contendo o RNA total extraído foram colocados em termobloco a 56ºC por 10 minutos e após foram acondicionados à temperatura de -20ºC até o momento da sua utilização.

## 3.6 Quantificações

Para este estudo foram realizadas quantificações do RNA total e do cDNA.

### 3.6.1 RNA Total

Para a quantificação do RNA total foi utilizado o *Quant-iT RNA Assay Kit - Invitrogen*®. Para cada lote de amostras a serem quantificadas utilizaram-se dois padrões para a calibração do equipamento. Preparou-se um *mix* contendo 199µL de *buffer* e 7µL de reagente de quantificação (que possui um fluoróforo para marcação na dupla fita) para cada amostra e padrões. O *mix* foi distribuído em tubos tipo *eppendorff*® de 0,5mL e para cada amostra foram colocados 199µL e para os padrões 190µL. Foi então adicionado 1µL de RNA total extraído de cada amostra e 10µL de cada padrão. Com o auxílio do agitador de tubos, as suspensões foram homogeneizadas e centrifugadas. As suspensões foram mantidas em temperatura ambiente por 2 minutos e a leitura foi realizada em fluorímetro portátil da marca *Qubit*®. Os resultados foram expressos em ng/mL e µg/mL. Após a leitura as amostras que ficaram com resultados maiores que a capacidade total do *kit* foram submetidas ao *Quant-iT RNA Broad Range Assay Kit - Invitrogen*® que é específico para amostras que possuem grandes concentrações de RNA. O procedimento para quantificação foi o mesmo descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em µg/mL.

### 3.6.2 cDNA

Para a quantificação do cDNA foi utilizado o *Quant-iT ssDNA Assay Kit - Invitrogen*®. Para cada lote de amostras a serem quantificadas utilizaram-se dois padrões para a calibração do equipamento. Preparou-se um *mix* contendo 199µL de *buffer* e 7µL de reagente de quantificação para cada amostra e padrões. O *mix* foi distribuído em tubos tipo *eppendorff*® de 0,5mL e para cada amostra foram colocados 199µL e para os padrões 190µL. Foi então adicionado 1µL de cDNA de cada amostra e 10µL de cada padrão. Com o auxílio do agitador de tubos, as suspensões foram homogeneizadas e centrifugadas. As suspensões foram mantidas em temperatura ambiente por 2 minutos e a leitura foi realizada em fluorímetro portátil da marca *Qubit*®. Os resultados foram expressos em µg/mL.

## 3.7 *Hemi-Nested* RT-PCR

Para evitar contaminações, antes de cada etapa das reações, foi realizada a desinfecção do fluxo laminar com álcool 70% e UV durante 15 minutos. Além disso, todo o preparo dos reagentes foi realizado em uma sala exclusiva para esse fim e a adição de RNA de todas as amostras foi realizada em outra sala.

### 3.7.1 Primers

Para a detecção do RABV, foram utilizados três *primers* específicos, descritos por Orciari et al. (2001), direcionados à região do gene codificador da proteína N (Quadro 4), considerado um gene altamente conservado. Utilizou-se primeiramente, o par de *primers* 21G e 304 que formam um *amplicon* de 1479 pb (pares de bases). Esse par de *primers* foi utilizado para a RT e para o PCR. O *primer* interno 504 em associação com o *primer* 304, formam um *amplicon* de 248 pb e essa associação foi utilizada para a reação de hnRT-PCR.

| Primer | Sentido | Sequência (5'-3') | Região |
|---|---|---|---|
| 21G | senso | ATGTAACACCTCTACAATG | 55-73 |
| 304 | antissenso | TTGACGAAGATCTTGCTCAT | 1514-1533 |
| 504 | senso | TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT | 1286-1317 |

Quadro 4 - Relação de *primers* utilizados na RT-PCR e hnRT-PCR para a identificação do RABV direcionados à região do gene codificador da proteína N e as respectivas regiões de hibridização

### 3.7.2 Transcrição Reversa - Síntese de DNA complementar

A transcrição reversa foi realizada para os 30 animais e seus respectivos órgãos, lavado cerebral e conteúdo fecal, totalizando 180 amostras. Também foi realizada a transcrição reversa do vírus de campo utilizado como controle positivo da reação de *Real Time* RT-PCR. Para cada tubo de 200µL, foi acrescentado 1µL de *primer* senso (21G) e 1µL de *primer* antissenso (304) na concentração de 0,5µM e foi adicionado 3µL do RNA total extraído anteriormente. Os tubos foram levados ao termociclador e submetidos a uma ciclagem a 70ºC por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados a cada tubo 5µL do *mix* preparado com a seguinte combinação de reagentes: 1X *ImProm-II Reaction Buffer*, 0,5mM de cada dNTP (trifostato de desoxinucleosídeo), 3mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), 200U da enzima *ImProm®-II Reverse Transcriptase* (*Invitrogen®*), 40U da enzima *RNAse OUT™* e água destilada *UltraPure® (Invitrogen®)*. Em seguida, os tubos contendo os reagentes, *primers* e RNA foram incubados no termociclador a 42ºC, por 60 minutos. Ao final da reação, o cDNA de cada amostra foi armazenado à temperatura de -20ºC.

### 3.7.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Após a obtenção do cDNA, foi realizada a reação de PCR. Em tubos de 500µL para microcentrífuga, foram acrescentados 90µL do *mix* contendo os reagentes: 1x PCR *Buffe*r (*Invitrogen*®), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* senso e antissenso (21G e 304), 2,5mM de $MgCl_2$, 2,5U de *Taq DNA polimerase* (*Invitrogen*®) e 24,5µL de água *UltraPure*® (*Invitrogen*®). Após o preparo dos reagentes, 10µL de cDNA foram adicionados, totalizando um volume final de 100µL.

Em seguida, as reações foram incubadas no termociclador e submetidas aos ciclos descritos no quadro 5.

| Ciclo | Temperatura (ºC) | Tempo |
|---|---|---|
| 1 ciclo | 94 ºC - Denaturação | 5 minutos |
| 35 ciclos | 94 ºC - Denaturação | 45 segundos |
| 35 ciclos | 55 ºC Anelamento | 45 segundos |
| 35 ciclos | 72 ºC Extensão | 2 minutos |
| 1 ciclo | 72 ºC Extensão | 10 minutos |

Quadro 5 - Ciclos da reação de PCR e hnRT-PCR para amplificação do gene *N* do RABV isolado de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos *Artibeus* spp. naturalmente infectados

Após o término os produtos da PCR, tanto das amostras como dos controles positivo e negativo, foram submetidos à eletroforese, sendo que 9µL da reação com 1µL de corante (10X *Blue Juice - Invitrogen*®) foram aplicadas em gel de agarose a 1%. O gel foi preparado com 50mL de tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) e 0,5 gramas de agarose, fundida, aquecendo-se por 2 minutos em forno micro-ondas. A agarose líquida foi colocada em um suporte de gel com pente de 15 dentes. Após a solidificação o gel foi colocado dentro de uma cuba com tampão de corrida - TBE 1X (0,1M de Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA) contendo brometo de etídeo na concentração de 0,45mg/mL. O pente foi retirado e as amostras aplicadas nos poços formados. No primeiro e último poço, foram aplicados 5µL do marcador de peso molecular (100pb *DNA Ladder - Invitrogen*®). A visualização foi feita em

transiluminador de luz UV. Os géis foram digitalmente fotografados em sistema de fotodocumentação *UV White Darkroom*, modelo GDS-7500.

Os produtos da PCR foram armazenados em freezer -20ºC específico para o armazenamento de produtos amplificados.

### 3.7.4 Hemi-Nested PCR (hnRT-PCR)

Para a realização deste procedimento, foram utilizados tubos de 500µL para microcentrífuga e em cada tubo foram distribuídos 90µL de *mix* contendo 1x PCR *Buffe*r (*Invitrogen*®), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* senso e antissenso (504 e 304), 2,5mM de $MgCl_2$, 2,5U de *Taq DNA polimerase* (*Invitrogen*®), 49µL de água *UltraPure*® (*Invitrogen*®). Após o *mix* ser distribuído nos tubos, 10µL do produto da PCR foram adicionados, totalizando um volume final de 100µL.

As reações de hnRT-PCR foram incubadas em termociclador e submetidas aos ciclos descritos no quadro 5.

Da mesma forma que na PCR, as reações foram submetidas à eletroforese, sendo que 9µL da reação e 1µL de corante foram aplicados em gel de agarose a 1%, em *buffer* com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados digitalmente conforme descrito anteriormente.

Os produtos da hnRT-PCR foram armazenados em freezer à temperatura de -20ºC específico para o armazenamento de produtos amplificados.

## 3.8 *Real Time* RT-PCR

A seguir são descritas as etapas para a realização da técnica de *Real Time* RT-PCR.

### 3.8.1 Síntese dos primers e sonda para amplificação e detecção do gene N da nucleoproteína do RABV

Para determinar a área mais adequada do gene N do RABV para a síntese dos *primers* e sonda foram utilizadas 35 sequências genéticas recuperadas do GenBank, que fizeram parte do estudo de Fahl (2009) (Quadro 6). As sequências genéticas escolhidas foram sintetizadas a partir de amostras de morcegos hematófagos isoladas de bovinos e de morcegos do gênero *Artibeus*, classificadas como AgV3. As sequências genéticas foram alinhadas utilizando o programa *Bioedit* v.5.0.9 (HALL, 1999) e a partir deste alinhamento de nt foi escolhida uma área conservada e comum a todas as sequências com 499 nt e posicionada entre os nt 418 e 916 em relação ao genoma da amostra fixa *Pasteur Virus* (PV) (número de acesso do GenBank M13215). A partir desta área com 499 nt foi gerada uma sequência consenso a qual foi enviada para *Applied Biosystems*™ para a análise e escolha do local mais apropriado para a síntese dos *primers* e da sonda.

Após a análise ser realizada foi sintetizado o par de *primers* e uma sonda *TaqMan*® MGB marcada com corante fluorescente FAM. O posicionamento das sequências dos *primers* e da sonda, em relação a amostra fixa PV, e as suas designações estão descritas no quadro 7.

| Amostra | Hospedeiro original | Procedência | Nomenclatura do isolado |
|---|---|---|---|
| 3250/05 | *Artibeus* spp. | Catanduva | 05/Art3250Catanduva |
| 3598/05 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto | 05/Art3598RibeirãoPreto |
| 3738/05 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto | 05/Art3738RibeirãoPreto |
| 4578/05 | *Artibeus lituratus* | Monte Mor | 05/Art4578MonteMor |
| 4850/05 | *Artibeus* spp. | Ribeirão Preto | 05/Art4850RibeirãoPreto |
| 4932/05 | *Artibeus* spp. | Ribeirão Preto | 05/Art4932RibeirãoPreto |
| 5459/05 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto | 05/Art5459RibeirãoPreto |
| 6734/05 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto | 05/Art6734RibeirãoPreto |
| 6956/05 | *Artibeus* spp. | Ribeirão Preto | 05/Art6956RibeirãoPreto |
| 7045/05 | *Artibeus* spp. | Ribeirão Preto | 05/Art7045RibeirãoPreto |
| 7270/05 | *Artibeus lituratus* | Paraguaçú Paulista | 05/Art7270ParaguaçúPaulista |
| 7436/05 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto | 05/Art7436RibeirãoPreto |
| 7547/05 | *Artibeus lituratus* | Paraguaçú Paulista | 05/Art7547ParaguaçúPaulista |
| 7848/05 | *Artibeus* spp. | Marília | 05/Art7848Marília |
| 8456/05 | *Artibeus lituratus* | Paraguaçú Paulista | 05/Art8456ParaguaçúPaulista |
| 8639/05 | *Artibeus lituratus* | Marília | 05/Art8639Marília |
| 8688/05 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto | 05/Art8688RibeirãoPreto |
| 8921/05 | *Artibeus lituratus* | Ribeirão Preto | 05/Art8921RibeirãoPreto |
| 10509/05 | *Artibeus* spp. | Ribeirão Preto | 05/Art10509RibeirãoPreto |
| 11206/05 | *Artibeus lituratus* | Paraguaçú Paulista | 05/Art11206ParaguaçúPaulista |
| 2196/04 | Bovino | Altinópolis | 04/Bov2196Altinópolis |
| 3441/04 | Bovino | Santo Antônio da Alegria | 04/Bov3441SantoAntôniodaAlegria |
| 3833/04 | Bovino | Santo Antônio da Alegria | 04/Bov3833SantoAntôniodaAlegria |
| 4698/04 | Bovino | Santo Antônio da Alegria | 04/Bov4698SantoAntôniodaAlegria |
| 6930/04 | Bovino | Santo Antônio da Alegria | 04/Bov6930SantoAntôniodaAlegria |
| 8967/04 | Bovino | Altinópolis | 04/Bov8967Altinópolis |
| 11044/04 | Bovino | Santo Antônio da Alegria | 04/Bov11044SantoAntôniodaAlegria |
| 11817/04 | Bovino | Santo Antônio da Alegria | 04/Bov11817SantoAntôniodaAlegria |
| 11818/04 | Bovino | Santo Antônio da Alegria | 04/Bov11818SantoAntôniodaAlegria |
| 451/05 | Bovino | Altinópolis | 05/Bov451Altinópolis |
| 2579/05 | Bovino | Santo Antônio da Alegria | 05/Bov2579SantoAntôniodaAlegria |
| 3924/05 | Bovino | Altinópolis | 05/Bov3924Altinópolis |
| 6314/05 | Bovino | Garça | 05/Bov6314Garça |
| 7535/05 | Bovino | Platina | 05/Bov7535Platina |
| 10339/05 | Bovino | Altinópolis | 05/Bov10339Altinópolis |

Fonte: Fahl, 2009

Quadro 6 - Relação dos isolados de RABV de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionadas a morcegos hematófagos, utilizados para a escolha da área adequada para síntese dos *primers* e da sonda, identificando o hospedeiro original, município onde foram encontrados e nomenclatura dos isolados do estudo realizado por Fahl (2009)

| ***Primers*/Sonda** | **Sentido** | **Sequência (5'-3')** | **Região** |
|---|---|---|---|
| K1 | senso | GAGACAGCCCCCTTTGCA | 590-607 |
| K2 | antissenso | GCCAGGAATCTGAAATTTGGTATGG | 666-690 |
| KP | - | ACGACCCACAAAATGT | 635-650 |

Quadro 7 – *Primers* e sonda utilizados para a identificação do RABV na reação de *Real Time* RT-PCR e suas respectivas regiões de hibridização

### 3.8.2 Controle de Amplificação

Para evitar resultados falso-negativos nas reações de *Real Time* RT-PCR foi utilizado o *TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents* - 4308323 como controle de amplificação. O *kit* do controle interno é composto de DNA exógeno com seus respectivos *primers* e sonda, marcada com corante fluorescente VIC, e um bloqueador desse controle.

### 3.8.3 Reação de Real Time RT-PCR

Para a realização da reação de *Real Time* RT-PCR, foi utilizada placa *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate*, e em cada orifício foram distribuídos 20µL de *mix* contendo 12,5µL de 2X *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 1,25µL do ensaio 20X, contendo os *primers* (K1 e K2) e a sonda (KP), 2,5µL do 10X *Exo* IPC *Mix*, 0,5µL do 50X *Exo* IPC DNA e 3,25µL de água *UltraPure®* (*Invitrogen®*). Após o *mix* ser distribuído nos orifícios, 5µL de cDNA de cada amostra foram adicionados, totalizando um volume final de 25µL. Em cada placa também foram adicionados pelo menos 2 controles positivos (cDNA da amostra 4255V/10), 2 controles negativos (água ultrapura) e 2 controles negativos com bloqueador do IPC.

Para o controle negativo com bloqueador do IPC foram distribuídos em 2 orifícios 20µL de *mix* contendo 12,5µL de 2X *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 1,25µL do ensaio 20X, contendo os *primers* e a sonda, 2,5µL do 10X *Exo* IPC *Mix*, 2,5µL do 10X *Exo* IPC *Block*, 0,5µL do 50X *Exo* IPC DNA e 0,75µL de água *UltraPure®* (*Invitrogen®*). Após o *mix* ser distribuído nos orifícios, 5µL de água ultrapura foram adicionados.

A placa foi então centrifugada e colocada no *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* e submetida aos ciclos descritos no quadro 8. Os resultados foram analisados no *7500 Software v.2.0.5.*

Os resultados das reações de *Real Time* RT-PCR foram analisados por meio de dois tipos de gráficos sendo o primeiro o de presença e ausência do RABV e o

segundo o gráfico de amplificação (*amplification plot*) no qual são observadas as curvas de amplificações das amostras.

| Ciclo | Temperatura (ºC) | Tempo |
|---|---|---|
| 1 ciclo | 60 ºC | 1 minuto |
| 1 ciclo | 95 ºC | 10 minutos |
| 40 ciclos | 95 ºC | 15 segundos |
| 40 ciclos | 60 ºC | 1 minuto |

Quadro 8 – Ciclos da reação de *Real Time* RT-PCR para amplificação do gene *N* do RABV isolado de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados

### 3.8.4 Teste de Interferência do lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal na amplificação do IPC

Para a realização do teste de interferência na amplificação do IPC pelo lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal utilizados neste estudo, foi retirado do *mix* da reação o ensaio contendo os *primers* e a sonda específicos para o RABV. Foi utilizada placa *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate*, e em cada orifício foram distribuídos 20µL de *mix* contendo 12,5µL de 2X *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 2,5µL do 10X *Exo* IPC *Mix*, 0,5µL do 50X *Exo* IPC DNA e 4,5µL de água *UltraPure®* (*Invitrogen®*). Após o *mix* ser distribuído nos orifícios, 5µL de cDNA de cada amostra (lavado cerebral, glândulas salivares, bexiga, rins, pulmões e conteúdo fecal) foram adicionados, totalizando um volume final de 25µL. Em cada placa também foram adicionados 2 controles positivos (cDNA da amostra 4255V/10), 2 controles negativos (água ultrapura) e 2 controles negativos com bloqueador do IPC. O *mix* dos controles positivos foi feito conforme o item 3.8.3, contendo o ensaio 20X.

A placa foi então centrifugada e colocada no *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* e submetida aos ciclos descritos no quadro 7. Os resultados foram analisados no *7500 Software v.2.0.5.* Para a análise, o ciclo de amplificação do controle negativo foi comparado com o ciclo do início da amplificação das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal.

## 3.9 Determinação do limiar de detecção da amostra de campo

Neste estudo, utilizou-se o termo limiar de detecção como sendo a quantidade mínima de RNA-alvo para a geração de bandas visíveis nas técnicas de RT-PCR e hnRT-PCR e sinais fluorescentes na técnica de *Real Time* RT-PCR.

Para avaliar a sensibilidade analítica das reações de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR foi realizado o teste de limiar de detecção. A partir de suspensões a 20% (peso/volume) da amostra de campo 4255V/10 foram realizadas diluições decimais seriadas de $10^{-1}$ até $10^{-6}$, utilizando diluente composto de solução fisiológica, SFB e antibiótico como descrito no item 3.2.1. Como controle positivo, foi utilizado o vírus padrão CVS para as técnicas de RT-PCR e hnRT-PCR e amostra de vírus de campo (4255V/10) para o *Real Time* RT-PCR e como controle negativo utilizou-se água ultrapura.

A extração de RNA foi realizada para cada diluição e o procedimento foi o mesmo descrito no item 3.5. O RNA extraído foi posteriormente submetido à RT, PCR, reação de hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR seguindo-se os mesmos protocolos descritos nos itens 3.7.2; 3.7.3; 3.7.4 e 3.8.3 respectivamente.

## 3.10 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA foi feito apenas das amostras de lavado da calota craniana, pois esta etapa foi realizada simplesmente para a confirmação da identidade genética das sequências.

### 3.10.1 Purificação do produto da hnRT-PCR a partir do gel

Para a purificação do produto da hnRT-PCR foi utilizado o *GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare®*). Foi preparado um gel de agarose a 1% e para cada amostra foram aplicados 90µL do produto da hnRT-PCR corados

com 10X *Blue Juice - Invitrogen®*. Adicionaram-se 5µL de *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®)* nos poços das extremidades. A cuba eletroforética foi ligada e o resultado da corrida foi observado em transiluminador de luz UV, sendo o gel recortado na altura da banda esperada com a utilização de estilete estéril. O gel foi pesado e adicionou-se *Capture Buffer* em cada tubo, na proporção de 10µL para cada miligrama de gel. Os tubos contendo a mistura foram incubados a 60ºC em termobloco entre 5 e 15 minutos, até que a agarose se dissolvesse por completo. Após a completa dissolução da agarose, a amostra foi homogeneizada e centrifugada e, todo o conteúdo foi transferido para um novo tubo com uma coluna de filtração, o qual foi mantido em temperatura ambiente por 1 minuto. Após, o tubo foi centrifugado a 14000xg por 30 segundos. O líquido que passou pela coluna foi descartado e retornou-se a coluna para o tubo coletor, foram então adicionados 500µL de *Wash Buffer* e novamente o tubo foi centrifugado a 14000xg por 30 segundos. O tubo contendo o líquido foi descartado e a coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5mL. Para que o DNA da coluna fosse eluído foram acrescentados de 10 a 50µL de *Elution Buffer* e o tubo com a coluna foi mantido em temperatura ambiente por 1 minuto. Após, o tubo foi centrifugado a 14000xg por 1 minuto.

As colunas foram descartadas e os tubos, contendo o DNA purificado, foram mantidos a -20ºC até o momento do uso.

### 3.10.2 Quantificação de DNA

Para definir a concentração correta de DNA a ser colocada na reação de sequenciamento foi realizada a quantificação do DNA purificado. Em um gel de agarose a 2%, foram aplicados 4µL do DNA purificado misturado com 1µL de 10X *Blue Juice – Invitrogen®*, para cada amostra. Nos poços das extremidades foram aplicados 4µL de *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen®*), diluídos a 1:4. A cuba eletroforética foi então ligada e o resultado da corrida foi observado em transluminador de luz UV. A intensidade das bandas de cada amostra foi comparada com as bandas do *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen®*), para inferir a quantidade em ng de DNA presente na amostra. A amostra foi mantida à temperatura de -20ºC até o momento da realização da reação de sequenciamento.

### 3.10.3 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi preparada seguindo o protocolo do *BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems™*). O *kit* continha um *mix* pronto para uso, ao qual foram adicionados a amostra e o *primer* e completadas para o volume final com água *UltraPure®* (*Invitrogen®*) q.s.p 10µL. Para cada amostra foi realizada uma reação utilizando o *primer* senso 504. Preparou-se uma solução com o produto da purificação do DNA, quantificado previamente, seguindo a distribuição de reagentes, por volume de amostra conforme quadro 9.

| Reagentes | Volume/Amostra (µL) |
|---|---|
| *BigDye* | 4 |
| *Primer* 3,2 µM | 1 |
| PCR | Definir |
| H20 *DNAse/RNAse free* | Definir (q.s.p 10 µL) |
| Total | 10 |

Quadro 9 - Reagentes utilizados na reação de sequenciamento do DNA do RABV isolado de lavado cerebral de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados

Em seguida, as reações foram incubadas no termociclador e submetidas aos ciclos descritos no quadro 10.

| Ciclo | Temperatura (ºC) | Tempo |
|---|---|---|
| 1 ciclo | 96 ºC - Denaturação | 1 minuto |
| 35 ciclos | 96 ºC - Denaturação | 10 segundos |
| 35 ciclos | 50 ºC Anelamento | 5 segundos |
| 35 ciclos | 60 ºC Extensão | 4 minutos |
| 1 ciclo | 4 ºC Manutenção | Até a retirada |

Quadro 10 – Ciclos da reação de sequenciamento do RABV isolados de lavado cerebral de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados

Como controle da reação de sequenciamento utilizou-se uma amostra de DNA de fita dupla, *pGEM® – 3Zf(+)*, com seu respectivo *primer* senso – 21M13. A reação controle do sequenciamento seguiu o protocolo descrito no quadro 11.

| Reagentes | Volume/Amostra (µL) |
|---|---|
| *BigDye* | 4 |
| *Primer* 0,8 µM | 4 |
| *pGEM* 200 ng/µL | 1 |
| H20 *DNAse/RNAse free* | 1 |
| Total | 10 |

Quadro 11 **-** Reagentes utilizados na reação controle do sequenciamento

Todas as reações foram realizadas evitando-se a presença de luz, pois os nucleotídeos são marcados com fluoresceína. E após a termociclagem as reações foram mantidas a 4ºC para a etapa de purificação da reação de sequenciamento.

### 3.10.4 Purificação da reação de sequenciamento por Sephadex®

Para a purificação da reação de sequenciamento foi utilizado *Sephadex*® G-50 (*GE Healthcare*™), conforme as recomendações do fabricante. Adicionou-se *Sephadex*® G-50 à placa *MultiScreen HV* (*Millipore*®), com auxílio de medidor próprio. Adicionaram-se 300µL de água *UltraPure*® (*Invitrogen*®) em cada orifício, e a placa mantida em temperatura ambiente por 3 horas. Foi acoplada uma placa coletora embaixo da placa preparada com *Sephadex*® e essas foram submetidas à centrifugação a 710xg por 10 minutos. A água excedente que estava na placa coletora foi descartada e novamente foram adicionados a cada orifício 140µL de água ultrapura, e em seguida centrifugaram-se as placas novamente a 710xg por 10 minutos. Para uma nova concentração, as placas foram centrifugadas a 710xg por 10 minutos. A placa coletora foi trocada pela *MicroAmp*® *Optical 96 well Reaction Plate* (compatível com o sequenciador) e colocou-se o produto do sequenciamento por cima do *Sephadex*® G-50 e centrifugou-se a 710xg por 10 minutos. Após a centrifugação, a placa foi colocada em termociclador a 95ºC por 15 minutos para a evaporação de todo líquido.

Cada amostra da placa foi ressuspendida com 10µL de formamida *HiDi* (*Applied Biosystems*$^{TM}$), e, posteriormente, a placa foi levada ao termociclador a 95ºC por 5 minutos e, em seguida, colocada em gelo por mais 5 minutos. A placa foi colocada no sequenciador automático ABI-3100 (*Applied Biosystems*$^{TM}$) para obtenção das sequências.

### 3.10.5 Confirmação da Identidade genética das sequências

Após o sequenciamento, foi realizada a confirmação da identidade genética das sequencias geradas, acessando o banco de dados do *GenBank* por meio do aplicativo *Blast Search.*

## 3.11 Análise Estatística

Para este estudo utilizou-se como análise estatística o teste de sensibilidade diagnóstica e o teste exato de Fisher.

### 3.11.1 Teste de sensibilidade diagnóstica

Considerando que todos os espécimes utilizados neste estudo foram diagnosticados positivos para raiva pela técnica de IFD e que a definição de sensibilidade diagnóstica é a probabilidade de um teste diagnóstico produzir um resultado positivo na presença da doença (BRATS, 2007), foi calculada a sensibilidade dos testes de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR para a detecção do RABV em lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados conforme a fórmula abaixo:

$$\textbf{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo}}{\text{Verdadeiro Positivo + Falso Negativo}}$$

### 3.11.2 Teste exato de Fisher

Para a análise da proporção de positivos detectados pelos testes de hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR em lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com o RABV foi utilizado o teste exato de Fisher, com α de 5%, no programa *Quick Calcs, GraphPad Software Inc*., disponível no sítio: http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm. As hipóteses neste estudo são:

- $H_0$: A proporção de positivos detectados pelo teste de hnRT-PCR é **igual** a proporção de positivos detectados pelo teste *Real Time* RT-PCR.
- $H_1$: A proporção de positivos detectados pelo teste de hnRT-PCR é **diferente** a proporção de positivos detectados pelo teste *Real Time* RT-PCR.

ρεσυλταδοσ----------RESULTADOS

# 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos baseados na metodologia definida anteriormente para este estudo estão descritos nos itens a seguir.

## 4.1 Titulação do Vírus de Campo

O vírus de campo (4255V/10) utilizado como padrão positivo nas reações de *Real Time* RT-PCR obteve o título de $10^{4,63}$ $DLIC_{50}$/0,03mL.

## 4.2 Tipificação Antigênica

Das 30 amostras tipificadas antigenicamente pela técnica de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais, 29 (96,67%) foram compatíveis com o padrão da reação da variante antigênica 3 (AgV3), característica de morcego hematófago. A amostra 7204/09 proveniente de um morcego da espécie *Artibeus obscurus* não foi isolada em camundongos, portanto não foi possível a realização da tipificação antigênica.

## 4.3 Isolamento Viral em Cultura de Células

As amostras de bexiga, rins, pulmões e conteúdo fecal inoculadas em cultura de células N2A para isolamento viral causaram mudanças na morfologia das células, ficando um tapete grumado ao invés da monocamada e ocasionaram elevada mortalidade celular.

Os resultados obtidos pela técnica de IVCC para isolamento viral do lavado cerebral, órgãos e do conteúdo fecal dos morcegos do gênero *Artibeus* diagnosticados positivos para raiva pela IFD estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição e proporção (%) das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal positivos e negativos à técnica de isolamento viral em cultura de células N2A (IVCC), de morcegos, do gênero *Artibeus,* diagnosticados positivos para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011

| **Lavado Cerebral/Órgãos/ Conteúdo Fecal** | **Isolamento viral em cultura de células N2A (IVCC)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Positivos** | **%** | **Negativos** | **%** |
| Lavado Cerebral | 28 | 93,33 | 02 | 6,67 |
| Glândulas Salivares | 11 | 36,67 | 19 | 63,33 |
| Bexiga | 05 | 16,67 | 25 | 83,33 |
| Rins | 0 | 0 | 30 | 100 |
| Pulmões | 0 | 0 | 30 | 100 |
| Conteúdo Fecal | 1 | 3,33 | 29 | 96,6 |

A representação gráfica dos resultados de IVCC, das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* diagnosticados positivos para a raiva, está ilustrada no gráfico 1.

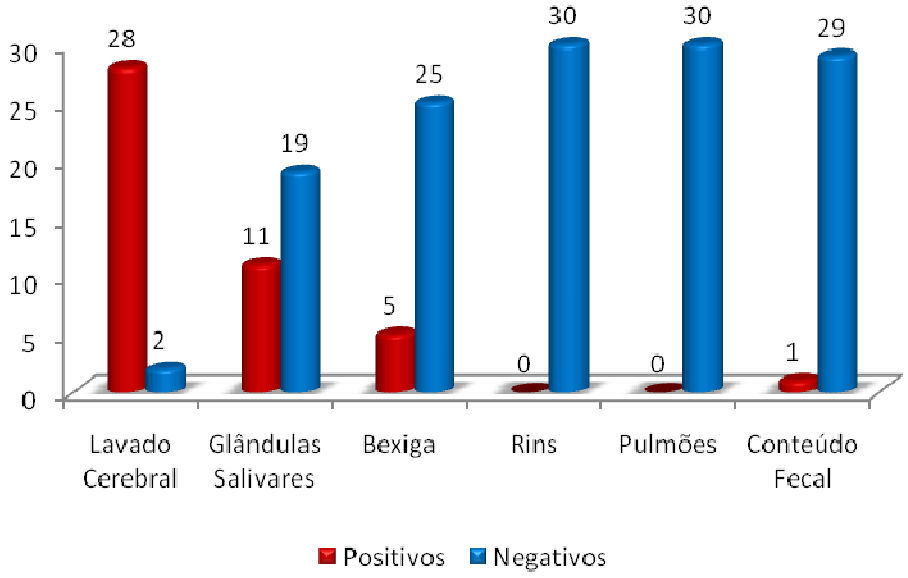


Gráfico 1 - Distribuição de amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero *Artibeus*, diagnosticados positivos para a prova de isolamento viral em cultura de células (IVCC), Instituto Pasteur de São Paulo, - São Paulo – 2011

A figura 3 mostra a infecção das células da linhagem N2A pelo RABV isolado de lavado cerebral de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados.

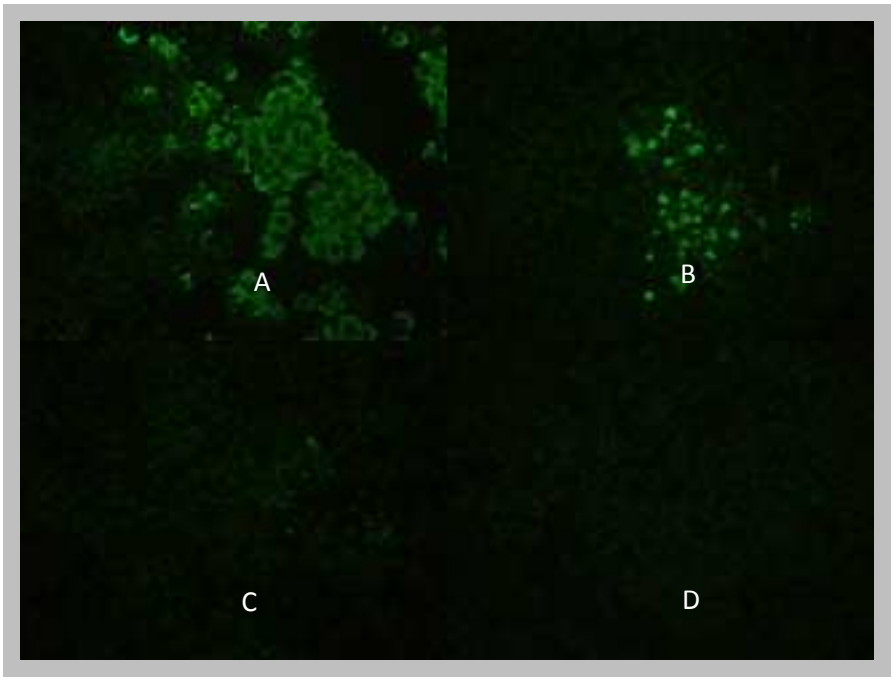


Figura 3 – Isolamento viral em cultura de células N2A de amostras de lavado cerebral de morcegos do gênero *Artibeus*. **A.** Tapete de células N2A com intensa infecção viral. **B.** Tapete de células N2A com moderada infecção viral. **C.** Tapete de células N2A com pouca infecção viral. **D.** Tapete de células N2A sem infecção viral – negativo

## 4.4 Quantificação do RNA total e cDNA

Após as amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal dos morcegos do gênero *Artibeus* serem quantificadas para RNA total e os resultados serem calculados, a concentração de RNA presente nessas amostras está demonstrada no quadro 12.

| Quantificação RNA Total | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Amostra** | **Lavado Cerebral** | **Glândulas** | **Bexiga** | **Rins** | **Pulmões** | **Conteúdo Fecal** |
| **IP 1110 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 51,5 µg/mL | >1200 µg/mL | 259 µg/mL | 390 µg/mL |
| **IP 2242 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 150 µg/mL | 352 µg/mL | 581 µg/mL | 970 µg/mL |
| **IP 2470 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 73,7 µg/mL | 391 µg/mL | 310 µg/mL | 780 µg/mL |
| **IP 2734 V/09** | >1200 µg/mL | 151 µg/mL | 110 µg/mL | 476 µg/mL | 140 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 2939 V/09** | >1200 µg/mL | 977 µg/mL | 78,9 µg/mL | 662 µg/mL | 180 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 3017 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 59,4 µg/mL | 652 µg/mL | 736 µg/mL | 110 µg/mL |
| **IP 3173 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 180 µg/mL | 520 µg/mL | 170 µg/mL | 313 µg/mL |
| **IP 3174 V/09** | >1200 µg/mL | 944 µg/mL | 75,5 µg/mL | 248 µg/mL | 248 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 3175 V/09** | 422 µg/mL | 713 µg/mL | 96,9 µg/mL | 520 µg/mL | 141 µg/mL | 661 µg/mL |
| **IP 3401V/09** | >1200 µg/mL | 870 µg/mL | 92,3 µg/mL | 473 µg/mL | 110 µg/mL | 728 µg/mL |
| **IP 3405 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 40,7 µg/mL | 160 µg/mL | 51 µg/mL | 738 µg/mL |
| **IP 3406 V/09** | 82,5 µg/mL | 624 µg/mL | 18,1 µg/mL | 33,6 µg/mL | 11,5 µg/mL | 739 µg/mL |
| **IP 3852 V/09** | >1200 µg/mL | 1200 µg/mL | 26,7 µg/mL | >1200 µg/mL | 53 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 3933 V/09** | >1200 µg/mL | 634 µg/mL | 61,2 µg/mL | 320 µg/mL | 91,2 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 3970 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 63,5 µg/mL | 387 µg/mL | 315 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 4506 V/09** | >1200 µg/mL | 909 µg/mL | 63,6 µg/mL | 274 µg/mL | 342 µg/mL | 200 µg/mL |
| **IP 4606 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 14,4 µg/mL | 467 µg/mL | 395 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 4607 V/09** | >1200 µg/mL | 325 µg/mL | 50,6 µg/mL | 79,1 µg/mL | 170 µg/mL | 455 µg/mL |
| **IP 4925 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 200 µg/mL | 291 µg/mL | 180 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 4987 V/09** | >1200 µg/mL | 919 µg/mL | 9,55 µg/mL | 140 µg/mL | 130 µg/mL | 160 µg/mL |
| **IP 5059 V/09** | >1200 µg/mL | 893 µg/mL | 66,7 µg/mL | 546 µg/mL | 170 µg/mL | 421 µg/mL |
| **IP 5610 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 5,56 µg/mL | 740 µg/mL | 120 µg/mL | 827 µg/mL |
| **IP 7204 V/09** | >1200 µg/mL | 21,3 µg/mL | 46,1 µg/mL | 657 µg/mL | 608 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 2202 V/10** | >1200 µg/mL | 882 µg/mL | 28,4 µg/mL | 506 µg/mL | 274 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 3015 V/10** | >1200 µg/mL | 418 µg/mL | 63,6 µg/mL | 780 µg/mL | 190 µg/mL | 1200 µg/mL |
| **IP 3088 V/10** | >1200 µg/mL | 904 µg/mL | 49,6 µg/mL | 160 µg/mL | 426 µg/mL | 881 µg/mL |
| **IP 3208 V/10** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 5,96 µg/mL | 10,4 µg/mL | 200 µg/mL | 51,1 µg/mL |
| **IP 3848 V/10** | >1200 µg/mL | 598 µg/mL | 33,2 µg/mL | 140 µg/mL | 356 µg/mL | 781 µg/mL |
| **IP 5378 V/10** | >1200 µg/mL | 300 µg/mL | 130 µg/mL | 283 µg/mL | 180 µg/mL | 714 µg/mL |
| **IP 5731 V/10** | >1200 µg/mL | 93,3 µg/mL | 170 µg/mL | 120 µg/mL | 307 µg/mL | 110 µg/mL |

Quadro 12 – Concentração expressa em µg/mL, de RNA total extraído pela técnica utilizando *TRIzol*®, de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero *Artibeus,* positivos para raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011

Da mesma forma os resultados da quantificação, feitas por *kit* específico para DNA fita simples, mostrando a concentração de DNA presente nas amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal dos morcegos do gênero *Artibeus*, estão apresentados no quadro 13.

| Quantificação cDNA | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Amostra** | **Lavado Cerebral** | **Glândulas** | **Bexiga** | **Rins** | **Pulmões** | **Conteúdo Fecal** |
| **IP 1110 V/09** | >1200 µg/mL | 220 µg/mL | 27,9 µg/mL | 53,1 µg/mL | 29,6 µg/mL | 51,3 µg/mL |
| **IP 2242 V/09** | >1200 µg/mL | 151 µg/mL | 47,8 µg/mL | 38,2 µg/mL | 94,7 µg/mL | 116 µg/mL |
| **IP 2470 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 10,3 µg/mL | 38,6 µg/mL | 25,4 µg/mL | 82,5 µg/mL |
| **IP 2734 V/09** | >1200 µg/mL | 8,44 µg/mL | 17,6 µg/mL | 35,4 µg/mL | 14,8 µg/mL | 151 µg/mL |
| **IP 2939 V/09** | 64,5 µg/mL | 73,1 µg/mL | 10,6 µg/mL | 46,1 µg/mL | 29,3 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 3017 V/09** | >1200 µg/mL | 145 µg/mL | 9,26 µg/mL | 59,5 µg/mL | 76,9 µg/mL | 17,9 µg/mL |
| **IP 3173 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 22,5 µg/mL | 42,6 µg/mL | 29 µg/mL | 34,9 µg/mL |
| **IP 3174 V/09** | >1200 µg/mL | 64,3 µg/mL | 12 µg/mL | 21,3 µg/mL | 26,8 µg/mL | 210 µg/mL |
| **IP 3175 V/09** | 54,1 µg/mL | 41,9 µg/mL | 11,2 µg/mL | 41,9 µg/mL | 31,9 µg/mL | 55,4 µg/mL |
| **IP 3401V/09** | >1200 µg/mL | 67,6 µg/mL | 11,9 µg/mL | 45,5 µg/mL | 21 µg/mL | 58 µg/mL |
| **IP 3405 V/09** | >1200 µg/mL | 35,7 µg/mL | 8,81 µg/mL | 19,7 µg/mL | 12,3 µg/mL | 60,1 µg/mL |
| **IP 3406 V/09** | 17,5 µg/mL | 52,9 µg/mL | 9,12 µg/mL | 12,6 µg/mL | 9,49 µg/mL | 41,5 µg/mL |
| **IP 3852 V/09** | >1200 µg/mL | 44,6 µg/mL | 8,22 µg/mL | 49,2 µg/mL | 10,6 µg/mL | 166 µg/mL |
| **IP 3933 V/09** | >1200 µg/mL | 38,9 µg/mL | 10,9 µg/mL | 31,4 µg/mL | 14,6 µg/mL | 149 µg/mL |
| **IP 3970 V/09** | 220 µg/mL | >1200 µg/mL | 11,2 µg/mL | 31,5 µg/mL | 24,8 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 4506 V/09** | 137 µg/mL | 55,1 µg/mL | 9,34 µg/mL | 21,7 µg/mL | 38,1 µg/mL | 26,2 µg/mL |
| **IP 4606 V/09** | >1200 µg/mL | 220 µg/mL | 7,06 µg/mL | 30,7 µg/mL | 31,3 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 4607 V/09** | >1200 µg/mL | 37,6 µg/mL | 10,9 µg/mL | 18,2 µg/mL | 21,4 µg/mL | 56,4 µg/mL |
| **IP 4925 V/09** | >1200 µg/mL | 119 µg/mL | 21,5 µg/mL | 23,1 µg/mL | 25,3 µg/mL | 108 µg/mL |
| **IP 4987 V/09** | >1200 µg/mL | 23,4 µg/mL | 6,96 µg/mL | 15,2 µg/mL | 21,6 µg/mL | 62 µg/mL |
| **IP 5059 V/09** | >1200 µg/mL | 62,8 µg/mL | 8,87 µg/mL | 39,2 µg/mL | 22,8 µg/mL | 43,4 µg/mL |
| **IP 5610 V/09** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 8,46 µg/mL | 52,5 µg/mL | 13,7 µg/mL | 60,3 µg/mL |
| **IP 7204 V/09** | 230 µg/mL | 8,34 µg/mL | 8,99 µg/mL | 52,8 µg/mL | 39,9 µg/mL | >1200 µg/mL |
| **IP 2202 V/10** | >1200 µg/mL | 139 µg/mL | 7,71 µg/mL | 40,3 µg/mL | 103 µg/mL | 144 µg/mL |
| **IP 3015 V/10** | >1200 µg/mL | 210 µg/mL | 11,2 µg/mL | 77,6 µg/mL | 19,5 µg/mL | 81 µg/mL |
| **IP 3088 V/10** | >1200 µg/mL | 30,9 µg/mL | 11,5 µg/mL | 20,8 µg/mL | 34,7 µg/mL | 152 µg/mL |
| **IP 3208 V/10** | >1200 µg/mL | >1200 µg/mL | 5,77 µg/mL | 6,68 µg/mL | 14,8 µg/mL | 31,3 µg/mL |
| **IP 3848 V/10** | >1200 µg/mL | 46,7 µg/mL | 8,67 µg/mL | 28,5 µg/mL | 86,5 µg/mL | 103 µg/mL |
| **IP 5378 V/10** | >1200 µg/mL | 36,1 µg/mL | 25,3 µg/mL | 26,4 µg/mL | 28,2 µg/mL | 80,2 µg/mL |
| **IP 5731 V/10** | >1200 µg/mL | 13,7 µg/mL | 16,5 µg/mL | 27,8 µg/mL | 122 µg/mL | 19,4 µg/mL |

Quadro 13 - Dados da quantificação, expressos em µg/mL, do cDNA de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero *Artibeus,* positivos para raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011

## 4.5 Técnicas de RT-PCR e hnRT- PCR

Os resultados das técnicas de RT-PCR e hnRT-PCR de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal da amostra 2242V/09 estão exemplificando, na figura 4, o padrão observado para as amostras positivas para raiva na eletroforese em gel de poliacrilamida a 1% corado com brometo de etídeo. Na técnica de RT-PCR as amostras positivas apresentaram o fragmento esperado de 1479pb (figura 4A), e na técnica de hnRT-PCR o fragmento esperado de 248pb (figura 4B).

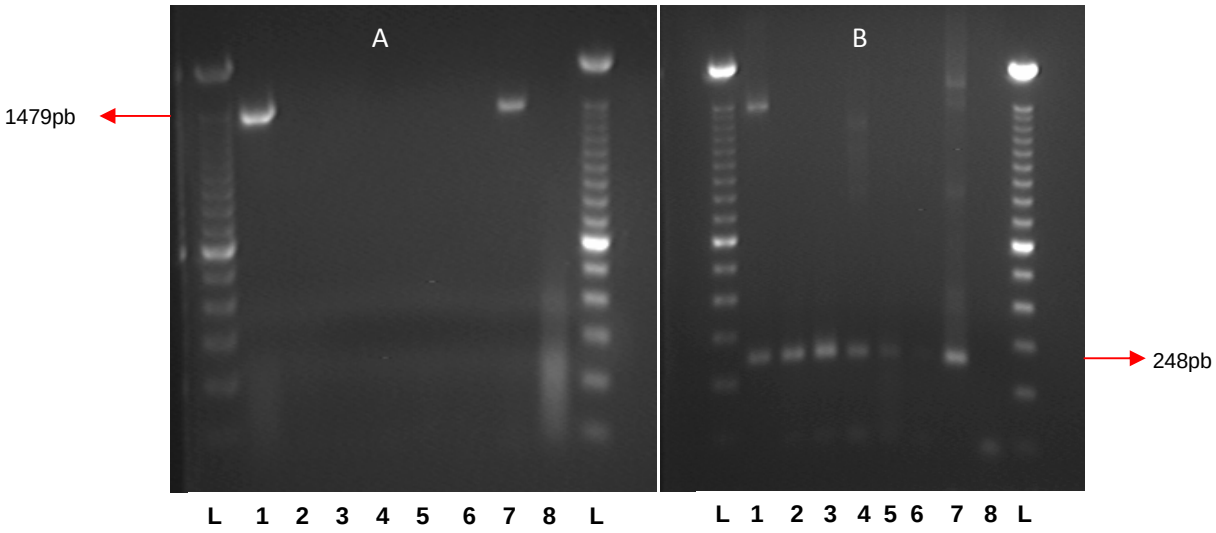


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo das reações de RT-PCR e hnRT-PCR da amostra 2242V/09. **A.** Reação de RT-PCR. L – Ladder – Marcador molecular com 100pb; 1 – Lavado Cerebral; 2 – Glândulas Salivares; 3 – Bexiga; 4 – Rins; 5 – Pulmões; 6 – Conteúdo Fecal; 7 – CVS (Controle Positivo) e 8 – Água Ultra-pura (Controle Negativo). **B.** Reação de hnRT-PCR. L – Ladder – Marcador molecular com 100pb; 1 – Lavado Cerebral; 2 – Glândulas Salivares; 3 – Bexiga; 4 – Rins; 5 – Pulmões; 6 – Conteúdo Fecal; 7 – CVS (Controle Positivo) e 8 – Água Ultra-pura (Controle Negativo)

Os resultados quanto ao número de amostras positivas e negativas nas técnicas de RT-PCR e as respectivas proporções estão sumarizados nas tabelas 2.

Tabela 2 - Distribuição e proporção (%) das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal positivos e negativos na técnica de RT-PCR, de morcegos, do gênero *Artibeus,* diagnosticados positivos para raiva pela imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011

| **Lavado Cerebral/Órgãos/ Conteúdo Fecal** | **Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Positivos** | **%** | **Negativos** | **%** |
| Lavado Cerebral | 29 | 96,67 | 01 | 3,33 |
| Glândulas Salivares | 10 | 33,33 | 20 | 66,67 |
| Bexiga | 0 | 0 | 30 | 100,00 |
| Rins | 01 | 3,33 | 29 | 96,67 |
| Pulmões | 0 | 0 | 30 | 100,00 |
| Conteúdo Fecal | 0 | 0 | 30 | 100,00 |

A tabela 3 demonstra os resultados quanto ao número de amostras positivas e negativas na técnica de hnRT-PCR e suas respectivas proporções.

Tabela 3 - Distribuição e proporção (%) das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal positivos e negativos na técnica de hnRT-PCR, de morcegos, do gênero *Artibeus,* diagnosticados positivos para raiva pela imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011

| **Lavado Cerebral/Órgãos/ Conteúdo Fecal** | ***Hemi-Nested* PCR (hnRT-PCR)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Positivos** | **%** | **Negativos** | **%** |
| Lavado Cerebral | 30 | 100,00 | 0 | 0 |
| Glândulas Salivares | 27 | 90,00 | 03 | 10,00 |
| Bexiga | 25 | 83,33 | 05 | 16,67 |
| Rins | 24 | 80,00 | 06 | 20,00 |
| Pulmões | 23 | 76,67 | 07 | 23,33 |
| Conteúdo Fecal | 13 | 43,33 | 17 | 56,67 |

## 4.6 Técnica de *Real Time* RT-PCR

Serão demonstrados os resultados obtidos na reação de Real Time RT-PCR e no teste de interferência do lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal na amplificação do IPC.

### 4.6.1 Reação de *Real Time* RT-PCR

A figura 5 mostra os gráficos de presença e ausência gerados a partir das amostras obtidas de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com RABV.

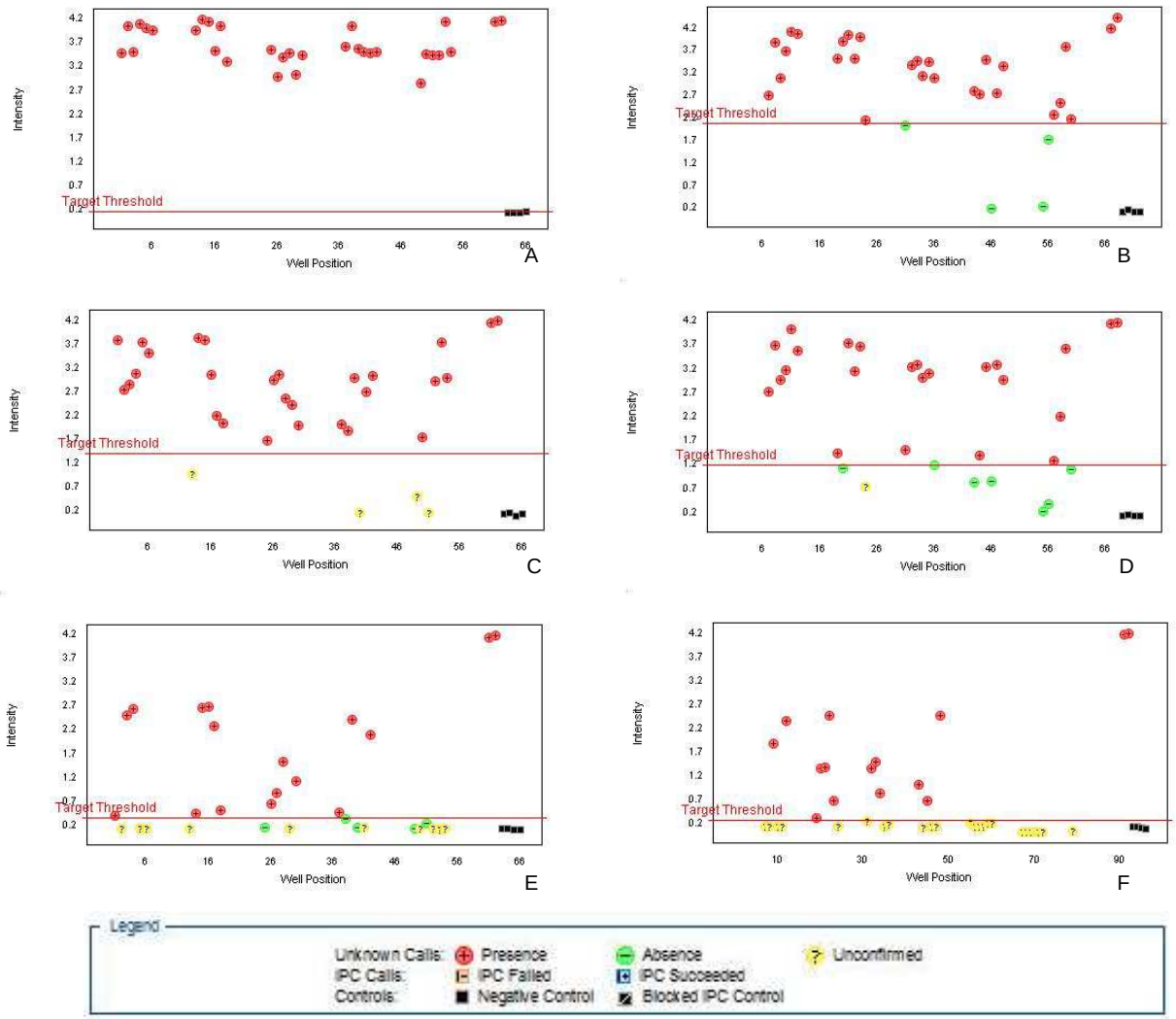


Figura 5 – Gráficos de presença e ausência das reações de *Real Time* RT-PCR das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com RABV. **A.** Lavado Cerebral; **B.** Glândulas Salivares; **C.** Bexiga; **D.** Rins; **E.** Pulmões e **F.** Conteúdo Fecal

A figura 6 mostra os gráficos de amplificação (*amplification plot*) gerados a partir das amostras obtidas de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com RABV.

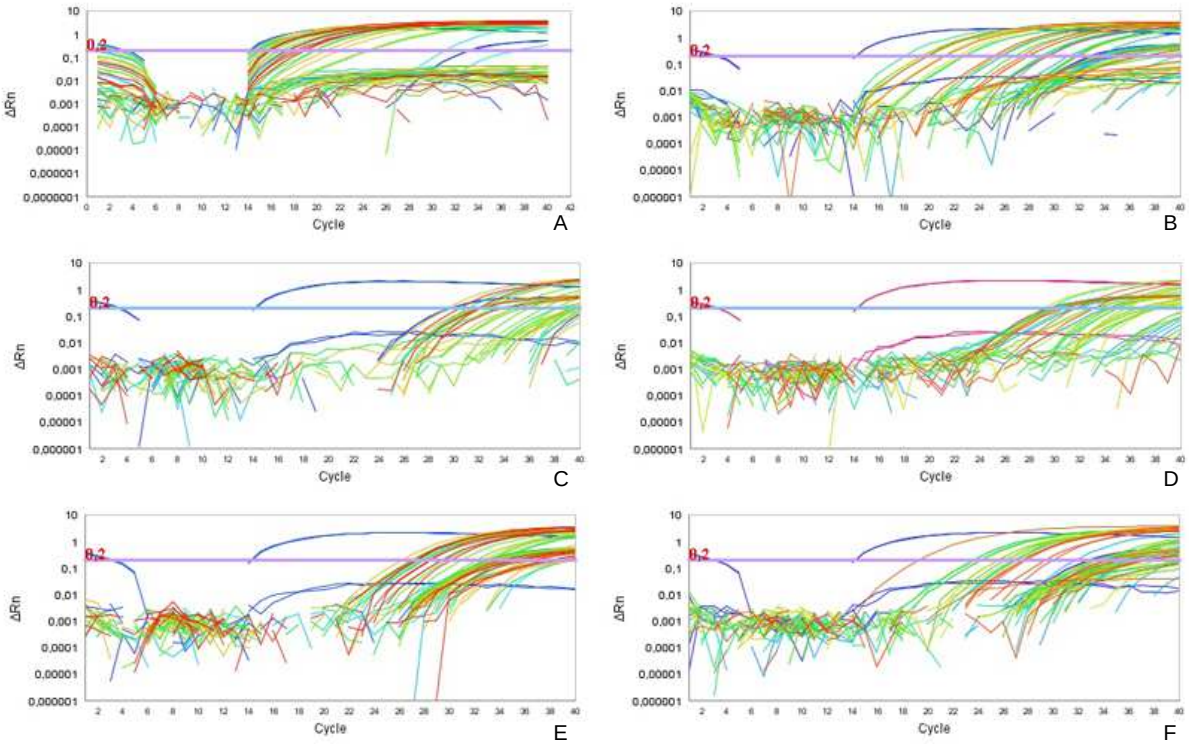


Figura 6 – Gráficos (*amplification plot*) das reações de *Real Time* RT-PCR das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com RABV. **A.** Lavado Cerebral; **B.** Glândulas Salivares; **C.** Bexiga; **D.** Rins; **E.** Pulmões e **F.** Conteúdo Fecal

As figuras 5 e 6 mostram que todas as 30 amostras de lavado cerebral foram diagnosticadas positivas tanto no gráfico de presença e ausência quanto no *amplification plot*. Na análise do gráfico de amplificação das amostras de lavado cerebral notou-se que pelo menos 15 reações não tiveram a amplificação do IPC, porém houve amplificação da amostra como exemplifica a figura 7. Portanto, na análise individual do *amplification plot* as amostras que mostraram amplificação foram consideradas positivas.

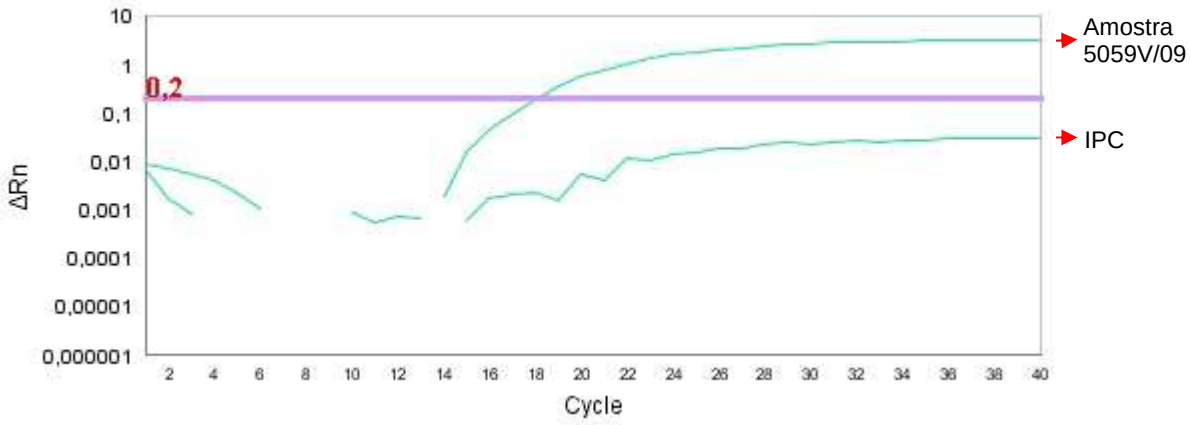


Figura 7 – Gráfico (*amplification plot*) da reação de *Real Time* RT-PCR da amostra de lavado cerebral do espécime 5059V/09 mostrando a curva de amplificação da amostra e do IPC

A figura 5B mostra que quatro amostras de glândulas salivares deram resultado negativo, sendo as amostras 3852V/09; 5610V/09; 3015V/10 e 3088V/10, porém quando o *amplification plot* destas amostras foi analisado verificou-se que as amostras 3852V/09 e 3088V/10 tinham sido amplificadas sendo diagnosticadas positivas. A figura 8 exemplifica o *amplification plot* da amostra de glândula do espécime 3852V/09 na qual pode-se ver nitidamente a amplificação tanto da amostra como do IPC.

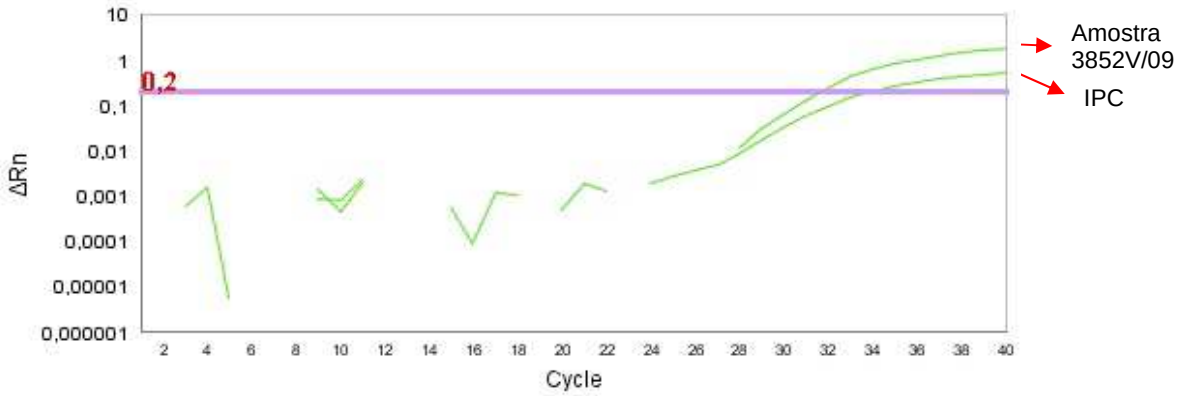


Figura 8 – Gráfico (*amplification plot*) da reação de *Real Time* RT-PCR da amostra de glândula do espécime 3852V/09 mostrando a curva de amplificação da amostra e do IPC

Da mesma forma ocorreram resultados negativos e indeterminados nos gráficos de presença e ausência das amostras de bexiga, rins, pulmões e conteúdo

fecal. O quadro 14 mostra os resultados das amostras de bexiga, rins, pulmões e conteúdo fecal que foram classificadas como negativas ou indeterminadas nos gráficos de presença e ausência e o resultado gerado após analisar o *amplification plot*.

| Amostras | Presença e Ausência | | | | *Amplification Plot* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Bexiga | Rins | Pulmões | Conteúdo Fecal | Bexiga | Rins | Pulmões | Conteúdo Fecal |
| **1110V/09** | - | - | - | Indeterminado | - | - | - | Negativo |
| **2242V/09** | - | - | Indeterminado | Indeterminado | | | Negativo | Negativo |
| **2734V/09** | - | - | - | Indeterminado | - | - | - | Negativo |
| **2939V/09** | - | - | Indeterminado | Indeterminado | - | - | Negativo | Negativo |
| **3017V/09** | - | - | Indeterminado | - | - | - | Negativo | - |
| **3173V/09** | Indeterminado | - | Indeterminado | - | Positivo | - | Negativo | - |
| **3174V/09** | - | Negativo | - | - | - | Positivo | - | - |
| **3406V/09** | - | Indeterminado | - | Indeterminado | - | Positivo | - | Negativo |
| **3852V/09** | - | - | Negativo | Indeterminado | - | - | Negativo | Negativo |
| **4606V/09** | - | - | Indeterminado | Indeterminado | - | - | Negativo | Negativo |
| **4607V/09** | - | Negativo | - | Indeterminado | - | Positivo | - | Negativo |
| **4925V/09** | - | Negativo | - | - | - | Positivo | - | - |
| **4987V/09** | - | - | Negativo | Indeterminado | - | - | Negativo | Negativo |
| **5610V/09** | Indeterminado | Negativo | Negativo | Indeterminado | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| **7204V/09** | - | - | Indeterminado | Indeterminado | - | - | Negativo | Negativo |
| **3015V/10** | Indeterminado | Negativo | Negativo | Indeterminado | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| **3088V/10** | - | Negativo | Indeterminado | Indeterminado | - | Negativo | Negativo | Negativo |
| **3208V/10** | Indeterminado | - | Negativo | Indeterminado | Negativo | - | Negativo | Negativo |
| **3848V/10** | - | - | Indeterminado | Indeterminado | - | - | Negativo | Negativo |
| **5378V/10** | - | - | Indeterminado | Indeterminado | - | - | Negativo | Negativo |
| **5731V/10** | - | Negativo | Indeterminado | Indeterminado | - | Positivo | Negativo | Negativo |

Quadro 14 – Resultados gerados nos gráficos de presença e ausência e *amplification plot* na reação de *Real Time* RT-PCR nas amostras de bexiga, rins, pulmões e conteúdo fecal de morcegos, do gênero *Artibeus,* diagnosticados positivos para raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011

Outra avaliação realizada nas reações de *Real Time* RT-PCR foi a análise do gráfico multicomponente que mostrou a quantidade das fluorescências emitidas das amostras (FAM), do IPC (VIC) e controle negativo de fluorescência (ROX) em relação ao ciclo de amplificação. A figura 9 mostra que o sinal da fluorescência FAM nas amostras de lavado cerebral e glândula foi mais forte e amplificou nos ciclos anteriores aos das amostras de bexiga, rins, pulmões e conteúdo fecal. O sinal de fluorescência VIC por se tratar da fluorescência do controle IPC, mantém um padrão

de amplificação semelhante em todas as amostras. E o controle negativo (ROX) não emitiu fluorescência.

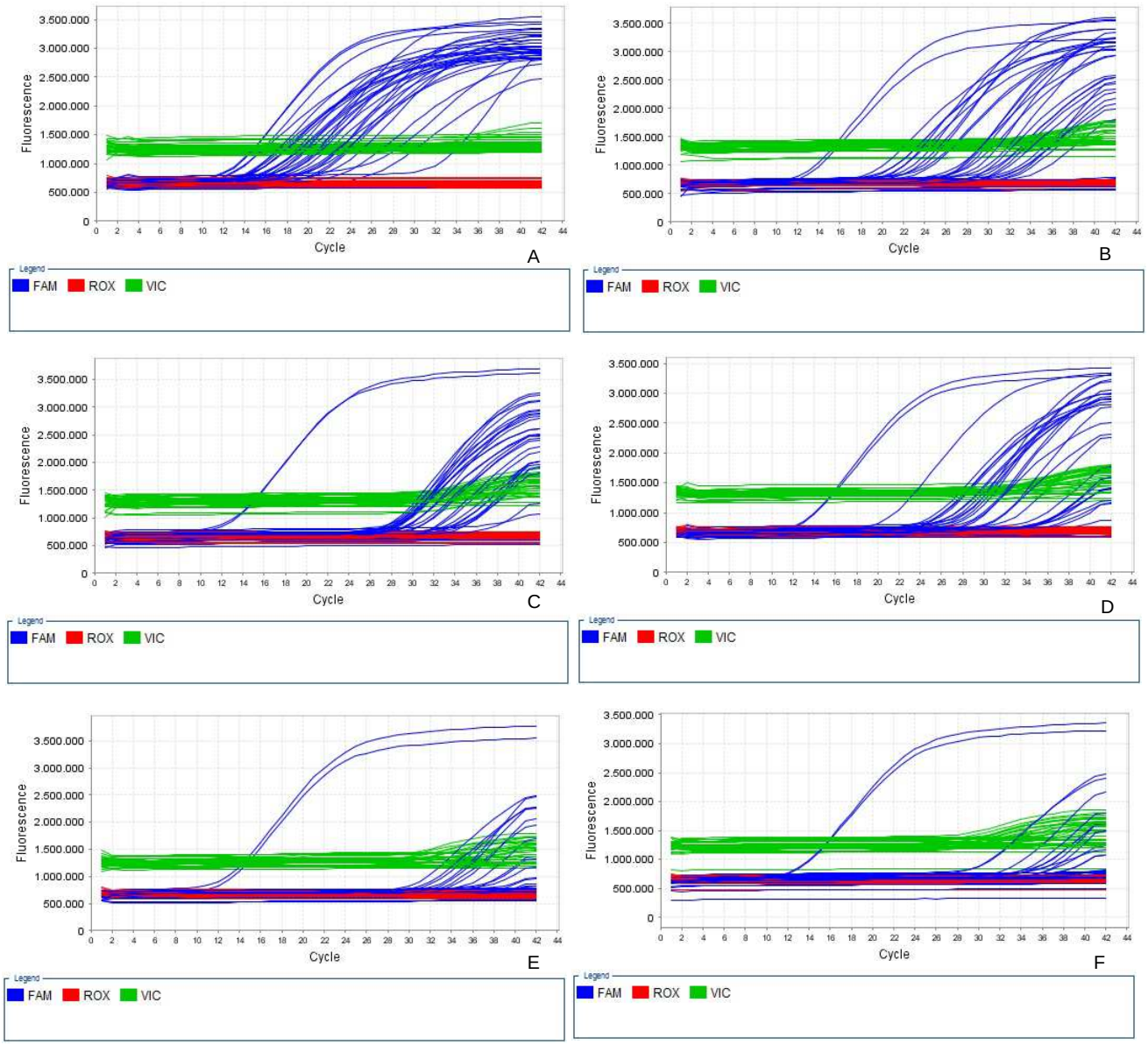


Figura 9 – Gráficos multicomponente da reação de *Real Time* RT-PCR mostrando a fluorescência emitida das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal (fluorescência FAM); IPC (VIC) e controle negativo de fluorescência (ROX). **A.** Lavado Cerebral; **B.** Glândulas Salivares; **C.** Bexiga; **D.** Rins; **E.** Pulmões e **F.** Conteúdo Fecal

A tabela 4 demonstra os resultados quanto ao número de amostras positivas e negativas na técnica de *Real Time* RT-PCR e suas respectivas proporções.

Tabela 4- Distribuição e proporção (%) das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal positivos e negativos na técnica de *Real Time* RT-PCR, de morcegos, do gênero *Artibeus,* diagnosticados positivos para raiva pela imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo – 2011

| **Lavado Cerebral/Órgãos/ Conteúdo Fecal** | ***Real Time* RT-PCR** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Positivos** | **%** | **Negativos** | **%** |
| Lavado Cerebral | 30 | 100,00 | 0 | 0 |
| Glândulas Salivares | 28 | 93,33 | 02 | 6,67 |
| Bexiga | 27 | 90,00 | 03 | 10,00 |
| Rins | 28 | 93,33 | 02 | 6,67 |
| Pulmões | 15 | 50,00 | 15 | 50,00 |
| Conteúdo Fecal | 13 | 43,33 | 17 | 56,67 |

O gráfico 2 ilustra os resultados positivos obtidos pelas técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR de amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos naturalmente infectados do gênero *Artibeus*. Da mesma forma, o gráfico 3 mostra os resultados negativos obtidos por meio das mesmas técnicas nas amostras de lavados cerebrais, órgãos e conteúdos fecais de morcegos do gênero *Artibeus* diagnosticados positivos para raiva.

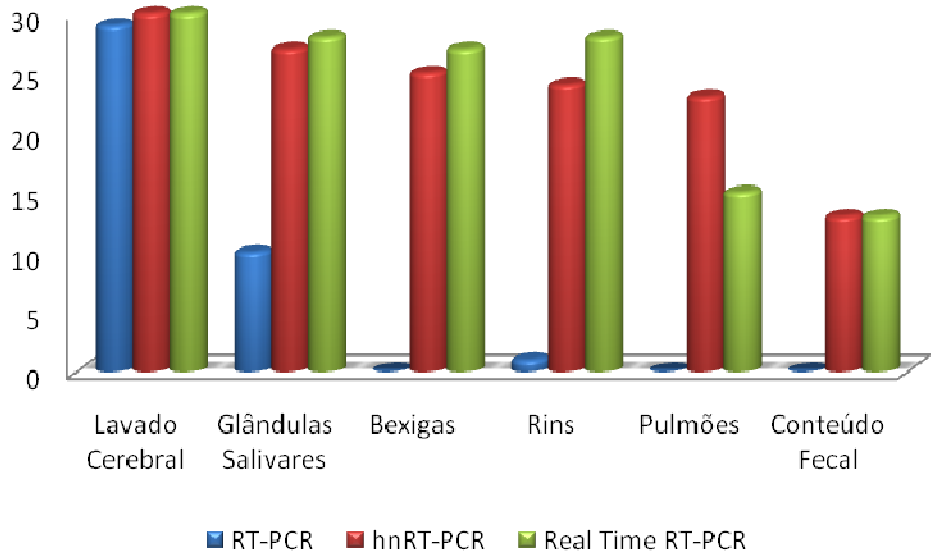


Gráfico 2 - Distribuição das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero *Artibeus*, diagnosticados positivos pelas técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR, Instituto Pasteur de São Paulo, - São Paulo – 2011

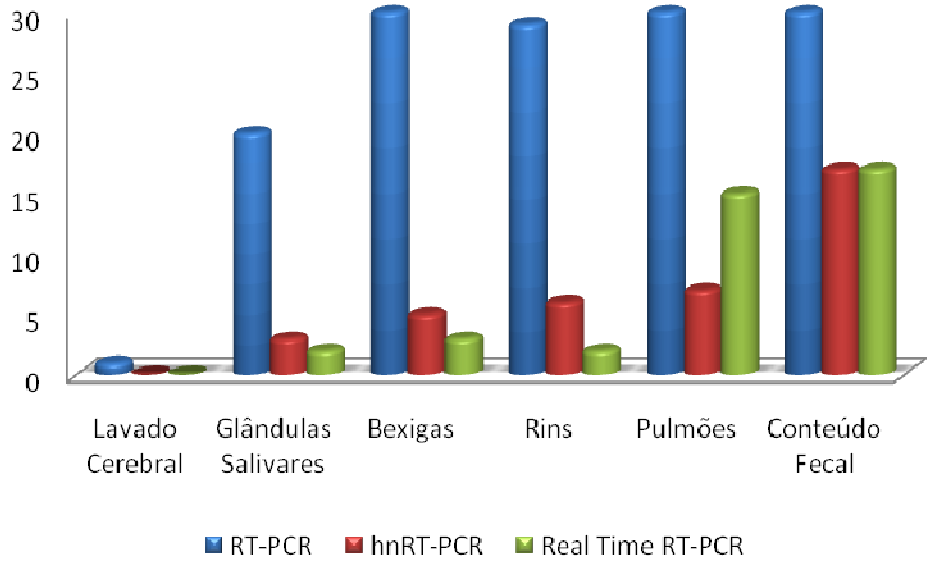


Gráfico 3 - Distribuição das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, do gênero *Artibeus*, diagnosticados negativos pelas técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR, Instituto Pasteur de São Paulo, - São Paulo – 2011

### 4.6.2 Teste de Interferência do lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal na amplificação do IPC

A figura 10 mostra os gráficos das reações de *Real Time* RT-PCR realizada para verificação da interferência das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal na amplificação do controle IPC. Quando o IPC foi utilizado junto com o controle negativo (água ultrapura) a amplificação teve início no ciclo 29,47 (Figura 10G). Quando colocado junto com amostra de lavado cerebral a amplificação teve início no ciclo 31,79 (Figura 10A) demonstrando que produziu interferência na amplificação assim como quando utilizado juntamente com as amostras de rins e pulmões que tiveram início de amplificação nos ciclos 30,39 e 30,41 respectivamente (Figura 10D e E).

Quando o IPC foi utilizado com amostras de glândulas e bexiga não foi observado interferência, pois a amplificação teve início nos ciclos 29,20 e 29,08 respectivamente (Figura 10B e C). O IPC não amplificou quando utilizado junto com amostras de conteúdo fecal como mostra a figura 10F.

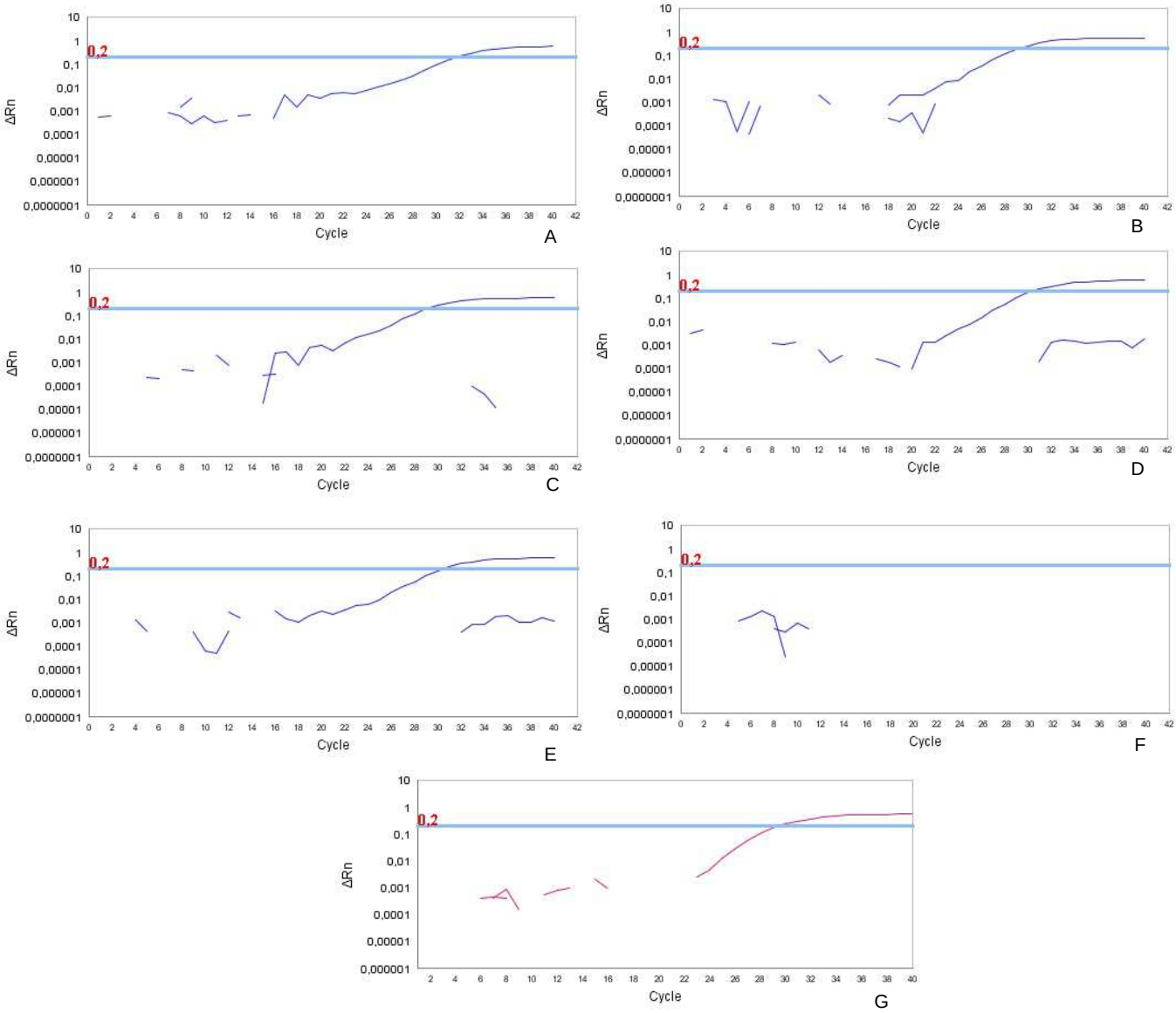


Figura 10 – Gráficos (*amplification plot*) da reação de *Real Time* RT-PCR no teste de interferência das amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal. **A.** Lavado Cerebral; **B.** Glândulas Salivares; **C.** Bexiga; **D.** Rins; **E.** Pulmões; **F.** Conteúdo Fecal e **G.** Controle Negativo (Água Ultrapura)

## 4.7 Determinação do limiar de detecção da amostra de campo

No teste de limiar de detecção da amostra de campo utilizada como padrão positivo na técnica de *Real Time* RT-PCR (4255V/10) observou-se que tanto na reação de RT-PCR e hnRT-PCR apresentou uma sensibilidade de $10^{-3,0}$, enquanto que na reação de *Real Time* RT-PCR foi de $10^{-4,0}$ (Figuras 11 e 12).

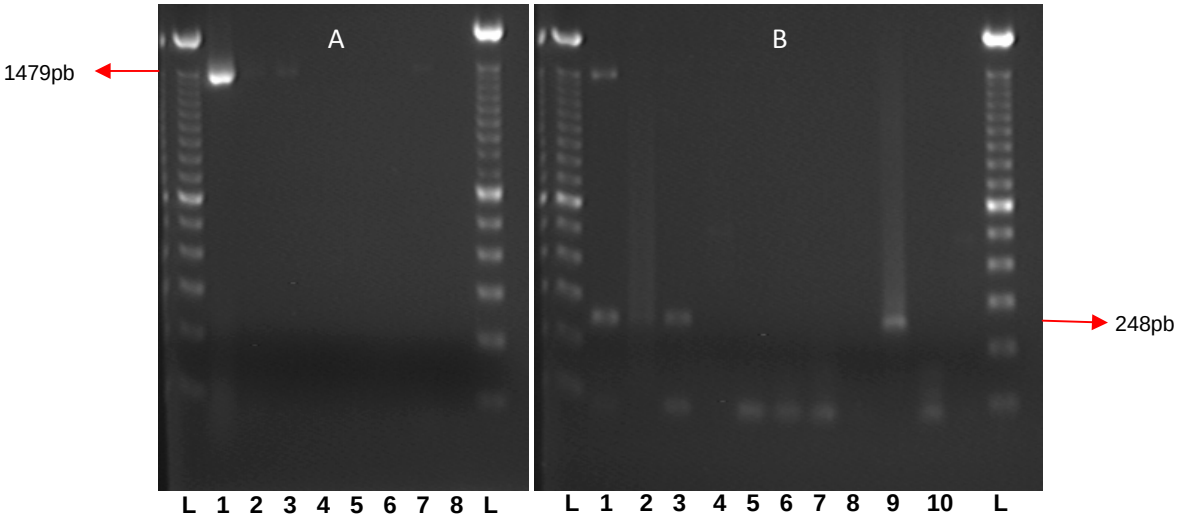


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, referente às reações de RT-PCR e hnRT-PCR para a determinação do limiar de detecção da amostra de campo utilizada como padrão na reação de *Real Time* RT-PCR (4255V/10). **A.** Reação de RT-PCR. L – Ladder – Marcador molecular com 100pb; 1 – Diluição $10^{-1}$ - Positiva; 2 – Diluição $10^{-2}$ - Positiva (banda com baixa intensidade de brilho); 3 – Diluição $10^{-3}$ – Positiva (banda com baixa intensidade de brilho); 4 – Diluição $10^{-4}$ - Negativa; 5 – Diluição $10^{-5}$ - Negativa; 6 – Diluição $10^{-6}$ - Negativa; 7 – CVS (Controle Positivo) e 8 – Água Ultra-pura (Controle Negativo). **B.** Reação de hnRT-PCR. L – Ladder – Marcador molecular com 100pb; 1 – Diluição $10^{-1}$ - Positiva; 2 – Diluição $10^{-2}$ - Positiva (banda com baixa intensidade de brilho); 3 – Diluição $10^{-3}$ – Positiva (banda com baixa intensidade de brilho); 4 – Água Ultrapura (Controle de contaminação da reação); 5 – Diluição $10^{-4}$ - Negativa; 6 – Diluição $10^{-5}$ - Negativa; 7 – Diluição $10^{-6}$ - Negativa; 8 – Água Ultrapura (Controle de contaminação da reação); 9 – CVS (Controle Positivo) e 10 – Água Ultra-pura (Controle Negativo)

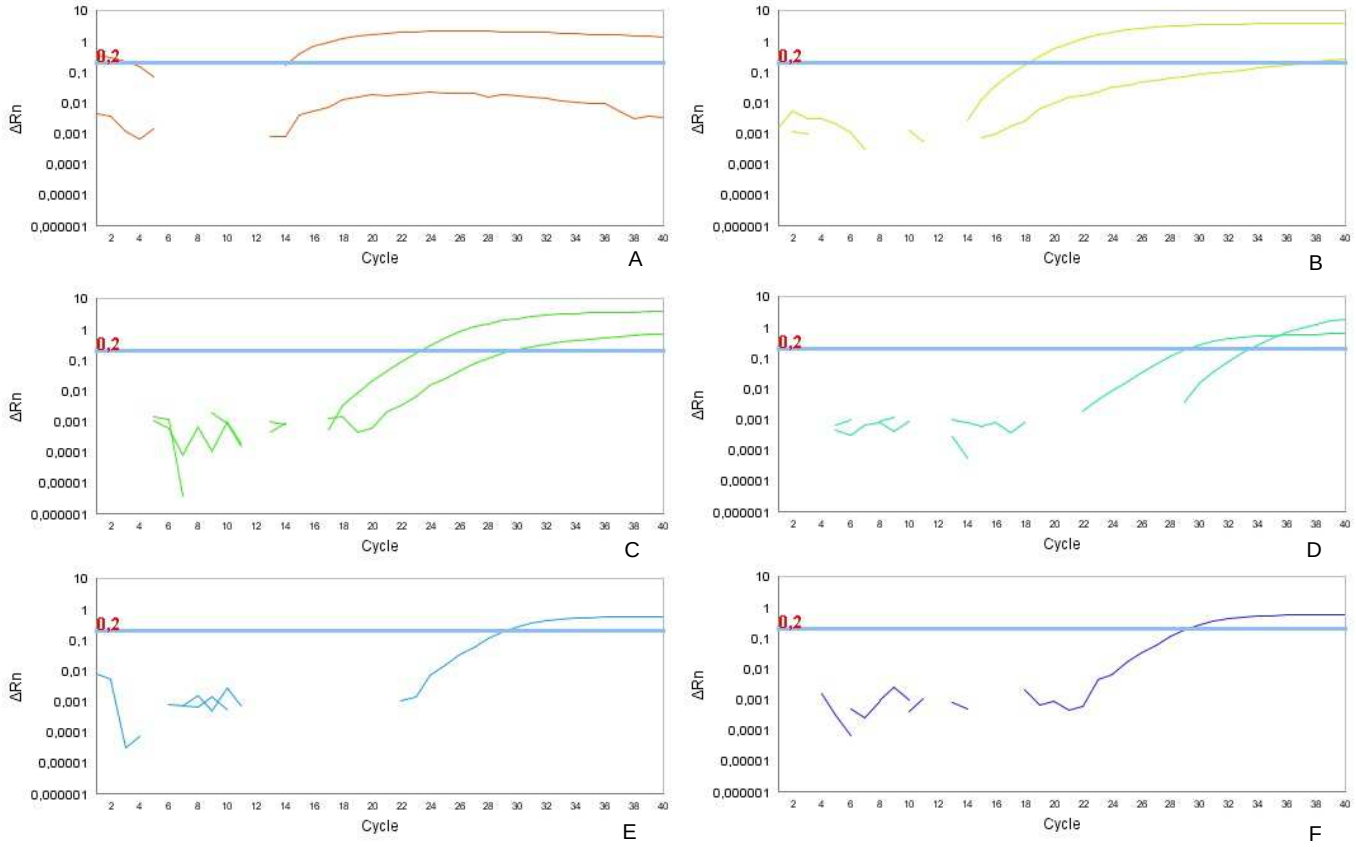


Figura 12 – Gráficos (*amplification plot*) da reação de Real Time RT-PCR para a determinação do limiar de detecção da amostra de campo utilizada como padrão positivo (4255V/10). A. Diluição $10^{-1}$ - Positiva; B. Diluição $10^{-2}$ - Positiva; C. Diluição $10^{-3}$ – Positiva; D. Diluição $10^{-4}$ - Positiva; E. Diluição $10^{-5}$ - Negativa; F. Diluição $10^{-6}$ - Negativa

## 4.8 Sequenciamento do DNA – Confirmação da identidade genética das sequências

Todas as sequencias geradas nesse estudo e utilizadas para a pesquisa da identidade genética foram confirmadas como sendo típicas de *D. rotundus*, compatível com a AgV3.

## 4.9 Análise Estatística

Seguem os resultados das análises estatísticas feitas para este estudo.

### 4.9.1 Teste de sensibilidade diagnóstica

No quadro 15 estão demonstrados os resultados obtidos no teste de sensibilidade diagnóstica das técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR para a detecção do RABV em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados.

| **Lavado Cerebral/Órgãos/ Conteúdo Fecal** | **Sensibilidade (%)** | | |
|---|---|---|---|
| | **RT-PCR** | **hnRT-PCR** | ***Real Time* RT-PCR** |
| Lavado Cerebral | 97 | 100 | 100 |
| Glândulas Salivares | 60 | 91 | 94 |
| Bexiga | 50 | 86 | 91 |
| Rins | 51 | 83 | 94 |
| Pulmões | 50 | 81 | 67 |
| Conteúdo Fecal | 50 | 64 | 64 |

Quadro 15 – Sensibilidade diagnóstica em % das técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR para a detecção do RABV em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados

### 4.9.2 Teste exato de Fisher

No quadro 16 estão demonstrados os resultados obtidos no teste exato de Fisher para a proporção de positivos detectados pelas técnicas de hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR nos órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com o RABV.

| Lavado Cerebral/Órgãos/ Conteúdo Fecal | Teste Exato de Fisher |
|---|---|
| | **hnRT-PCR X *Real Time* RT-PCR P-valor*** |
| Lavado Cerebral | P=1,0 |
| Glândulas Salivares | P=1,0 |
| Bexiga | P=0,7065 |
| Rins | P=0,2542 |
| Pulmões | P=0,0596 |
| Conteúdo Fecal | P=1,0 |

*P-valor do Teste exato de Fisher

Quadro 16 – Resultados em P valor do teste exato de Fisher aplicado para avaliar a proporção de positivos detectados pelas técnicas de hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR nos órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados com o RABV

# 5 DISCUSSÃO

A utilização de métodos sensíveis e específicos para o diagnóstico da raiva é uma importante ferramenta para o controle e profilaxia da doença. O diagnóstico laboratorial da raiva é realizado utilizando as técnicas de identificação viral (IFD) e isolamento viral (IVC e IVCC) recomendadas pela OMS (WHO, 1992). A detecção direta do antígeno pela IFD é o método de triagem diagnóstica mais amplamente utilizado, e com maior rapidez, sensibilidade e especificidade (MAYEN, 2003). Portanto, neste estudo a IFD foi utilizada como técnica de triagem para os espécimes de morcegos que serviram de amostras positivas (Quadro 2).

A disseminação do vírus da raiva para os diversos órgãos se dá com a progressão do quadro clínico da doença (BRASIL, 2008) e pelo fato do vírus circulante em um reservatório ser mantido em baixas concentrações para permitir a infecção e a manutenção na espécie que o alberga (ANDERSON; MAY, 1982). Por este motivo amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal os quais podem ter menor concentração viral, foram utilizadas para o isolamento viral em cultivo de células N2A para evidenciar a presença de vírus infectante nessas amostras de morcegos do gênero *Artibeus* naturalmente infectados.

A importância do isolamento viral está na capacidade de detectar o vírus da raiva em amostras com pequenas concentrações virais (RUDD; TRIMARCHI, 1989). O isolamento do vírus da raiva em cultura de células é uma técnica que vem sendo bem desenvolvida e tem sido utilizada para o diagnóstico da raiva, no Laboratório de Virologia da Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur (credenciado oficialmente pelo Ministério da Saúde como Laboratório de Referência Nacional), com sucesso em amostras de SNC provenientes de morcegos (CASTILHO et al., 2007). Scheffer et al. (2007) ao pesquisarem vírus da raiva em órgãos de morcegos naturalmente infectados no Estado de São Paulo conseguiram isolar vírus de 10 órgãos e tecidos diferentes por meio do IVCC.

No presente estudo, das amostras obtidas a partir de lavado cerebral inoculadas em cultura de células N2A originadas de morcegos do gênero *Artibeus* previamente diagnosticados positivos pela técnica de IFD, 28 (93.33%) foram positivas. O fato de terem 2 amostras diagnosticadas negativas por essa técnica talvez se deva ao fato de os morcegos terem sido manipulados previamente para a

retirada do SNC utilizado na rotina do diagnóstico e por terem permanecido em temperatura de -20ºC causando uma considerável perda de infectividade viral conforme ressalta Webster (1986).

Devido à falta de trabalhos utilizando lavado cerebral para diagnóstico da raiva os resultados encontrados foram comparados com estudos realizados com SNC de morcegos. O resultado de 93,33% de positividade mostra uma percentagem inferior à encontrada por Castilho et al. (2007) que ao compararem, pelas técnicas de IFD, inoculação intracerebral em camundongos e inoculação em cultura de células, 50 amostras de encéfalo de morcegos de diversas espécies tiveram 100% de concordância entre as técnicas. No entanto esse percentual foi maior quando comparado com os achados de Scheffer (2005) que utilizou 33 encéfalos de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e encontrou 66,67% de positividade e Scheffer et al. (2007) que obtiveram 83,6% de resultados positivos utilizando o encéfalo inteiro de morcegos de diversos hábitos alimentares. Esses resultados mostram que é possível utilizar o lavado da calota craniana de morcegos como amostra para o diagnóstico da raiva caso o SNC já tenha sido usado ou no caso de perda do encéfalo devido a algum dano ao crânio causado durante a captura do morcego.

A viabilidade em isolar o vírus da raiva em cultura celular depende da concentração de vírus presente na amostra testada (TOLLIS et al., 1988). Em relação aos órgãos pesquisados neste trabalho, as glândulas salivares foram as que tiveram maior percentagem de positividade depois do lavado cerebral com 36,67%, resultados semelhantes em relação à positividade aos encontrados por Scheffer (2005) que relatou positividade de 33,33% em IVCC de 33 morcegos do gênero *Artibeus*. Esse resultado reforça que a principal via de transmissão do RABV entre os morcegos é pela mordedura.

Amostras obtidas a partir da bexiga urinária tiveram positividade de 16,67%, superando os 3% achados por Scheffer (2005) representados por um único isolamento de bexiga urinária dos 33 morcegos do gênero *Artibeus*. Esse resultado reforça a provável ocorrência da presença de vírus infectante na urina, a qual poderia representar mais uma via de eliminação para o vírus da raiva deste reservatório, que contribuiria para a permanência do vírus nas poeiras e aerossóis em ambientes fechados, como cavernas que abrigam grande número desses animais.

As suspensões provenientes dos rins e pulmões não apresentaram positividade na técnica de IVCC, resultado esse não concordante com os encontrados por Scheffer et al. (2007) que obtiveram 16,67% de positividade nos rins e 48,83% nos pulmões de morcegos de diversas espécies. Este fato pode ter ocorrido em decorrência do baixo título de vírus no tecido original ou pelo fato de neste estudo as amostras desses tecidos terem sido testados em uma diluição 1:10 (P/V) enquanto no estudo realizado por Scheffer et al. (2007) as suspensões de rins e pulmões foram diluídas 1:5 (P/V). Como as células são suscetíveis à contaminações e lise por bactérias, fungos, outros vírus e devido às toxinas presentes nos tecidos e órgãos suspeitos, deve-se também utilizar antibióticos adequados e em quantidade suficiente no meio de cultura para aumentar a resistência contra as contaminações bacterianas (WEBSTER; CASEY, 1988). Webster e Casey (1996) relataram que apesar do tecido cerebral ser o preferido para o isolamento viral em células, outros tecidos ou fluídos podem ser usados para o IVCC, entretanto é recomendado a utilização de uma suspensão a 1%, para obtenção de maior concentração viral em tecidos não nervosos.

Em relação ao conteúdo fecal, o isolamento viral em cultura celular só foi possível em uma suspensão. Esse fato pode ser explicado pela grande variedade de interferentes encontrados nesse substrato, que podem influenciar na infecção das células pelo vírus, talvez o aumento da concentração de antibióticos poderia contribuir para a eliminação de possíveis contaminações bacterianas. Entretanto mais estudos utilizando conteúdo fecal deverão ser realizados, pois essa pode ser uma via de eliminação pouco conhecida do vírus da raiva. Outra possibilidade pode estar relacionada com a filtração da suspensão, pois segundo Webster e Casey (1996) filtrações de suspensões de tecidos para a remoção de contaminates podem reduzir a quantidade de vírus viáveis.

Vários fatores como a contaminação da amostra, preservação e armazenamento podem afetar a sensibilidade do IVCC (WEBSTER; CASEY, 1996). Sendo assim, métodos de aplicação de tecnologia molecular como RT-PCR, hnPCR e Real Time RT-PCR, devido a rapidez, sensibilidade e confiabilidade tem sido, frequentemente utilizados para o diagnóstico da raiva (ORLOWSKA et al., 2008).

A quantificação de RNA foi realizada para verificar a eficiência do método de extração utilizado neste estudo, para isso utilizou-se dois *kits* específicos para RNA total, porém com capacidades de quantificações diferentes. Segundo Rojas et al.

(2006) essa ferramenta é importante para verificar se o método de extração do RNA total é eficiente e também para determinar a estabilidade do ácido nucléico, antes de aplicar o PCR para o diagnóstico, pois o RNA pode ser facilmente degradado pela ação de RNAses presentes no ambiente.

O quadro 12 mostra que as amostras com maior concentração de RNA total eram as de lavado cerebral, glândulas salivares e conteúdo fecal talvez isso ocorra devido a grande quantidade de células presentes nesses órgãos e no conteúdo fecal. As amostras de bexigas tinham a menor concentração de RNA total possivelmente por ser um órgão muito pequeno e com menos quantidade de células quando comparado com os demais órgãos. A quantificação do RNA total também é utilizada para a uniformização da quantidade de RNA a ser colocada na reação de RT-PCR, porém neste estudo não foi possível observar padrões que possibilitassem determinar um ponto de corte. Amostras que tiveram baixas concentrações de RNA total foram diagnosticadas positivas e algumas que tiveram altas concentrações foram diagnosticadas negativas.

Como essa quantificação de RNA era específica para RNA total, ou seja, o RNA encontrado tanto no vírus como nas células, foi utilizado um *kit* específico para DNA de fita simples para poder quantificar o cDNA viral produzido na transcrição reversa. No quadro 13 nota-se que àquelas amostras que tinham altas concentrações de RNA total também obtiveram altas concentrações de cDNA, sendo estas as amostras de lavado cerebral, glândulas salivares e conteúdo fecal, entretanto também não foi possível verificar uma correlação entre positividade e concentração de cDNA.

A detecção do vírus da raiva utilizando a técnica de RT-PCR tem sido descrita por diversos autores (HEATON et al., 1997; CREPIN et al., 1998; PICARD-MEYER et al., 2004; VÁZQUEZ-MORÓN; AVELLÓN; ECHEVARRÍA, 2006; CARNIELI JR et al. 2006, 2008) e sua eficiência por sua elevada sensibilidade analítica tem sido reconhecida (BORDIGNON et al., 2005). Porém resultados falso-negativos podem acontecer quando o teste for realizado diretamente em amostras clínicas sem o isolamento viral anterior em função de eventuais títulos virais baixos (FAHL, 2009). Para este estudo no qual foram utilizados diversos tecidos e órgãos para a detecção do vírus da raiva, podem ter ocorrido resultados falso-negativos na técnica de RT-PCR a qual diagnosticou positivas somente 40 amostras das 180 analisadas, resultando em uma sensibilidade de 56,25%. Conforme mostra a tabela

2 das 40 amostras diagnosticadas positivas, 29 foram àquelas obtidas a partir do lavado cerebral, 10 de glândulas salivares e 01 de rins demonstrando a necessidade de um pré-tratamento da amostra ou o uso de outros métodos de extração para amostras provenientes de órgãos ou tecidos não nervosos.

A tabela 3 mostra os resultados positivos obtidos pela técnica de hnRT-PCR no diagnóstico das mesmas amostras e das 180 amostras analisadas, 142 foram positivas, tendo portanto uma sensibilidade de 82,57%. Esses resultados confirmam que a habilidade para detectar o RABV, em amostras clínicas, pode ser aumentada com o uso de uma segunda etapa de amplificação conforme Heaton et al. (1997) sugeriram. Porém deve-se levar em conta que este procedimento pode aumentar o risco de resultados falso-positivos devido à contaminação de DNA (ORLOWSKA et al., 2008), portanto é necessária a utilização de procedimentos de controle que possam indicar se houve ou não contaminação.

Além disso, as técnicas de RT-PCR e hnRT-PCR possuem algumas limitações, uma das quais é a correta interpretação de um resultado negativo, o qual pode ser realmente negativo, sem a presença da sequência alvo na reação, ou pode ser um resultado falso-negativo (SMITH et al., 2000; HOORFAR et al., 2004). Os resultados falso-negativos podem acontecer devido a presença de enzimas ou substâncias inibidoras, degradação da amostra, erro humano, mau funcionamento do termociclador, preparo incorreto dos reagentes, baixa atividade da DNA polimerase ou ação de nucleases endógenas (SMITH et al., 2000; DINGLE; CROOK; JEFFERY, 2004; HOORFAR et al., 2004).

A fim de aumentar a confiança nos resultados negativos das reações de RT-PCR e hnRT-PCR, alguma forma de controle interno é necessária (SMITH et al., 2000). Tais controles permitem monitorar a extração, a transcrição reversa, a amplificação e as etapas de detecção e assim distinguir os resultados negativos verdadeiros dos falso-negativos (DINGLE; CROOK; JEFFERY, 2004). Neste estudo foi utilizado o IPC como controle interno positivo endógeno para as reações de *Real Time* RT-PCR. Talvez o uso de um controle interno também nas reações de RT-PCR e hnRT-PCR permitiriam a observação de resultados falso-negativos obtidos neste trabalho, aumentando assim a sensibilidade destas técnicas.

Na técnica de *Real Time* RT-PCR a sensibilidade foi de 82,19%, pois esta técnica diagnosticou positivas 141 amostras das 180 analisadas conforme mostra a tabela 4. Portanto a sensibilidade das técnicas hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR

foram muito semelhantes. Esta semelhança também é verificada quando aplicado o teste exato de Fischer para a comparação das proporções de positivos detectados por ambas as técnicas onde se pode observar que para todos os órgãos os resultados foram que a proporção de positivos detectados pela técnica de hnRT-PCR foi igual a proporção detectada pela técnica de *Real Time* RT-PCR. Os resultados com maior número de P foram em lavado cerebral, glândulas salivares e conteúdo fecal (P=1,0), seguido por bexiga (P=0,7065), rins (0,2542) e por último pulmões (0,0596), ficando todos acima de 5%.

Quando as três técnicas são comparadas (gráfico 2; quadro 15) verifica-se que apenas nas amostras obtidas a partir de lavado cerebral houve uma semelhança na sensibilidade das técnicas, sendo 97% na RT-PCR e 100% nas técnicas de hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR, demonstrando que se para o diagnóstico de animais suspeitos não tiver o SNC inteiro, o lavado cerebral pode ser utilizado para o diagnóstico da raiva pelas técnicas moleculares.

Na detecção do vírus nas amostras de glândulas salivares, bexiga e rins verifica-se uma maior sensibilidade na técnica de *Real Time* RT-PCR em relação à hnRT-PCR (Quadro 15), porém nas amostras de pulmão essa relação se inverteu, sendo a sensibilidade da hnRT-PCR de 81% enquanto que na reação de *Real Time* RT-PCR foi de 67%. Nas amostras de conteúdo fecal a sensibilidade de ambas as técnicas foi de 64%.

As amostras originárias do conteúdo fecal foram as que tiveram maiores problemas para o diagnóstico da raiva em ambas as técnicas confirmando que o conteúdo fecal constitui uma das mais complexas amostras biológicas que causam problemas às técnicas de amplificação usadas como métodos diagnósticos, não só por causa da presença de grande variedade de bactérias, mas também devido à presença de diferentes tipos de produtos degradados de alimentos o que podem causar inibição das reações (WILDE; EIDEN; YOLKEN, 1990; MONTEIRO et al., 1997). O uso de kits específicos para extração com purificação deste tipo de amostra poderia minimizar o efeito inibidor causado por amostras de conteúdo fecal.

Quanto à positividade na técnica de RT-PCR nas amostras obtidas a partir do lavado cerebral foi de 96,67%, em glândulas salivares de 33,33% e rins de 3,33%. Nenhuma das amostras de bexiga, pulmões e conteúdo fecal foram diagnosticadas positivas pela técnica de RT-PCR. Estes resultados se mostraram em desacordo com os achados de Allendorff et al. (2010a) que ao estudarem 26

morcegos de diferentes espécies encontraram 100% de positividade em cérebros e glândulas salivares, 47% em bexigas, 31% em rins, 35% em pulmões e 8% em conteúdo fecal. Alguns fatores que podem ter influenciado para essa discordância podem ser devido às diferenças na utilização dos pares de *primers*, do método de extração do RNA total ou simplesmente na concentração viral presente nos órgãos.

Analisando a positividade da técnica de hnRT-PCR verificou-se 100% em lavado cerebral, 90% nas glândulas salivares, 83,33% nas bexigas, 80% nos rins, 76,67% nos pulmões e 43,33% em conteúdo fecal. Quando comparado com o estudo realizado por Allendorff et al. (2010b) que pesquisaram a distribuição do vírus da raiva em órgãos e tecidos de 13 espécimes de morcegos frugívoros, apenas a positividade relacionada as amostras de glândulas salivares foram inferiores às encontradas no presente estudo. Os pesquisadores encontraram 100% de positividade em cérebro e glândulas salivares, 42% em bexigas, 38% em rins, 31% em pulmões e 20% nas amostras de conteúdo fecal.

Os resultados encontrados neste estudo pela técnica de hnRT-PCR concordam com a afirmação de Lima et al. (2005b) de que hnRT-PCR permite a detecção da presença do vírus da raiva, de uma maneira eficiente, em tecidos extraneurais podendo ser utilizada em estudos de patogênese viral.

A sensibilidade das técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e *Real Time* RT-PCR também foram avaliadas por meio da determinação do limiar de detecção da amostra de campo utilizada como controle positivo para as reações de *Real Time* RT-PCR. Este estudo mostrou que a sensibilidade tanto da RT-PCR quanto da hnRT-PCR foram semelhantes detectando o vírus até a diluição $10^{-3}$, diferentemente dos estudos de Heaton et al. (1997) e Orlowska et al. (2008) que mostraram que a hnRT-PCR foi 10 vezes mais sensível que a RT-PCR. Orlowska et al. (2008) também compararam a sensibilidade entre a hnRT-PCR e a *Real Time* RT-PCR e encontraram que a *Real Time* RT-PCR foi 100 vezes mais sensível que a hnRT-PCR. No presente estudo a técnica de *Real Time* RT-PCR detectou até a diluição $10^{-4}$ sendo a sensibilidade encontrada 10 vezes maior que na hn RT-PCR, porém a amostra usada neste estudo para a realização deste teste obteve o título de $10^{-4.63}$ $DLIC_{50}$/0,03mL, portanto não foi possível verificar ao certo quantas vezes mais a técnica de *Real Time* detectaria a presença do RABV.

Para a realização da técnica de *Real Time* RT-PCR neste estudo foi necessário obter *primers* específicos para a AgV encontrada em morcegos do

gênero *Artibeus*. Delpietro et al. (1997) em estudo com AcM, relataram que isolados de RABV de morcegos frugívoros *A. lituratus* eram antigenicamente relacionados com a variante de morcegos hematófagos (AgV3). Para a confirmação de que os morcegos utilizados neste estudo estavam infectados com a AgV3 fez-se a tipificação antigênica dos 30 espécimes de morcegos sendo que 96,67% (29) foram compatíveis com a AgV3 típica de morcego hematófago *Desmodus rotundus*.

O par de *primers* e a sonda (K1, K2 e KP) foram desenhados a partir de uma sequência consenso de 499 nt gerada de um alinhamento com 35 amostras de animais infectados com a AgV3. Para este estudo os *primers* e sonda utilizados se mostraram eficiente para a detecção do RABV em amostras de lavado cerebral, glândulas salivares, bexigas e rins de morcegos do gênero *Artibeus* nas reações de *Real Time* RT-PCR. A detecção também foi possível nas amostras de pulmão e conteúdo fecal, porém nessas amostras a quantidade de detecção foi menor, sendo 15 em pulmões e 13 em conteúdo fecal. Esse fato pode ser explicado pela possível presença de substâncias inibitórias presentes nestes tipos de amostras.

A possível interferência causada pelas amostras de lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal utilizadas neste estudo foi demonstrada na figura 10 a qual mostra que o lavado cerebral, rins e pulmões causaram uma leve interferência no início da amplificação do IPC, com os ciclos de amplificação de 31,79, 30,39 e 30,41 respectivamente. As amostras de conteúdo fecal causaram grande interferência não permitindo a amplificação do IPC e as amostras de glândulas salivares e bexigas não causaram interferência tendo os ciclos de amplificação de 29,20 e 29,08 semelhante ao do controle negativo que foi de 29,47. Além da presença de substâncias inibitórias da reação este fato também poderia ser explicado por ter utilizado o método do *TRIzol*® na extração dessas amostras e a possível presença de resíduos de fenol no RNA extraído poderia interferir na correta emissão de fluorescência[4].

Os resultados das reações de *Real Time* RT-PCR foram analisados levando-se em conta o gráfico de presença ou ausência do vírus e cada amostra foi analisada individualmente pelo gráfico de amplificação (*amplification plot*). A figura 5 mostra as diferenças encontradas nas reações a partir das diversas amostras testadas. Nas amostras de lavado cerebral todas as amostras foram diagnosticadas

[4] Informação obtida pelo suporte técnico da *Applied Biosystems*™

positivas e esse resultado pode ser observado na figura 5A. Na figura 5B, C, D, E e F pode-se observar que algumas reações foram diagnosticadas como indeterminadas e o resultado final foi determinado pela análise do gráfico de amplificação. As amostras que amplificaram foram consideradas positivas e as que não amplificaram foram consideradas negativas (Quadro 14). As amostras que amplificaram, mas o IPC não amplificou foram consideradas positivas, pois a não amplificação do IPC pode ocorrer devido a grande quantidade do patógeno alvo, nesse caso o RABV, que pode interferir na amplificação do IPC, porém essa não amplificação não interfere no resultado positivo da amostra (Figura 7)[5].

Outro parâmetro observado na análise da reação de *Real Time* RT-PCR foi o gráfico de multicomponente que mostra a emissão da fluorescência (Figura 9). Observa-se que as amostras que tiveram a maior emissão de fluorescência foram as provenientes do lavado cerebral, seguidas das amostras de glândulas salivares, rins, bexigas. As amostras de pulmão e conteúdo fecal foram as que tiveram menor e mais tardia emissão de fluorescência. A mesma figura mostra ainda que devido ao fluoróforo utilizado, a emissão da fluorescência do controle IPC é baixa e o aumento do sinal em algumas amostras é mais tardio, porém seguem um mesmo padrão. E a fluorescência ROX também foi avaliada, estando presente em todas as reações e nunca deve amplificando, pois se trata do controle negativo da reação.

Em relação à positividade da reação de *Real Time* RT-PCR as amostras de lavado cerebral foram 100% diagnosticadas para RABV, seguido das glândulas salivares e rins com 93,33, bexiga com 90%, pulmões com 50% e conteúdo fecal com 43,33%. Esse resultado demonstra que essa técnica pode ser usada como uma ferramenta complementar no diagnóstico do RABV, principalmente em amostras de SNC, glândulas salivares, rins e bexiga.

Após as amostras de lavado cerebral serem diagnosticadas positivas nas técnicas moleculares foi realizado o sequenciamento das mesmas para confirmação da identidade genética a qual mostrou que todas eram características de *D. rotundus*.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que tanto as técnicas de hnRT-PCR como *Real Time* RT-PCR podem ser utilizadas como métodos complementares para o diagnóstico da raiva e são sensíveis o bastante para o uso

[5] Informação obtida pelo suporte técnico da *Applied Biosystems*™

em estudos de patogênese. Além disso, a técnica de *Real Time* RT-PCR vem sendo desenvolvida para a detecção e quantificação do RABV, porém ainda são poucos os trabalhos que utilizam essa técnica para investigação da distribuição deste vírus em diferentes tecidos, órgãos ou secreções das diversas espécies de mamíferos que podem ser infectados pelo RABV.

A técnica de *Real Time* RT-PCR realizada neste estudo se mostrou eficiente em detectar o RABV em diferentes órgãos e tecidos extraneurais com a vantagem de ser uma técnica mais rápida e sensível e por conseguir detectar o RABV em baixas concentrações virais, além disso, quando comparada com o hnRT-PCR, o *Real Time* RT-PCR tem menor possibilidade de contaminação.

O desenvolvimento desse trabalho contribuiu também para a implantação da técnica de *Real Time* RT-PCR no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur, sendo de extrema importância principalmente para confirmação do diagnóstico *ante-mortem*.

χονχλυσJ εσ----------CONCLUSÕES

# 6 CONCLUSÕES

- Detectou-se vírus da raiva de amostras obtidas a partir do lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos, frugívoros, do gênero *Artibeus,* por meio das técnicas de RT-PCR, hnRT-PCR e de *Real Time* RT-PCR, as quais podem ser utilizadas como técnicas complementares para o diagnóstico da raiva e também podem ser usadas para estudos da patogênese viral.
- A comparação entre as técnicas quanto à sensibilidade foi de 56,25% para a RT-PCR, 82,57% para a hnRT-PCR e 82,19% para a *Real Time* RT-PCR, portanto as técnicas que tiveram maior sensibilidade para a detecção do em lavado cerebral, órgãos e conteúdo fecal de morcegos do gênero *Artibeus* foram a hnRT-PCR e a *Real Time* RT-PCR. Os resultados encontrados no teste exato de Fisher mostram que a proporção de positivos detectados pela técnica de hnRT-PCR foi igual a proporção detectada pela técnica de *Real Time* RT-PCR.

ρεφερ| νχιασ

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS[6]

ACHA, P. N. Epidemiology of paralytic rabies and bat rabies. **Boletín de la Oficina International de Epizootias**, v. 67, n. 3-4, p. 343-382, 1967.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermidades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. v. 2, 425 p.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al. hombre y a los animales.** 2. ed. Washington, D.C, Organización Panamericana de la Salud, 1986. p. 502-526 (OPS_Publicacion Científica, 503).

ALLENDORF, S. D.; ALBAS, A.; ANTUNES, J. M. A. P.; APOLINÁRIO, C. M.; PERES, M. G.; MEGID, J. Rabies detection in bats tissues: comparison of RT-PCR and hnRT-PCR. In: RITA – RABIES IN THE AMERICAS, 21., 2010a. **Anais…** Guadalajara, México. 2010a. 1 CD-ROM.

ALLENDORF, S. D.; ALBAS, A.; ANTUNES, J. M. A. P.; APOLINÁRIO, C. M.; PERES, M. G.; MEGID, J. Rabies virus in naturally infected bats in the state of São Paulo, In: RITA – RABIES IN THE AMERICAS, 21., 2010b. **Anais…** Guadalajara, México. 2010b. 1 CD-ROM.

AMEYAMA, S.; TORIUMI, H.; TAKAHASHI, T.; SHIMURA, Y.; NAKAHARA, T.; HONDA, Y.; MIFUNE, K.; UCHIYAMA, T.; KAWAI, A. Monoclonal antibody 3-9-16 recognizes one of the two isoforms of rabies virus matrix protein that exposes its N-terminus on the virion surface. **Microbiology and Immunology,** v. 47, n. 9, p. 639-651, 2003.

AMORIM, A. F.; SILVA, R. A.; SILVA, N. M. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro, *Histiotus velatus*, capturado no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 433-435, 1970.

ANDERSON, R.; MAY, R. Coevolution of hosts and parasites. **Parasitology**, v. 85, p. 411-426, 1982.

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

---

[6] Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003, 84 p.

ARELLANO-SOTA, C.; SUREAU, P.; GREENHAL, A. M. Preferência de la predación del vampiro a la edad y la raza del ganado y la época del año. **Técnica Pecuária**, v. 17, p. 23-29, 1971.

AWASTHI, M.; PARMAR, H.; PATANKAR, T.; CASTILLO, M. Imaging findings in rabies encephalitis. **AJNR - American Journal of Neuroradiology**, v. 22, n. 4, p. 677-680, 2001.

BAER, G. M. Rabies in nonhematophagous bats. In:_____**The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 2, p. 79-97.

BERAN, G. W. (Ed.).Rabies and Infections by Rabies-related Viruses. 2 ed. In:_____**Handbook of zoonoses**. Boca Raton: CRC Press, 1994. Section B, p. 307-357.

BERNARDI, F.; GOMES, A. A. B.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Raiva em morcego hematófago. **Ars Veterinaria**, v. 14, n. 2, p. 186-192, 1998.

BIGLER, W. J.; HOFF, G. L.; BUFF, E. E. Chiropteran rabies in Florida: A twenty-year, 1954 to 1973. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v 24, p. 347-352, 1974.

BINGHAM, J. The bat lyssaviruses of Africa. In: SEARG meeting, 6., 2001, Lilongwe, Malawi. 2001. p. 74-79.

BLACK, E. M.; MCELHINNEY, L. M.; LOWINGS, J. P.; SMITH, J.; JOHNSTONE, P.; HEATON, P. R. Molecular methods to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat lyssaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 87, p. 123-131, 2000.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relatório da Reunião para Coordenadores Estaduais do Programa da Raiva, 2009.** [online]. Disponível em: URL:http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm. Acesso em 1 dez. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. A raiva. In: _____. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da raiva.** Brasília. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008. p. 11-28.

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

BRATS. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologia. Glossário. 2007. 2p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/brats/BRATS3glsrio.pdf, Acesso em: [julho 2011].

BREDT, A.; UIEDA, W. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, Mid-western Brazil. **Chiroptera Neotropical**, v. 2, n. 2, p. 54-57, 1996.

BRIGGS, D.; HANLON, C. A. World rabies day 7: focusing attention on a neglected disease. **Veterinary Record,** v. 161, n. 9, p. 288-289, 2007.

CANADIAN FOOD AND INSPECTION SERVICE. **Countries recognized as rabies free for domestic cats and dogs.** 2008. Disponível em: http://www.inspection.gc.ca/english/anima/imp/petani/coupaye.shtml. Acesso em: [maio 2010].

CAPORALE, G. M. M.; SILVA, A. C. R.; PEIXOTO, Z. M. P.; CHAVES, L. B.; CARRIERI, M. L.; VASSÃO, R. C. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. **Journal of Clinical Laboratory Analysis,** v. 23, n. 1, p. 7-13, 2009.

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

CARNEIRO, V. As epizootias de raiva na América e o papel dos morcegos hematófagos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 7, p. 273-321, 1936.

CARNEIRO, A. J. B.; FRANKE, C. R.; STÖCKER, A.; SANTOS, F.; SÁ, J. E. U.; MORAES-SILVA, E.; ALVES, J. N. M.; BRÜNINK, S.; CORMAN, V. M.; DROSTEN, C.; DREXLER, J. F. Rabies vírus RNA in naturally infected vampire bats, Northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 2004-2005, 2010.

CARNEIRO, V.; FREITAS LIMA, C. Estudos sobre a raiva no Paraná. **Revista de Zootecnia e Veterinária**, v. 3, n. 13, p. 137-156, 1927.

CARNIELI JR, P.; MACEDO, C. I.; KOTAIT, I.; CASTILHO, J. G.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 120, n. 1-2, p. 113-120, 2006.

CARNIELI JR, P.; FAHL, W. O.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; OLIVEIRA, R. N.; KOTAIT, I. Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 131, n. 1, p. 33-46, 2008.

CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Archives of Virology**, v. 155, p. 133-146, 2010.

CASTILHO, J. G.; IAMAMOTO, K.; LIMA, J. Y. O.; SCHEFFER, K. C.; CARNIELIE JR, P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; ACHKAR, S. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 47, p. 12-18, 2007.

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

CHILDS, J. E.; REAL, L. A. Epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 123-199.

COLEMAN, P. G.; FÉVRE, E. M.; CLEAVELAND S. Estimating the public health impact of rabies. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 140-142, 2004.

CONSTANTINE, D. G. Bat rabies in the southwestern United States. **Public Health Reports**, v. 82, p. 867-888, 1967.

CONSTANTINE, D. G. Health precautions for bat researchers. In: KUNZ, T. H. **Ecological and behavioral methods for the study of bats.** Washington: Smithsonian Inst. Press, 1988. p. 491-528.

CONSTANTINE, D. G. Rabies transmission by non bite route. **Public Health Reports**, v. 77, p. 287-289, 1962.

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y.; GACOIN, A.; CAROFF, C.; BOURHY, H. Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1117-1121, 1998.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. Fluorescent antibody test. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWISKI, H. **Laboratory techiniques in rabies** Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-95.

DELPIETRO, H. A.; GURY-DHOMEN, F.; LARGHI, O. P.; MENA-SEGURA ,C.; ABRAMO, L. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. **Zentralbl Veterinarmed B.,** v. 44, n. 8, p. 477-483, 1997.

DE MATTOS, C. C.; DE MATTOS, C. A. Uso de anticuerpos monoclonales para La tipificación antigénica da aislamientos de virus rábico. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Consorcio de La OPS de laboratorios de referencia en rabia de las Américas.** Washington, DC Bases para la operación. HCP/HCV/R2/015, 1998. p. 2-11.

DE MATTOS, C. A.; DE MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **FIELDS Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins; 2001. p. 1245-1278.

DIAZ, A. M.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. **Journal of veterinary mededicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health,** v. 41, p. 153-160, 1994.

DIETZSCHOLD, B.; LI, J.; FABER, M.; SCHNELL, M. Concepts in the pathogenesis of rabies. **Future Virology**, v. 3, n. 5, p. 481-490, 2008.

DINGLE, K. E.; CROOK, D.; JEFFERY, K. Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1003-1011, 2004.

DODET, B. Preventing the incurable: Asian rabies, experts advocate rabies control. **Vaccine.** v. 24, n. 6, p. 3045-3049, 2006.

FAHL, W. O. **Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero Artibeus e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G.** 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. The negative sense single stranded RNA viruses. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of viruses. 1. ed. San Diego; London: Elsevier

Academic Press. 2005. Pt. 2, p.609-738. (Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses).

FEKADU, M.; GREER, P. W.; CHANDLER, F. W.; SANDERLIN, D. W. Use of the avidin-biotin peroxidase system to detect rabies antigen in formalin-fixed paraffinembedded tissues. **Journal of Virological Methods**, v. 19, n. 2, p. 91-96, 1988.

FENTON, M. B. **Bats.** New York: Facts on File, 1992. 207p.

FOOKS, A. R.; BROOKES, S. M.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L. M.; HUTSON, A. M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiology and Infection,** v. 131, n. 3, p. 1029-1039, 2003.

GALETTI, M.; MORELLATO, L. P. C. Diet of the large fruit-eating bat *Artibeus lituratus* in a fragment in Brazil. **Mammalia**, v. 58, n. 4, p. 661-665, 1994.

GARDNER, A. L. Feeding Habits. In: BAKER, R. J.; JONES-JR, J. K.; CARTER, D. C. (Ed.). **Biology of bats of the New World, Family Phyllostomidae. Part II.** Texas: Special Publication of the Museum, Texas Tech University, 1977. v. 13, p. 239-350.

GLYNN, B.; LAHIFF, S.; WERNECKE, M.;BARRY, T.; SMITH, T.J.; MAHER, M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 126-139, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMIR, A. N.; MOSER, G. Immunoperoxidase test for rabies: utility as a diagnostic test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 148–152, 1994.

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.

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

HILL, J. E.; SMITH, S. E. **Bats:** a community perspective. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1988; 167p.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFLAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' – 3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,USA, v. 88, n. __, p.7276-7280, 1991.

HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Practical considerations in desing of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1863-1868, 2004.

HUGHES, G. J.; SMITH, J. S.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C. E. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: Influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 299-306, 2004.

HURST, E. W.; PAWAN, J. L. An outbreak of rabies in Trinidad. **Lancet**, v. __, n. 2, p. 622-628, 1931.

HUTSON, A. M.; MICKLEBURGH, S. P.; RACEY, P. A. **Microchiropteran bats:** global status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Chiroptera Specialist Group. Gland, Switzerland: IUCN, 2001. 258p.

ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. USA: ICTV. 2009. Disponível em: http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009. Acesso em: [2010 May 21].

JACKSON, A. Pathogenesis. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H.(Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 246-282.

KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMORE, R.; TIRAWATNPONG, G.; PANPANICH, T.; HEMACHUDHA, T. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 207-210, 1993.

KAPLAN, G.; TURNER, G. S.; WARREL, D. **Rabies:** the facts. 2nd ed. Oxford; New York: Oxford University Press, 1986. p. 8-74. (Oxford Medical Publications).

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies.** 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 3-8.

KING, A. European bat rabies. In: SEARG meeting, 6., 2001, Lilongwe, Malawi. 2001, p. 96-100.

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

KISSLING, R. E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 98, p. 223-225, 1958.

KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. São Paulo: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001, 1466 p.

KOOPMAN, K. F. Biogeography of the bats of South America. In: MARES, M. A.; GENOWAYS, H. H. **Mammalian biology**. Pittsburgh: University of Pittsburgh, 1982. p. 273-302.

KOOPMAN, K. F. Systematics and distribution. In: GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U. **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press, Inc., 1988. p. 7-17.

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

KUCERA, P.; DOLIVO, M.; COULON, P.; FLAMAND, A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. **Journal of Virology,** v. 55, n. 1, 1985, p. 158-162.

KUZMIN, I. V.; BOTVINKIN, A. D.; KHABILOV, T. K. The lyssavirus was isolated from a whiskered bat in northern Tajikistan. **Plecotus**, v. 4, p. 75-81, 2001.

KUZMIN, I. V.; MAYER, A. E.; NIEZGODA, M.; MARKOTTER, W.; AGWANDA, B.; BREIMAN, R. F.; RUPPRECHT, C. E. Shimoni bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. **Virus Research**, v. 149, n. 2, p.197-210, 2010.

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

LAFON, M.; WIKTOR, T. J. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and nonstructural protein. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 2125-2133, 1985.

LANGEVIN, C.; JAARO, H.; BRESSANELLI, S.; FAINZILBER, M.; TUFFERAU, C. Rabies vírus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37655-37662, 2002.

LARGHI, O. P.; NEBEL, A. E.; LAZARO, L. SAVY, V. L. Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylamino ethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, p. 243-245, 1975.

LÉPINE, P.; ATANASIU, P. Histopathological diagnosis. In: MESLIN, FX.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies.** 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 66-79.

LEVADITI, M. C. Virus rabique et culture dês cellules in vitro. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de sés Filiales**, v. 75, p. 505, 1913.

LEWIS, P.; FU, Y.; LENTZ, T. L. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve–muscle cocultures**. Muscle & Nerve***,* v. 23, n. 5, p. 720–730, 2000.

LIMA, E. F.; RIET-CORREA, F.; DE CASTRO, R. S.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 250-264, 2005a.

LIMA, K. C.; MEGID, J.; SILVA, A. V.; CORTEZ, A. The heminested RT-PCR for the study of rabies virus pathogenesis. **Journal of Virological Methods**, v. 124, p. 79-85, 2005b.

LIMA, E. Q. A transmissão da raiva bovina pelo morcego hematophago *Desmodus rotundus*. **Brasil-Med**, v. 48, p. 38, 1934.

LUNA, G. L.; CHAHUAYO, L. M.; MARREROS, A. T. Diez casos de rabia humana em Pucallpa, Enero-Agosto 1984. **Diagnostico,** v. 15, p. 156-160, 1985.

MARTORELLI, L. F. A.; AGUIAR, E. A. C.; ALMEIDA, M. F. de; SILVA, M. M. S.; NOVAES, E. C. R. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Myotis nigricans*. **Revista da Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 140-141, 1995.

MARTORELLI, L. F. A.; AGUIAR, E. A. C.; ALMEIDA, M. F. de; SILVA, M. M. S.; NUNES, V. F. P. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro, *Lasyurus borealis*. **Revista da Saúde Pública**, v. 30, n. 1, p. 101-102, 1996.

MAYEN, F. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Disease and Veterinary Public Health**, v. 50, p. 469-472, 2003.

MCELHINNEY, L. M.; FOOKS, A. R.; RADFORD, A. D. Diagnostic tools for the detection of rabies virus. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v. 18, n. 3, p. 224-231, 2008.

MEBATSION, T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. **Journal of Virology,** v. 75, n. 23, p. 11496-11502, 2001.

MEBATSION, T.; WEILAND, F.; CONZELMANN, K. K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. **Journal of Virology,** v. 73, n. 1, p. 242-250, 1999.

MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H. **Laboratory techniques in rabies.** Geneva: World Health Organization, 1996. p. 9-27.

MESSENGER, S. L.; SMITH, J. S.; ORCIARI, L. A.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E. Emerging Pattern of Rabies Deaths and Increased Viral Infectivity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p.151–154, 2003.

MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; PETRY, K. G.; BONNET, J.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MÉGRAUD, F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 995-998, 1997.

MORIMOTO, K.; PATEL, M.; CORISDEO, S.; HOOPER, D. C.; FU, Z. F.; RUPPRECHT, C. E.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Characterization of a unique variant of bat rabies virus responsible for newly emerging human cases in North America. **Proceedings of the National Academy of Sciences** USA 93. p. 5653–5658, 1996.

MOSCOSO, L. M.; CREMER, H.; SANES, J. R. Organization and reorganization of neuromuscular junctions in mice lacking neural cell adhesion molecule, tenascin-C, or fibroblast growth factor-5. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 1465-1477, 1998.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURPHY, F. A.; BAUER, S. P. Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. **Intervirology**, v. 3, p. 256-268, 1974.

MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K.; WIN, W. C.; BAUER, S. P. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Infection of the central nervous system and centrifuged spread of virus to peripheral tissues. **Laboratory Investigation**, v. 29, p. 1-16, 1973.

NAGARAJ, T.; VASANTH, J. P.; DESAI, A.; KAMAT, A.; MADHUSUDANA, S. N.; RAVI, V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. **Journal of Clinical Virology**, v. 36, p. 17-23, 2006.

NEL, L. H. Mokola Virus: A brief review of the status quo. In: SEARG meeting, 6., 2001, Lilongwe, Malawi, 2001. p.80-86.

NILSSON, M. R.; NAGATA, C. A. Isolamento do vírus rábico do cérebro, glândulas salivares e interescapular, coração, pulmões e testículos de morcegos *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1910), no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 42, n. 23, p. 183-188, 1975.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. __, n. 33, p. 10-13, 2004.

NOWAK R. M. **Walker's mammals of the world**. 6. ed., Baltimore e London: The Johns Hopkins University Press, 1999. v. 1, 836p.

NOWAK R. M. **Walker's mammals of the world**. 5. ed., Baltimore e London: The Johns Hopkins University Press, 1991. v. 2, 1629p.

ORCIARI, L. A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; SHADDOCK, J. H.; SANDELIN, 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.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL. **Manual of diagnostic test and vaccines for animals**. 5th ed., 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00044.html> Accesso em: 30 jun. 2008.

ORLOWSKA, A.; SMRECZAK, M.; TREBAS, P.; ZMUDZINSKI, J. F. Comparison of real-time PCR and heminested RT-PCR methods in the detection of rabies virus infection in bats and terrestrial animals. **The Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy**, v. 52, p. 313-318, 2008.

PASSOS, E. C.; CARRIERI, M. L.; DAINOVSKAS, E.; CAMARA, M.; SILVA, M. M. S. Isolamento do vírus rábico em morcego insetívoro, *Nyctinomops macrotis*, no município de Diadema, SP (Brasil). **Revista da Saúde Pública,** v. 32, n. 1, p. 74-76, 1998.

PASSOS, E. C.; CARRIERI, M. L.; SILVA. M. M. S.; PEREIRA.; R.G.; MELO, J. A. T. S.; MAULE, L. J. Vírus rábico isolado de morcego frugívoro (*Artibeus lituratus*), capturado em 1997 no município de Rio Claro, SP. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v. 36, n. 1, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000100007, Acesso em: 25 jan 2004.

PASSOS, F. C.; SILVA, W. R.; PEDRO, W. A.; BONIN, M. R. Frugivoria em morcegos (Mammalia, Chiroptera) no Parque Estadual Intervales, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 3, p. 511-517, 2003.

PAWAN, J. L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 101-130, 1936a.

PAWAN, J. L. Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and the latency of infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 401-422, 1936b.

PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; FILHO, H. O. Ordem Chiroptera In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Ed.). **Mamíferos do Brasil.** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006, p. 162-164.

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 340-347, 1997.

PERL, D. P.; GOOD, P. F. The pathology of rabies in the central nervous system In: BAER, G. M. **The natural history of rabies.** 2nd ed. Boca Ratón: CRC Press, 1991. p. 164-188.

PICARD-MEYER, E.; BRUYÉRE, V.; BARRAT, J.; TISSOT, E.; BARRAT, M. J.; CLIQUET, F. Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific

determination of European bat Lyssavirus 1. Comparison with other rabies diagnostic methods. **Vaccine**, v. 22, p. 1921-1929, 2004.

PLOTKIN, S. A. Rabies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 4-12, 2000.

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

REED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percented end points. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REID, F. A. **A Field guide to the mammals of Central America and Southeast Mexico.** New York: Oxford University Press, 1997. 334 p.

REIS, N. R.; SHIBATTA, A. O.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Sobre os morcegos brasileiros. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Ed.). **Morcegos do Brasil.** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007. p.17-24.

RODRIGUES, F. M.; NAGATA, C. A.; PEIXOTO, Z. M. P.; NILSSON, M. R. Isolamento do vírus da raiva de morcego insetívoro *Molossus obscurus* (Geoffroy, 1805), no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 42, p. 193-196, 1975.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEZUTKA, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNÁNDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 306-319, 2007.

ROJAS, A. E.; LOZA-RUBIO, E; BANDA, R. V. M.; HERNANDÉZ, B. E. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 98-101, 2006.

ROSE, J. K.; WHITT, M. A. *Rhabdoviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; MARTIN, M. A.; LAMB, R. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (Ed.). **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 2849-2883.

RUDD, R. J.; SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; ORCIARI, L. A.; TRIMARCHI, C. V. A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: effect of cover-glass

mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. **Virus Research**, v. 111, p. 83-88, 2005.

RUDD, R. J.; TRIMARCHI, C. V. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street rabies virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1456-1458, 1987.

RUDD, R. J.; TRIMARCHI, C. V. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2522-2528, 1989.

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

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR techniques as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, n. 3, p. 229-240, 1991.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAZIMA, I.; FISCHER, W. A.; SAZIMA, M.; FISCHER, E. A. The fruit bat *Artibeus lituratus* as a Forest and city dweller. **Ciência e Cultura**, v. 46, n. 3, p. 164-168, 1994.

SCATTERDAY, J. E. Bat rabies in Florida. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 124, n. 923 p. 125, 1954.

SCHEFFER, K. C. **Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.** 2005. 110f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SCHEFFER, K. C.; CARRIERI, M. L.; ALBAS, A.; SANTOS, H. C. P.; KOTAIT I.; ITO, F. H. Rabies virus in naturally infected bats in the state of São Paulo, Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 389-395, 2007.

SCHNEIDER, M. C. Epidemiological situation of human rabies transmission by bats in Brazil. In: JOINT MEETING OF PAHO AND WHO, 1991, Washington/DC: PAHO/WHO, 1991. p. 1-8.

SCHNEIDER, M. C. **Estudo de avaliação sobre área de risco para a raiva no Brasil.** 1990. 229f. Tese (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública; Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1990.

SCHNEIDER, M. C.; ROMIJN, P. C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; DA SILVA, D. F.; BELOTTO, A.; DA SILVA, J. B.; LEANES, L. F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? **Revista Panamericana de la Salud Publica**, v. 25, n. 3, p. 260-269, 2009.

SCHNELL, M. J.; CONZELMANN, K. K. Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. **Virology,** v. 214, n. 2, p. 522-530, 1995.

SHANKAR, V.; DIETZSCHOLD, 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.

SILVA, L. H. Q. da; CUNHA, E. M. S.; PEDRO, W. A.; CARDOSO, T. C.; SOUZA, M. C. C. de; FERRARI, C. I. L. Isolamento do vírus rábico em *Molossus ater* (Chiroptera: Mollosidae) no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 6, p. 626-628, 1999.

SILVA, N. M.; SILVA, R. A. Ocorrência do vírus da raiva em morcegos frugívoros *Artibeus lituratus lituratus* (Olfers, 1818). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**,** 14., 1974. P. 102. São Paulo. **Anais...**

SILVA, R. A.; ALENCAR, O. A. Isolamento de vírus rábico das glândulas salivares de morcegos carnívoros da espécie *Chrotopterus auritus australis* (Thomas). **Veterinária**, Rio de Janeiro, v. __, n. 21, p. 7-10, 1968.

SILVA, R. A.; RIVELLO, G. V.; NILSSON, M. R. Isolamento de vírus rábico de morcego não hematófago da espécie *Phyllostomus hastatus hastatus* (Pallas). **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 4, p. 115-120, 1961.

SILVA, R. A.; SOUZA, A. M. A ocorrência de vírus rábico em morcegos hematófagos a espécie *Diamus youngi* (Jentink) no Brasil. **Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 53-55, 1968a.

SILVA, R. A.; SOUZA, A. M. A. Isolamento do vírus rábico de pulmão, coração, rins, bexiga e outros diferentes tecidos de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 291-301, 1968b.

SILVA, R. A.; SOUZA, A. M. A pesquisa do vírus da raiva na glândula interescapular de morcegos do Brasil, em condições naturais de infecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 313-315, 1968c.

SIMMONS, N. B. Order *Chiroptera*. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed.). **Mammals species of the world**: a taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p. 3125-3529.

SMITH, J.; McELHINNEY, L. M.; HEATON, P. R.; BLACK, E. M.; LOWINGS, J. P. Assessment of template quality by the incorporation of an internal control into a RT-PCR fot the detection of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 84, p. 107-115, 2000.

SMITH, J. S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiology Review**, v. 9, n. 2, 166-176, 1996.

SODRÉ, M. M.; GAMA, A. R.; ALMEIDA, M. F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 75-81, 2010.

SULKIN, S. E.; ALLEN, R. Experimental rabies virus infection in bats. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v 2, p. 99-114.

SZANTO, A. G.; NADIN-DAVIS, S. A.; ROSATTE, R. C.; WHITE, B. N. Re-assessment of direct fluorescent antibody negative brain tissues with a real-time PCR assay to detect the presence of raccoon rabies virus RNA. **Journal of Virological Methods**, v. 174, p. 110-116, 2011.

TADDEI, V. A. Morcegos, algumas considerações sistemáticas e biológicas. **Boletim Técnico do CATI**, v. 172, p. 1-30, 1983.

TELLEZ GIRON, A. El vampire portador de virus del derriengue. **Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural**, v. 5, p. 35, 1944.

TEPSUMETHANON, V. B.; LUMLERTDACHA, C.; MITMOONPITAK, R. Fluorescent antibody test for rabies: prospective study of 8987 brains. **Clinical Infectious Disease**, v. 25, p. 1459–1461, 1997.

TIERKEL, E. S.; ATANASIU, P. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological tests. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies.** 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 55-65.

TOLLIS, M.; BUONAVOGLIA, C.; TRANI, L.; VIGNOLO, E. Sensitivity of different cell lines for rabies vírus isolation. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 35, p. 504-508, 1988.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies vírus. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWISKI, H. **Laboratory techiniques in rabies.** Geneva: World Health Organization, 1996. p. 28-51.

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

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-stand RNA-viruses. **Virology,** v. __, n. 165, p. 565-576, 1988.

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

TORRES, S. A transmissão da raiva dos herbívoros pelos morcegos hematófagos da família *Desmodontidae*. **Revista do Departamento Nacional da Produção Animal**, v. 1, n. 2-3-4, p. 165-185, 1934.

TORRES, S.; QUEIROZ LIMA, E. A raiva e os morcegos hematófagos. Morcegos que resistem à infecção tornam-se portadores e eliminadores de vírus? **Revista do Departamento Nacional de Produção Animal**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1-6, p. 165-174, 1936.

TORRES, S.; QUEIROZ LIMA, E. A raiva e sua transmissão por morcegos hematophagos e infectados naturalmente. **Revista do Departamento Nacional de Produção Animal**, v. 2, p. 1-55, 1935.

TRIMARCHI, C. V; SMITH, J. S. Diagnostic evaluation. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, H. W. **Rabies.** London: Elsevier, 2002. p. 307–343.

TSIANG, H. Pathophysiology of rabies virus infection of nervous system. **Advances in Virus Research**, v. 42, p. 375-412, 1993.

TSIANG, H.; CECCALDI, P. E.; LYCKE, E. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons**. Journal of General Virology,** v. 72, p. 1191-1194, 1991.

TUFFEREAU, C.; BÉNÉJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A. Low-affinity nervegrowth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. **EMBO Journal,** v. 17, n. 24, p. 7250-7259, 1998.

UIEDA, W. Rabies in the insectivorous bat *Tadarida brasiliensis* in Southeastern Brazil. **Revista da Saúde Pública**, v.32, n. 5, p. 484-485, 1998.

UIEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOMES, L. H.; SILVA, M. M. S. Espécies de quirópteros diagnosticados com raiva no Brasil. **Boletim Instituto Pasteur**, v. 1, p. 17-35, 1996.

UIEDA, W.; HARMANI, N. M. S.; SILVA, M. M. S. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. **Revista da Saúde Pública**, v. 29, n. 5, p. 393-397, 1995.

UIEDA, W.; HARMANI, N. M. S.; SILVA, M. M. S.; BRANDÃO, M. M.; AGUIAR, E. A. C. Morcegos hematófagos: 2. Um indivíduo macho adulto no centro da cidade de São Paulo. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE RAIVA, 1992, São Paulo. **Resumos...**1992. p. 14.

VÁZQUEZ-MORÓN, S.; AVELLÓN, A.; ECHEVARRÍA, J. E. RT-PCR for detection of all seven genotypes of *Lyssavirus* genus. **Journal of Virology Methods**, v. 135, p. 281-287, 2006.

VENTERS, H. D.; HOFFERT, W. R.; SCARTTERDAY, J. E.; HARDY, A. V. Rabies in bats in Florida. **American Journal of Public Health**, v. 44, p.182-185, 1954.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. A chave para determinação de quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto, São Paulo. **Boletim de Ciências**, n. 1, p. 1-72, 1973.

WAKELEY, P. R.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L. M.; MARSTON, D.; SAWYER, J.; FOOKS, A. R. Development of a Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR assay for detection and differentiation of *Lyssavirus* genotypes 1, 5 and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2786-2792, 2005.

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

WEBSTER, W. A. A tissue-culture infection test in routine rabies diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 87, p. 113-116, 1986.

WEBSTER, W. A.; CASEY, G. A. Diagnosis of rabies infection. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. **Rabies**. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 201-222.

WEBSTER, W. A.; CASEY, G. A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**, 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 96-104.

WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions**. Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1300-1307, 1990.

WHO. World Health Organization. **Expert consultation on rabies**: first report. Geneva: World Health Organization, 2005. 88 p. (WHO Technical Series, 931).

WHO. World Health Organization**. Expert committee on rabies:** eighth report Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1992. 90 p. (WHO Technical Report Series, 824).

WHO. World Health Organization. **Workshop on genetic and antigenic molecular epidemiology of lyssaviruses**. Niagara Falls, Canada: World Health Organization, Geneva, 1994.

WHO. World Health Organization. **World survey of Rabies No. 34 for the Year 1998.** Geneva: World Health Organization; 2000.

WHO. World Health Organization, **Zoonoses.** Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1959. 84 p. (Technical Report Series, 169).

WINKLER, W. G. Airbone rabies. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies.** New York: Academic Press, 1975. v. 2, p. 115-121.

WITTE, E. J. Bat's rabies in Pennsylvania. **American Journal of Public Health**, v. 44, p.186-187, 1954.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies.** 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2007. p. 23-68.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies.** San Diego: Academic Press, 2002. p. 23-77.

WUNNER, W. H.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C. L.; LAFON, M.; GOLUB, E. Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. **Virology**, v. 140, n. 1, p. 1-12, 1985.

ZHUANG, Q.; MÜLLER, R. Noseleaf furrows in a horseshoe bat act as resonance cavities shaping the biosonar beam. **Physical Review Letters**, v. 24, n. 97, p. 218701-1-218701-4, 2006.

ZORTÉA, M. Subfamília Stenodermatinae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Ed.). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nélio R. dos Reis, 2007. cap. 7, p. 107-128.