CRISTINA DE JESUS CÂMARA BRITO

**Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de
vírus da raiva isoladas de animais domésticos e de seres
humanos no Estado do Maranhão**

São Paulo
2008

CRISTINA DE JESUS CÂMARA BRITO

Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos e de seres humanos no Estado do Maranhão

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

São Paulo
2008

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.1965
FMVZ

Brito, Cristina de Jesus Câmara

Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos e de seres humanos no Estado de Maranhão / Cristina de Jesus Câmara Brito. – São Paulo : C. J. C. Brito, 2008.

103 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fumio Honma Ito.

1. Vírus da raiva. 2. Caracterização genética. 3. Caracterização antigênica. 4. Análise filogenética. 5. Maranhão. I. Título.

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

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos, silvestres e de seres humanos no Estado do Maranhão", Protocolo nº496/2004, utilizando 3.500 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 em reunião de 30 de março/2005.

(We certify that the Research "Biologic, antigenic and genetic characterization of rabies virus isolated from the domestic and wild animals and human beings in the State of Maranhão, Northeastern Brazil" protocol number 496/2004, utilizing 3.500 mice , under the responsibility of Prof. Dr. Fumio Honma Ito, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved meeting in march/30/2005.

São Paulo, 30 de março de 2005

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Mateta
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

São Paulo, 17 de março de 2005.

PARECER 634/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quinquagésima terceira reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos, silvestres e de seres humanos no Estado do Maranhão*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.

CRISTINA DE JESUS CÂMARA BRITO

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRITO, Cristina de Jesus Câmara

Título: Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos e de seres humanos no Estado do Maranhão

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Na superação de diversas situações de minha vida foram neles em que me inspirei
Deles herdei toda a coragem e a determinação
Se hoje sigo adiante é porque me ensinaram a ser persistente
Aos meus pais, Maria da Glória e Everaldo Brito

Ao seu lado desconheço o medo,
Também me fortaleço e aprendo todos os dias
Sei que nunca estarei sozinha,
Tu és mais que um amigo e companheiro
Ser humano de caráter único e indubitável
És cúmplice de toda uma vida
Ao meu marido com amor, Leandro d’Arc Moretti

Faz tempo que me deixastes
A saudade ainda é grande
Lembro com carinho os dias em que estivestes
comigo
Saibas que foi muito querido
In memoriam do meu “filhote” Sansão

A longa distância e os anos de ausência me
privaram de acompanhar o seu crescimento
Tenho a lembrança dos momentos de alegria
Para os meus doces sobrinhos, Neto e Eduardo

Em algumas jornadas encontramos pessoas criativas
Em outras, amigas e divertidas
Nesta, tive a sorte de encontrar em uma só pessoa
todas essas qualidades
A minha sogra, Lúcia

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus guias espirituais, pela serenidade, sabedoria e proteção essenciais nos momentos de angústia e incertezas, permitindo mais uma vez alcançar com êxito essa etapa de minha vida.

Ao Prof. Fumio Honma Ito, que com todo o seu conhecimento, sempre esteve presente e disposto a auxiliar no que fosse necessário, mostrando respeito, confiança e orientação necessária à execução desse trabalho.

Aos Professores Hélio Langoni, Márcio Garcia Ribeiro e em especial ao Prof. Antonio Carlos Paes, da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu pelos ensinamentos e observações sempre pertinentes durante o meu período de residência em Enfermidades Infecciosas dos Animais e mestrado na Área de Vigilância Sanitária, que despertaram em mim o estímulo pela pesquisa.

Aos pesquisadores do College of Bioresource Sciences, da Nihon University, Kanagawa, Japão, Prof. Dr. Takeo Sakai e Prof. Dr. Takuya Itou pelo seqüenciamento e análise filogenética das amostras estudadas.

Aos colegas, Go Sato e Yuki Kobayashi, pela atenção e auxílio nas questões técnicas do presente estudo.

À Dra. Fernanda Bernardi, pela tipificação antigênica dos isolados de vírus da raiva.

Ao amigo e Prof. Hamilton Pereira Santos, da Universidade Estadual do Maranhão, pela atenção e indispensável colaboração em disponibilizar as amostras empregadas no estudo. O meu profundo agradecimento.

Ao Diretor Geral da Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED - MA), Sebastião Cardoso Anchieta Filho, pelo apoio logístico no transporte marítimo e terrestre aos municípios do Estado do Maranhão acometidos pela raiva.

Aos Coordenadores do Programa de Controle de Raiva dos herbívoros e outras encefalopatias no Maranhão, Sonivalde Santana Monte e Carlos Celso, pela amizade, momentos de descontração e pela amostra obtida durante captura de morcegos na Ilha Sapeca.

À Secretaria de Saúde de Carutapera (MA), pela acolhida no período da visita ao município.

À Médica Veterinária, Jakeline Rios, da Secretaria de Saúde do Maranhão, pela colaboração na aquisição da série histórica de raiva humana no Estado.

Ao Fiscal Federal Agropecuário, Roberto Carlos Negreiros de Arruda, da Superintendência Federal de Agricultura no Maranhão, pelo fornecimento dos registros de raiva no Estado.

À técnica Rosana Cleide Paick Utiana, do laboratório de Zoonoses Virais do VPS-FMVZ-USP, pela compreensão, experiência e auxílio durante as numerosas fases experimentais do projeto.

Ao técnico do biotério, Antonio da Costa Martins, pela amizade e respeito pelos animais.

Às técnicas do laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS-FMVZ-USP, Zenaide e Gisele, que contribuíram no fornecimento de materiais para a pesquisa.

Aos Professores Silvio Arruda Vasconcellos e Solange Gennari pelo exemplo de dedicação e dinamismo profissional na Universidade de São Paulo.

Aos amigos, Ricardo Dias e Simone de Carvalho Balian, pelo carinho, apoio e palavras de incentivo.

Aos Professores do VPS, Evelise Telles, Fernando Ferreira, José Jerez, José Soares (Zezé), Leonardo Richtzenhain, Marcelo Labruna, Marcos Amaku, Nilson Benites, Paulo Brandão, Rodrigo Soares e Sônia Pinheiro pelos ensinamentos.

Aos secretários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Maria Cristina Paick, Danival e Ana Virgínia Prado pela paciência e cordialidade.

À secretária do curso de pós-graduação do VPS- FMVZ-USP, Tânia Delonero pela atenção.

Às secretárias do curso de pós-graduação da FMVZ-USP, Dayse Flexa e Joana Vasconcelos pela amizade, carinho e prontidão em atender sempre que necessário.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP, com destaque para a bibliotecária, Elza Faquim, pela amizade e auxílio na normatização das referências.

Ao meu irmão, Everaldo Júnior, e minha cunhada, Carolina, por acreditarem em mim.

À minha irmã de coração, Tatiana Evelyn Hayama Ueno, pela lealdade ao longo dos anos e pelos passeios divertidos.

À amiga Iara Silveira que conheci no VPS, pelo espírito de luta e amizade sincera.

Ao meu enteado “peludo” Digby, pelas lambidas de alegria e afeto.

Aos amigos de Botucatu que estão presentes em minha vida, Daniel Moura de Aguiar, Liliane Dantas, Vanessa Riesz Salgado e em especial Cristiane Nakada Nozaki, que sempre torceu por mim.

Aos colegas de pós-graduação no VPS, pela agradável convivência e momentos festivos, Adriano Pinter, Alessandra Ragozo, Alexandre (Coca), Alexandre Ataliba, Carla Mota, Cristina Dib, Eliana Villalobos, Esther Matsubara, Luís Ivan, Lara Keid, Leslie, Letticie, Maurício Horta, Pat (Pink), Renata Monteiro, Renata Paixão, Ricardo Cabrera, Richard, Sérgio, Sílvio (Chagas), Simone Miyashiro e Vanessa Castro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos os animais experimentais que fizeram parte desta pesquisa. O meu respeito. Que o seu sacrifício possa significar a mitigação do sofrimento observado nos animais e nas pessoas que tombaram no fogo de raiva do Estado do Maranhão em 2005 e que este trabalho assim o possibilite.

“...ao dar demasiada importância às belas ações, se presta finalmente uma homenagem indireta e poderosa ao mal. Isto porque deixaria então supor que estas belas ações só valem tanto por serem raras e que a maldade e a indiferença são forças motrizes bem mais freqüentes nas ações dos homens.”

Albert Camus

RESUMO

BRITO, C. J. C. **Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos e de seres humanos no Estado do Maranhão.** [Biological, antigenic and genetic characterization of rabies virus samples isolated from domestic animals and humans in Maranhão State]. 2008. 103 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Analisou-se 54 amostras de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies animais e de seres humanos do Estado do Maranhão, inicialmente pelas técnicas tradicionais de imunofluorescência direta (IFD) e de inoculação intracerebral em camundongos (ICC), com o objetivo de realizar um estudo de epidemiologia da doença. No reteste, todas as amostras foram positivas na IFD e 19 resultaram negativas à ICC. O comportamento biológico dos isolados foi estudado em camundongos, revelando um período de incubação entre 7 e 17 dias, com sinais clínicos variados e duração média de 4 dias. Para a avaliação da patogenicidade, foram selecionadas cinco amostras do estudo, oriundas de diferentes espécies, como vírus de desafio nos camundongos imunizados com uma vacina comercial de vírus inativado. Os resultados do desafio indicaram que a proteção conferida pela vacina foi baixa para todas as amostras. A presença de anticorpos no soro dos camundongos vacinados foi demonstrada em diferentes períodos de vacinação. A tipificação antigênica de quatro amostras de vírus foi realizada pela imunofluorescência indireta (IFI) utilizando um painel de anticorpos monoclonais (MAbs) procedentes do “Canadian Food and Inspection Agency”, Ottawa, Canadá, identificando o perfil correspondente à variante de morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Na caracterização genética com base nos genes que codificam a glicoproteína G e nucleoproteína N, observou-se que os isolados foram divididos em dois grupos genéticos independentes associados a ciclos endêmicos distintos. Esses resultados permitem concluir que no Estado do Maranhão circulam pelo menos duas variantes do vírus da raiva, mantidas por carnívoros terrestres e morcegos hematófagos. Destaca-se que houve variação regional entre as amostras isoladas em diferentes áreas geográficas. Além disso,

foram constatados hospedeiros inesperados nos clados formados. Também, não houve variação temporal nas amostras pesquisadas.

Palavras chave: Vírus da raiva. Caracterização genética. Caracterização antigênica. Análise filogenética. Maranhão.

ABSTRACT

BRITO, C. J. C. **Biological, antigenic and genetic characterization of rabies virus samples isolated from domestic animals and humans in Maranhão State.** [Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos e de seres humanos no Estado do Maranhão]. 2008. 103 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Fifty four rabies virus samples isolated from different animal species and humans, diagnosed positive by means of the direct fluorescent antibody test (dFA) and mouse inoculation test (MIT) in the State of Maranhão were selected for an epidemiologic study. In the retest, all these samples were dFA-positive, but 19 were negative by the MIT. The biologic behavior of these samples was assessed in mice by intracerebral inoculation and the incubation period was between 7 and 17 days, showing varied clinical signs with an average duration of 4 days. For the evaluation of the pathogenicity, five rabies viruses isolated from different species were selected, and used as the challenge viruses to be inoculated into mice been vaccinated previously with an inactivated commercial rabies vaccine. The results of the challenge experiments indicated low protection of the vaccine against the challenge viruses. The presence of rabies antibody was demonstrated in the sera of vaccinated mice taken at different intervals after vaccination. The antigenic typing was performed in four samples by using the indirect fluorescent antibody test (IFI) with a panel of monoclonal antibodies (MAbs) provided by the Canadian Food and Inspection Agency, Ottawa, Canada, and the profile identified was closely related to that of the *Desmodus rotundus* vampire bat. The genetic characterization based on genes coding the glycoprotein G and nucleoprotein N genes indicated that isolates were divided into two independent genetic groups associated to distinct endemic cycles. With the results obtained, we conclude that in the State of Maranhão there are circulating at least two distinct variants of rabies viruses, maintained by terrestrial carnivores and vampire bats. Regional variation among the isolates taken from different geographic areas has been found. And the rabies virus isolates grouped into

clades were associated with unusual host species and no temporal variation was observed among the isolates.

Key words: Rabies virus. Genetic characterization. Antigenic characterization. Phylogenetic analysis. Maranhão.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa do Estado do Maranhão de acordo com a vegetação.....	33
Figura 2 -	Bovino agredido por morcego em 2005 no município de Cândido Mendes – MA.....	34
Figura 3 -	Fotografia de felino com suspeita de raiva, obtida durante a epidemia de raiva de 2005, ocorrida no povoado de Aurizona, município de Godofredo Viana – MA.....	34
Figura 4 -	Poço localizado atrás da casa das vítimas agredidas por morcegos no povoado de Aurizona, município de Godofredo Viana – MA.....	35
Figura 5 -	Morcego não hematófago capturado em 2005 no município de Carutapera – MA.....	35
Figura 6 -	Habitação de garimpeiro no município de Luis Domingues – MA.....	36
Figura 7 -	Casa onde ocorreram duas vítimas de raiva humana, em 2005, no povoado de Aurizona, município de Godofredo Viana – MA.....	36
Figura 8 -	Gato do Mato (<i>Leopardus tigrinus</i>) em cativeiro no povoado de Aurizona, município de Godofredo Viana – MA.....	37
Figura 9 -	Macaco caiarara (<i>Cebus kaapori</i>) mantido como animal de estimação em um povoado do Rio Preguiças no litoral Norte oriental do Maranhão.....	37
Figura 10 -	Dendrograma da análise filogenética entre amostras de vírus rábico isoladas no Estado do Maranhão, tendo como referência a amostra Mokola, com base na seqüência 599bp (3318-3916) do gene da proteína G.....	57
Figura 11 -	Análise filogenética entre amostras de vírus rábico isoladas no Estado do Maranhão, tendo como referência a amostra Mokola, com base na seqüência 203bp (109-311) do gene da proteína N.....	58
Figura 12 -	Localização geográfica das amostras de vírus da raiva procedentes do Estado do Maranhão, utilizadas na caracterização genética com base nos genes que codificam a glicoproteína G e nucleoproteína N - São Paulo - 2008.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Número de amostras de cérebros positivos no Estado do Maranhão, cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Centro de Ciências Agrárias (CCA) - São Paulo - 2008.....	41
Quadro 2 -	Número de amostras de cérebros positivos para a raiva no Estado do Maranhão utilizadas na caracterização genética do gene G - São Paulo - 2008.....	48
Quadro 3 -	Número de amostras de cérebros positivos para a raiva no Estado do Maranhão utilizadas na caracterização genética do gene N - São Paulo - 2008.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados obtidos na técnica de IFD (imunofluorescência direta) e ICC (inoculação intracerebral em camundongo) em amostras de cérebros de diferentes espécies do Estado do Maranhão - São Paulo - 2008.....	52
Tabela 2 -	Titulação das cinco amostras de vírus usadas para desafio na avaliação da patogenicidade em camundongos vacinados, em dose letal 50% (DLIC ₅₀) - São Paulo - 2008.....	54
Tabela 3 -	Resultados obtidos no desafio em camundongos previamente imunizados com vacina anti-rábica, frente às cinco amostras de vírus da raiva isoladas de cérebros das espécies canina, humana, ovina e bovina no Estado do Maranhão - São Paulo - 2008.....	54
Tabela 4 -	Títulos de anticorpos anti-rábicos obtidos na técnica de IFI (imunofluorescência indireta) em soros de camundongos vacinados em diferentes períodos - São Paulo - 2008.....	55
Tabela 5 -	Resultados obtidos na caracterização antigênica de amostras de vírus da raiva isoladas de cérebros de morcego e de seres humanos no Estado do Maranhão - São Paulo - 2008.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGED-MA	Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão
Ach	Acetilcolina
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CH3 - Rockfeller	Linhagem de camundongo
cm	centrímetro
DL ₅₀	Dose letal 50%
DLIC ₅₀	Dose letal intracerebral 50%
G	Glicoproteína
g	grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Inoculação intracerebral
ICC	Inoculação intracerebral em camundongos
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
KDa	kilodalton
L	RNA polimerase RNA-dependente
M	Proteína matriz
M ₁	Fosfoproteína
M ₂	Proteína matriz
MAbs	Anticorpos monoclonais
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Nucleoproteína
nm	Nanômetro
NS	Fosfoproteína
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PBS	Solução salina tamponada
pH	Potencial hidrogênio
p/v	peso/volume
PV	Pasteur virus
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcrição reversa associada à reação em cadeia pela polimerase
SNC	Sistema nervoso central
TNC	Soroneutralização em camundongos
µm	Micrômetro
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal
v/v	volume/volume
WHO/OMS	World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS.....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	Amostras de campo.....	41
3.2	Camundongos.....	42
3.3	Soro de camundongos.....	42
3.4	Conjugado anti-rábico policlonal.....	43
3.5	Conjugado anti-espécie policlonal.....	43
3.6	Diluyente.....	43
3.7	Vacina anti-rábica.....	44
3.8	Técnica de imunofluorescência direta (IFD).....	44
3.9	Técnica de imunofluorescência indireta (IFI).....	44
3.10	Técnica de inoculação intracerebral em camundongos (ICC).....	45
3.11	Titulação das amostras de vírus.....	45
3.12	Avaliação da patogenicidade das amostras em camundongos vacinados.....	46
3.13	Caracterização antigênica com anticorpos monoclonais (MAbs).....	46
3.14	Caracterização genética.....	47
3.14.1	Extração do RNA	47
3.14.2	Transcrição Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR).	47
3.14.3	Com o gene codificador da proteína G	48
3.14.4	Com o gene codificador da proteína N	49
3.14.5	Seqüenciamento	49
3.15	Análise filogenética.....	49
3.16	Delineamento Experimental.....	50
4	RESULTADOS.....	51
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICES.....	96
	ANEXOS.....	100

“...julgar e distinguir o verdadeiro do falso, isto é, o que se denomina o bom senso ou a razão...”

“...não basta ter o espírito bom: o essencial é aplicá-lo bem.”

René Descartes

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa aguda e fatal que acomete todos os animais de sangue quente causando alterações neurológicas caracterizadas por um quadro de encefalomielite (RADOSTITS et al., 2000; RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). É conhecida desde o início da história da humanidade, sendo de importância na Saúde Pública pela alta letalidade e pelo impacto psíquico e emocional em indivíduos agredidos por animais perante o medo de adquirir a enfermidade (ACHA; SZYFRES, 2003).

A transmissão ocorre principalmente pela penetração de partículas virais contidas na saliva de animal infectado por mordedura (BAER; BELLINI; FISHBEIN, 1990). O contato do agente com feridas, soluções de continuidade da pele, mucosas e conjuntiva também constitui potencial de infecção (CORREA; CORREA, 1992). As arranhaduras são consideradas como fator de risco devido à salivação intensa dos animais doentes que contaminam suas patas (FENNER et al., 1993).

O agente etiológico da raiva é um vírus da ordem *Mononegavirales*, pertencente à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, com morfologia de bala de revólver e dimensões de 75 nm de diâmetro por 180 nm de extensão (FENNER et al., 1993; BÜCHEN-OSMOND, 2003). O genoma é composto por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA), com aproximadamente 12 Kilobases, não segmentado, de sentido negativo (3'- 5'), com cinco genes que codificam a glicoproteína (G), a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (M₁ ou NS), a proteína matriz (M ou M₂) e a RNA polimerase RNA-dependente (L) (TORDO, 1996; HANLON; ORCIARI, 2001). O vírion apresenta uma camada dupla de membrana fosfolipídica recoberta por espículas de composição glicoprotéica, de 10 nm de comprimento e separadas a cada 5 nm, em toda a sua extensão, com exceção de sua base plana (TORDO, 1996). Internamente, o capsídeo de simetria helicoidal é formado pelo genoma viral associado a N, M₁ ou NS e L (HANLON; ORCIARI, 2001; WUNNER, 2002). A conformação deste complexo mantém o RNA no formato apropriado para a transcrição e replicação, além de protegê-lo de ribonucleases e da resposta imune inata (TORDO, 1996; ALBERTINI et al., 2006; LUO et al., 2007).

A glicoproteína (65-70 KDa), produzida pelo gene G, é responsável pela interação inicial com os receptores celulares durante a infecção e induz a síntese de anticorpos neutralizantes (FENNER et al., 1993; WUNNER, 2002). Também, divide com as proteínas N e M₁ a capacidade de induzir uma resposta imune celular envolvendo células T auxiliaadoras e T citotóxicas (TORDO, 1996). Qualquer variação no gene que codifica essa proteína afeta a patogenicidade, imunogenicidade e neurotropismo do vírus (TORDO, 1996; WUNNER, 2002). Por outro lado, a proteína N (57-62 KDa) apresenta epítomos mais conservados responsáveis pela ativação da imunidade celular (GOTO et al., 1994; TORDO, 1996; LUO et al., 2007). Além disso, constitui o principal componente interno do vírion e está presente em abundância nas células infectadas (WUNNER et al., 1988). Ainda, a proteína N, apresenta determinantes antigênicos grupo-específicos compartilhados por todos os vírus rábicos (GOTO et al., 1994) e mais recentemente, foi mostrado quatro sítios antigênicos ao longo da proteína, sendo os sítios I e IV compostos de epítomos lineares enquanto o II e III são de conformação dependente (GOTO et al., 2000). A proteína M (22-25 KDa) está localizada na superfície interna do envelope viral e participa do processo de montagem e brotamento do vírion (WUNNER, 2002). Adicionalmente, age como principal indutora da apoptose nas células neuronais (KASSIS et al., 2004). Já a proteína M₁ (38-41 KDa), tem importância tanto para transcrição e replicação, como nas interações com componentes protéicos da célula durante o transporte no axoplasma (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). A proteína L (180 KDa) ocupa mais da metade do genoma viral e suas funções incluem a síntese, o *capping* (polarização) e a poliadenilação do RNA (TORDO, 1996).

Estudos com anticorpos monoclonais (MAbs), conduzidos por Wiktor e Koprowski (1978), permitiram a tipificação antigênica do vírus da raiva, o que foi posteriormente complementado por estudos genéticos que possibilitaram dividir o gênero *Lyssavirus* em sete genótipos (TORDO et al., 2000). O genótipo 1 inclui a amostra do vírus clássico da raiva, apresentando ampla distribuição mundial; os genótipos 2, 3 e 4 incluem respectivamente, o vírus *Lagos bat*, *Mokola* e *Duvenhage*, encontrados na África; os genótipos 5 e 6 correspondem aos *European bat lyssavirus* (EBL1 e EBL2), isolados na Europa, enquanto o genótipo 7 é representado pelo *Australian bat lyssavirus*, encontrado na Austrália. Atualmente,

foram propostos novos genótipos isolados de morcegos insetívoros: o "Aravan virus" isolado de *Myotis blythi*, no Quirguistão - Ásia Central (ARAI et al., 2003); "Khujand virus", do *Myotis mystacinus*, no Tajiquistão (KUZMIN et al., 2003); "Irkut virus", do *Murina leucogaster* na Sibéria Oriental e o "West Caucasian Bat lyssavirus", do *Miniopterus schreibersi*, nas montanhas do Cáucaso (BOTVINKIN et al., 2003). Fooks et al. (2003) e Fooks (2004), denominam os vírus deste gênero, isolados de morcegos provenientes da Eurásia, de lyssavirus causadores de zoonoses emergentes.

Até o presente momento, no continente americano, somente foram diagnosticados casos de raiva atribuídos a vírus do genótipo 1. Desta forma, tanto a Organização Mundial da Saúde (OMS) quanto a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) apenas consideram como raiva a enfermidade determinada por vírus do genótipo 1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

O vírus da raiva ao penetrar no organismo por via subcutânea, no caso de contato da saliva infectada com lesão preexistente, ou por via intramuscular, quando há mordedura, pode alcançar diretamente, as terminações nervosas sensoriais e/ou motoras, ou permanecer vários dias nas células musculares estriadas do tecido atingido (HEMACHUDHA; LAOTHAMATAS; RUPPRECHT, 2002; ACHA; SZYFRES, 2003). O longo período de incubação ou fase de eclipse pode ser em parte explicado pela localização das partículas virais no músculo ou células das junções neuromusculares, onde ocorre um processo de amplificação viral nos receptores de acetilcolina (Ach), propiciando a infecção dos nervos periféricos (CHARLTON et al., 1997). Em seguida, migra centripetamente, seguindo o fluxo axoplasmático retrógrado dos nervos periféricos, até o sistema nervoso central (SNC), à razão de 100 mm por dia, associando-se com a determinação dos primeiros sintomas da enfermidade (TSIANG; CECCALDI; LYCKE, 1991; JACKSON, 2002). Após alcançar o SNC, o vírus se replica e se dissemina, centrifugamente, ao longo do sistema nervoso periférico e autônomo, para vários órgãos do hospedeiro e principalmente, para as glândulas salivares, sendo eliminado pela saliva (ACHA; SZYFRES, 2003).

As partículas virais podem ser identificadas na saliva antes, durante ou após a manifestação dos sinais clínicos (HANLON; ORCIARI, 2001). Em alguns

animais domésticos e silvestres, o período de excreção do vírus é pouco conhecido (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). A transmissão da raiva ocorre não apenas entre hospedeiros da mesma espécie, mas também, pode ser transmitida para outros, de espécie diferente, que não são tidos como reservatórios naturais da doença (NIEZGODA; HANLON; RUPPRECHT, 2002). Tal fato é denominado de “*spillover*” e resulta do contato interespecie podendo levar a determinação de uma nova variante de vírus (CHILDS, 2002; CARNIELI JR. et al., 2006; STERNER; SMITH, 2006; KOBAYASHI et al., 2007a).

As associações entre variantes virais e hospedeiros podem permanecer por décadas ou mais tempo em áreas geográficas distintas, em vista do equilíbrio ecológico estabelecido. As características topográficas e hidrográficas das regiões favorecem a criação de barreiras físicas que impedem a movimentação animal e promovem, regionalmente, a evolução viral em hospedeiros específicos (BOURHY et al., 1999). No entanto, a migração destes animais para áreas livres tem potencial de gerar grandes surtos (STERNER; SMITH, 2006).

A distribuição da raiva animal varia de acordo com os países e as espécies acometidas na região (CHILDS, 2002; ACHA; SZYFRES, 2003). Em países desenvolvidos, o número de casos humanos foi reduzido pelo controle da raiva canina, por meio da vacinação e captura de animais errantes. Por outro lado, em animais silvestres, a doença tem sido assinalada anualmente, constituindo ainda um desafio para as autoridades (FU, 1997; RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

Na América Latina e no Caribe, onde são encontrados os morcegos hematófagos, a importância destes é crescente, como transmissores diretos da raiva aos seres humanos, além dos significativos prejuízos que causam à indústria pecuária (BELOTTO, 2000). Nestes países, os morcegos vêm interferindo no ciclo aéreo, sendo responsáveis por vários casos de raiva em outras espécies de morcegos não hematófagos. No ciclo urbano também, têm transmitido a infecção para animais domésticos e seres humanos (BELOTTO et al., 2005). Além dos quirópteros, já foram identificados diversos animais silvestres infectados pelo vírus da raiva, como o lobo guará (*Crysocyon brachyurus*), sagüi (*Callithrix jacchus*), quati (*Nasua nasua*), cangambá (*Conepatus semistriatus*), guaxinim (*Procyon*

carnivoros), raposa (*Dusicyon vetulus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (FAVORETTO et al., 2001; BOLETÍN DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA RABIA EN LAS AMÉRICAS, 2004; CARNIELI JR. et al., 2008).

No Brasil, os cães ainda constituem a principal fonte de infecção do vírus rábico em áreas urbanas de alguns Estados, contudo, os morcegos hematófagos e não hematófagos têm representado um problema emergente, sendo os reservatórios da raiva no ambiente silvestre (SCHNEIDER et al., 2001, 2007; MENDES et al., 2006; UIEDA et al., 2006; KOTAIT et al., 2007). Ao lado destes, consideram-se também os canídeos da ordem carnívora de importância na manutenção do vírus rábico naquele meio (CARNIELI JR. et al., 2006, 2008; SATO et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2007a).

Em 2003, foram notificados no Brasil, 17 casos de raiva humana (OLIVEIRA et al., 2006; BRASIL, 2007). Neste mesmo ano, houve confirmação laboratorial em materiais de 2795 bovídeos, 209 eqüídeos, 45 ovinos e 11 caprinos (BRASIL, 2004a). Registros indicavam que até 2003 muitas infecções pelo vírus da raiva em humanos foram transmitidas por cães e gatos, no entanto, a partir de 2004, houve uma alteração do perfil epidemiológico com numerosos casos de raiva atribuídos ao morcego hematófago (OLIVEIRA et al., 2006). Dados do Ministério da Saúde demonstram que naquele ano, foram registrados 15 óbitos em seres humanos, apenas no município de Portel (PA) e seis em Viseu (PA), este último localizado na divisa com o Estado do Maranhão (BRASIL, 2004b; ROSA et al., 2006).

O Estado do Maranhão possui uma área de 331.983,293 km² e está dividido em 217 municípios (IBGE, 2007). Apesar da localização no Nordeste do país, com clima tropical e diferentes quantidades de precipitações pluviométricas, possui características peculiares, face à proximidade com a Amazônia (MARANHÃO, 2007a). Neste panorama, observa-se uma extensa área de cerrado e de floresta equatorial, seguido por uma cobertura de mata de transição, campos, manguezais e vegetação de restinga (Figura 1). O relevo apresenta altitudes reduzidas e topografia regular, com cerca de 90% da superfície situada abaixo de 300 metros de altura. A morfologia territorial estende-se com orientação sul-norte, abrangendo planaltos e chapadas no Centro-Sul do Estado e planícies de baixas

altitudes no norte e no litoral maranhense (MARANHÃO, 2007a). Desta maneira, apresenta condições adequadas ao desenvolvimento de uma grande diversidade de espécies animais e possui regiões que propiciam atividades de pecuária, agricultura e extrativismo (VALLADARES et al., 2007), onde foram encontrados relatos de agressões por animais domésticos e morcegos (Figuras 2 e 3).

Nos municípios localizados no Norte ocidental do Estado, muitos habitantes praticam a agricultura de subsistência, a criação de alguns animais de produção e a pesca (MARANHÃO, 2007a). Na maioria das vezes, apresentam como principal fonte de renda, a extração de madeira e de ouro que geram desmatamento de grandes extensões de terra, propiciando a formação de abrigos e a proliferação de quirópteros (Figuras 4 e 5). Além destes fatores, as condições sócio-econômicas e hábitos culturais da população (Figuras 6, 7 e 8) favorecem a prevalência de casos de raiva nestas regiões (RIOS et al., 2006).

Ainda, em outras localidades do Estado, verifica-se grande quantidade de animais de diferentes espécies e parte da população humana reside em áreas isoladas e distantes de Centros de Saúde (MARANHÃO, 2007a), o que dificulta o acesso a tratamentos profiláticos, nos casos de exposição a espécies domésticas e silvestres (Figura 9).

Em 2004, no Maranhão, ocorreram quatro óbitos humanos, e a tipificação antigênica, baseada em “MAbs - *Centers for Disease Control* - CDC” de Atlanta (EUA), indicou dois casos da variante originada de cães. Em junho daquele ano, várias pessoas do município de São João Batista, foram agredidas por morcegos hematófagos, havendo ainda a possibilidade da existência de mais pessoas envolvidas (MARANHÃO, 2004). Esta situação é coerente com a localização do município em uma das regiões de maior disponibilidade de recursos hídricos, que vem sofrendo transformações ambientais provocadas pelas atividades extrativistas além de se considerar a expansão da piscicultura e amplificação das lavouras (MARANHÃO, 2006) com conseqüente modificação do *habitat* do *Desmodus rotundus*.

No ano de 2005, o Maranhão foi o Estado responsável pelo maior número de notificações de casos humanos de raiva no país (BRASIL, 2007).

Naquele ano, todos os 24 casos registrados foram transmitidos por morcegos hematófagos. Dados da Secretaria de Saúde do Maranhão (MARANHÃO, 2007b) indicam três casos em Godofredo Viana; dois em Carutapera; dois em Cândido Mendes e 17 em Turiaçu. Destes, 21 (87,5%) foram confirmados por exames laboratoriais e três (12,5%) firmados por critérios clínicos e epidemiológicos (RIOS et al., 2006). Em animais, foram identificados 24 focos da doença, sendo 20 em bovinos e um em cada uma das espécies eqüina, suína, ovina e asinina (MONTE et al., 2006).

A confirmação laboratorial da raiva possibilita o estabelecimento de um sistema de informação e vigilância epidemiológica que visa à determinação da distribuição e prevalência da doença nas espécies susceptíveis (THRUSFIELD, 1986). A partir da análise dos dados epidemiológicos e sua interpretação, torna-se possível formular estratégias para controlar e evitar a disseminação de focos para áreas livres da enfermidade (WANDELER, 2000).

Várias técnicas de diagnóstico têm sido desenvolvidas para a identificação da raiva (WOLDEHIWET, 2005). Os materiais de eleição são representados por fragmentos do hipocampo, tronco cerebral, córtex, cerebelo e ainda, medula para os eqüídeos (BRASIL, 2005). Os exames histológicos revelam os corpúsculos de Negri, tidos como inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas e patognomônicas da doença, em apenas 50 a 80% dos infectados (JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2000). Dessa forma, para um diagnóstico conclusivo, é realizada a prova de inoculação intracerebral em camundongos (ICC) que representa um método preciso e de fácil realização (KOPROWSKI, 1996). Em alguns laboratórios, esse procedimento vem sendo substituído por sistemas de cultura de células (WOLDEHIWET, 2005). Além desta, a imunofluorescência direta (IFD), descrita por Goldwasser e Kissling (1958), apresenta grande sensibilidade e especificidade na detecção do antígeno do vírus da raiva (KISSLING, 1975), podendo-se obter resultados em um período de até 2 horas (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996). Apesar disto, a técnica da transcrição reversa associada à reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) apresenta exatidão superior por permitir a identificação de segmentos do RNA viral, mesmo em materiais em decomposição (TORDO; SACRAMENTO; BOURHY, 1996; DAVID et al., 2002). No entanto, os especialistas da raiva da Organização Mundial da Saúde, não

recomendam o emprego desta técnica para o diagnóstico de rotina da raiva, reservando o seu uso para estudos epidemiológicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). O envio de amostras decompostas para confirmação laboratorial da raiva foi apontado como potencial complicador para o diagnóstico (BRITO, 2002).

A pesquisa de anticorpos anti-rábitos no soro de animais e de seres humanos durante o período clínico pode ser um indicador útil, contudo, constitui um método de diagnóstico de baixa sensibilidade e pouca confiança (WOLDEHIWET, 2005). A soroconversão ocorre tardiamente, depois da infecção ter se estabelecido no SNC, como resultado da elevada quantidade de antígeno viral processado pelas células apresentadoras de antígenos, tais como os macrófagos e as células dendríticas (SMITH, 1991; TIZARD, 1998). Os anticorpos são detectados em apenas 20% dos indivíduos testados no período de 1 a 26 dias após o início da doença (HEMACHUDHA; WACHARAPLUERSADEE, 2004). Por outro lado, a sua determinação após a vacinação, indica que os mecanismos de defesa, não imunológicos e os imunes mediados por células, foram ativados conferindo proteção contra o vírus rábico (TIZARD, 1998).

Entre as provas sorológicas utilizadas para avaliar a capacidade imunogênica das vacinas e a resposta imune dos hospedeiros submetidos a tratamento profilático anti-rábico, destaca-se a soroneutralização (MESLIN; KAPLAN, 1996; SMITH; YAGER; BAER, 1996). O teste desenvolvido por Webster e Dawson (1935) em camundongos (TNC) tem sido considerado padrão para detectar e quantificar anticorpos neutralizantes para a raiva. Entretanto, apresenta como desvantagens, a dificuldade do processamento de um número elevado de amostras, o tempo prolongado para a leitura, as instalações especializadas necessárias e a variabilidade da virulência do vírus empregado (SMITH, 1991; TRIMARCHI; RUDD; SALFORD JR., 1996). Assim, outros métodos foram propostos como a imunofluorescência indireta (IFI) que demonstra sensibilidade e especificidade elevadas comparáveis ao TNC (SMITH, 1991). Alguns pesquisadores, porém, comparando quantitativamente estes métodos mostraram que os títulos de anticorpos anti-rábitos obtidos pela IFI, não apresentam concordância com os resultados do TNC (GERMANO et al., 1981). Essa diferença relaciona-se com os anticorpos predominantes medidos pela IFI, que sendo direcionados para

ribonucleoproteína viral, não apresentam atividade neutralizante (LEE; HUTCHINSON; ZIEGLER, 1977; KAPLAN; TURNER; WARRELL, 1986). As condições adversas representadas por hemólise, congelamento e degelo das amostras séricas também são descritas como responsáveis pela discrepância observada (LEFFINGWELL; IRONS, 1965).

Madhusudana, Shamsundar e Saraswati (2001) submeteram 185 soros humanos, provenientes de indivíduos imunizados com diferentes vacinas anti-rábicas, e oito amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com raiva paralítica confirmada laboratorialmente, aos testes de IFI e TNC, demonstrando especificidade de 97,9% e sensibilidade de 97,2% na IFI. Com base nestes resultados, os autores afirmaram que a IFI pode ser utilizada em um grande número de amostras para monitorar a soroconversão, após a profilaxia de pré ou pós-exposição, bem como auxiliar no diagnóstico *ante-mortem*.

A imunização constitui uma das principais medidas de profilaxia da doença em áreas urbanas e rurais (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; ACHA; SZYFRES, 2003). Em certas situações, contudo, alguns animais primovacinados ou que receberam dose apropriada de vacina podem não responder com níveis adequados de anticorpos em razão de sua imunodeficiência (TIZARD, 1998). Da mesma forma, a administração, o armazenamento e a manipulação incorreta dos imunobiológicos favorecem os relatos de falhas vacinais (TIZARD, 1998; ALBAS et al., 2001).

As vacinas disponíveis no mercado são elaboradas com vírus fixo (TORDO et al., 2000), o que pode tornar as espécies susceptíveis vulneráveis, se houver exposição a distintas variantes antigênicas do vírus da raiva (WIKTOR; KOPROWSKI, 1980).

Hanlon et al. (2005), referindo-se à eficácia das vacinas anti-rábicas convencionais utilizadas em animais e seres humanos no tratamento de pré e pós-exposição contra os isolados do genótipo 2 a 7 e dos novos lyssavirus, relataram que a eficácia das vacinas pode mudar, por sua inabilidade em reconhecer epítomos de células T imunorreativas nos antígenos virais e neutralização do vírus, em decorrência de mutações originadas na sequência de genes de variantes virais.

Atualmente, a epidemiologia da raiva obteve avanços com a caracterização molecular do vírus, tornando possível o conhecimento da distribuição geográfica das variantes e a identificação de espécies reservatório (TORDO et al., 2000; ITO et al., 2001a; NADIN-DAVIS et al., 2003; SATO et al., 2006; CARNIELI JR. et al., 2008). A aplicação de métodos de análise genética revelou que apesar das diferenças antigênicas, os isolados do vírus rábico adaptados para diferentes espécies têm conservado alterações no gene, que podem ser utilizadas como marcadores epidemiológicos (ARAI et al., 1997; ITO et al., 2001a; SCHAEFER et al., 2005).

Batista et al. (2006) estudaram em camundongos a estabilidade de três amostras virais de espécies distintas, sugerindo que a composição antigênica do vírus rábico é estável e geralmente não é afetada pelo número de passagens em diferentes hospedeiros.

Numerosas pesquisas têm sido realizadas focalizando seqüências parciais ou completas dos genes que codificam a nucleoproteína (N) (ITO et al., 2001a,b; HEINEMANN et al., 2002; ROSA et al., 2006) e a glicoproteína (G) (SATO et al., 2006) e um número limitado considerando a fosfoproteína (M₁ ou NS) e a proteína matriz (M ou M₂) (NADIN-DAVIS et al., 2002; BERNARDI et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007b). Dentre as regiões do genoma viral, a região do gene N tem sido a mais freqüentemente utilizada nos estudos de caracterização genética, por ser mais conservada e fortemente expressa, além de se considerar a disponibilidade de várias seqüências da nucleoproteína no GenBank (TORDO; KOUKNETZOFF, 1993; KISSI; TORDO; BOURHY, 1995). Foi demonstrado ainda, que a sua análise permite mais agrupamentos significantes para identificar variantes virais ou variantes espécie-específica (HANLON; ORCIARI, 2001). A proteína do gene G por sua vez, é importante para investigação da patogenicidade e útil em estudos moleculares, porque desempenha uma função no potencial para adaptação do hospedeiro (BADRANE; TORDO, 2001). Também, é altamente susceptível à mutação (WUNNER et al., 1988).

No Brasil, os dados obtidos pela análise genética das amostras originárias de diversas regiões do país, indicam que o vírus circulante pertence ao genótipo 1 do gênero *Lyssavirus* envolvendo diferentes espécies domésticas e

silvestres associadas a ciclos endêmicos distintos (ITO et al., 2001a,b; HEINEMANN et al., 2002; GOMES, 2004; SATO et al., 2004, 2006; SCHAEFER et al., 2005; CARNIELI JR. et al., 2006, 2008; ROSA et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2007a,b).

Ito et al. (2001a), pesquisando 50 amostras positivas para raiva isoladas no Brasil, demonstraram, mediante a caracterização genética do gene N, que os isolados do vírus rábico são agrupados em duas populações de reservatórios, geneticamente distintas, mantidos por cães e morcegos hematófagos.

Favoretto et al. (2002), utilizando anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína viral de 330 amostras de vírus rábico, isoladas de seres humanos e de diversas espécies animais, definiram seis variantes antigênicas, demonstrando a existência de múltiplos ciclos de transmissão independentes e envolvimento de diferentes espécies de morcegos.

Gomes (2004), encontrou cinco variantes do vírus da raiva na região semi-árida de Patos - PB, conforme a análise da seqüência dos genes que codificam as proteínas N e M₁. Estas variantes são mantidas na população de cães domésticos, de raposas do Nordeste (*Dusicyon vetulus*), de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e de morcegos insetívoros (*Mollossus mollossus*).

Sato et al. (2004), analisando 14 amostras brasileiras, verificaram que os isolados podem ser classificados, tanto pelo seqüenciamento do gene G e região intergênica G-L como pelo gene N, em dois grupos diferentes mantidos cada um pela variante canina e pela variante de morcego hematófago.

Rosa et al. (2006), investigando dois surtos de raiva humana em áreas rurais dos municípios de Portel e Viseu (PA), determinaram, pela tipificação antigênica e genética com base no seqüenciamento do gene N, que os isolados pertencem ao mesmo ciclo endêmico, tendo identificado a variante 3, característica de *Desmodus rotundus*. Também, concluíram que as agressões estiveram relacionadas com a vulnerabilidade das habitações e com o do pequeno número de animais domésticos encontrados, favorecendo a utilização dos seres humanos como fonte de alimento.

Sato et al. (2006), indicaram que as raposas (*Dusicyon vetulus*) desempenham papel importante na manutenção e disseminação da raiva na região Nordeste. Tal estudo consistiu na análise filogenética do gene da glicoproteína G de 41 amostras de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies animais e de seres humanos nos Estados do Maranhão, Pará e Tocantins. Contudo, Carnieli Jr. et al. (2008), analisando o gene da nucleoproteína N de 52 amostras no período de 2000 a 2005, sugeriram que o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) constitui o principal reservatório do vírus naquela região. Esta divergência na identificação de espécies reservatórios já foi descrita por Kotait et al. (2007) que referiram que os dois canídeos silvestres apresentam nomenclatura comum e regional, além de similaridades morfológicas. Ainda, em situações particulares, ocupam a mesma área geográfica dificultando a sua identificação.

Kobayashi et al. (2007a), realizando o seqüenciamento do gene da nucleoproteína viral, afirmaram que o contato entre cães e canídeos selvagens tem o potencial de gerar novas variantes virais, sendo importante o controle do ciclo da raiva nestas populações para prevenir a disseminação da doença.

Barbosa et al. (2008), em um trabalho de caracterização do gene da nucleoproteína N, verificaram que o vírus rábico tem circulado no município de Augusto Correa (PA) há pelo menos 75 anos, em diferentes hospedeiros, sugerindo uma correlação entre distribuição geográfica e dispersão de linhagens.

Vários autores (BATISTA-MORAIS et al., 2000; FAVORETTO et al., 2001) relataram uma variante do vírus da raiva própria de sagüis (*Callithrix jachus*). Sua ocorrência também foi registrada nos Estados do Piauí e Pernambuco (WADA, 2007). O primeiro caso brasileiro de raiva humana registrado em 2008 foi relacionado com esta variante, no litoral oeste do Ceará (LIMA, 2008).

Face ao exposto, esta pesquisa foi desenvolvida visando realizar um estudo epidemiológico da raiva no Estado do Maranhão, Nordeste do país, no período de 2003 a 2005, de modo a identificar a variante viral circulante e contribuir para o desenvolvimento de ações de prevenção e controle dessa enfermidade.

Fonte: www.ma.gov.br/cidadao/estado/geografia/vegetacao.php
Figura 1 - Mapa do Estado do Maranhão de acordo com a vegetação

Foto: Brito, C. J. C., 2005.

Figura 2 - Bovino agredido por morcego em 2005 no município de Cândido Mendes – MA

Foto: Brito, C. J. C., 2005.

Figura 3 – Fotografia de felino com suspeita de raiva, obtida durante a epidemia de raiva de 2005, ocorrida no povoado de Aurizona, município de Godofredo Viana – MA

Foto: Brito, C. J. C., 2005.

Figura 4 - Poço localizado atrás da casa das vítimas agredidas por morcegos no povoado de Aurizona, município de Godofredo Viana – MA

Foto: Brito, C. J. C., 2005.

Figura 5 - Morcego não hematófago capturado em 2005 no município de Carutapera – MA

Foto: Brito, C. J. C., 2005.

Figura 6 - Habitação de garimpeiro no município de Luis Domingues – MA

Foto: Brito, C. J. C., 2005.

Figura 7 - Casa onde ocorreram duas vítimas de raiva humana, em 2005, no povoado de Aurizona, município de Godofredo Viana – MA

Foto: Brito, C. J. C., 2005.

Figura 8 - Gato do Mato (*Leopardus tigrinus*) em cativeiro no povoado de Aurizona, município de Godofredo Viana – MA

Foto: Brito, C. J. C., 2007.

Figura 9 – Macaco caiarara (*Cebus kaapori*) mantido como animal de estimação em um povoado do Rio Preguiças no litoral Norte oriental do Maranhão

“Um sinal é o evento antecedente do conseqüente, e contrariamente, o conseqüente do antecedente, quando conseqüências semelhantes foram anteriormente observadas”
Thomas Hobbes

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Verificar a ocorrência da raiva nos animais e nos seres humanos do Estado do Maranhão.
- Avaliar o comportamento biológico das amostras do vírus da raiva isoladas.
- Avaliar a patogenicidade das amostras do vírus rábico em camundongos previamente imunizados com uma vacina anti-rábica comercial, tendo isolados do estudo como vírus de desafio.
- Caracterizar antigenicamente e geneticamente as amostras de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies animais e de seres humanos.

“Estar doente é uma espécie de mágoa em si”
Friedrich Nietzsche

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão abordados os itens utilizados para a realização do estudo, envolvendo o uso de animais, seres humanos e técnicas de diagnóstico da raiva.

3.1 Amostras de campo

Foram utilizados 54 fragmentos de cérebro de diferentes espécies animais e de seres humanos, diagnosticados como positivos para raiva, cedidos pelo Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), localizado em São Luis - MA, correspondente ao período de 2003 a 2005 (Quadro 1).

Espécies	Número de amostras positivas por ano			Total
	2003	2004	2005	
Canina	7	8	7	22
Bovina	-	13	8	21
Felina	1	-	1	2
Ovina	-	1	1	2
Suína	-	-	1	1
Quiróptera	-	-	1	1
Humana	-	2	3	5
Total	8	24	22	54

- = não recebidos

Quadro 1 - Número de amostras de cérebros positivos no Estado do Maranhão, cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Centro de Ciências Agrárias (CCA) - São Paulo - 2008

A seleção das amostras de seres humanos foi independente de sexo, raça ou idade e a manipulação de pacientes ou mesmo necropsia foi realizada por autoridades médicas do Estado do Maranhão. Foram disponibilizados de 1,2 a 1,3 gramas, de tecido encefálico de cinco amostras humanas.

Os fragmentos foram acondicionados em frascos plásticos esterilizados, congelados e mantidos à temperatura de -20°C. Posteriormente, foram transportados ao Laboratório de Zoonoses Virais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP para processamento. Todo o material restante foi dispensado adequadamente pelo processo de autoclavação.

3.2 Camundongos

Foram empregados camundongos suíços albinos (*Mus musculus*): separados em machos e fêmeas; 21 dias de idade; peso vivo entre 11g e 14g; linhagem CH3 - Rockfeller, procedentes do extinto Laboratório de Febre Aftosa, localizado em Barretos - SP. Os animais criados no biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ - USP foram submetidos à inoculação de suspensões de cérebros de seres humanos e animais suspeitos de raiva, titulação do vírus, sorologia e avaliação da patogenicidade das amostras de campo.

3.3 Soros de camundongos

A colheita de sangue de quatro grupos de 10 camundongos após 7, 14, 21 e 28 dias de imunização foi realizada por punção cardíaca mediante anestesia com éter etílico, utilizando seringas plásticas descartáveis de 3mL e agulha 25 x 7. Após a centrifugação, o soro foi separado do coágulo e armazenado em “pool” por grupo à temperatura de -20°C até o momento do uso. Os soros foram submetidos à técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para verificar se os camundongos vacinados produziram anticorpos anti-rábicos.

3.4 Conjugado anti-rábico policlonal

Para confirmar a presença de inclusões virais nas amostras estudadas, foi utilizado um conjugado anti-rábico produzido no Laboratório de Zoonoses Virais do VPS, da FMVZ – USP, a partir do soro hiperimune de hamsters, de acordo com o Centro Panamericano de Zoonoses (1975), tendo como antígeno a vacina anti-rábica comercial Defensor^{®1}, produzida com amostra fixa de vírus rábico (PV). O conjugado apresentou diluição ótima de trabalho a 1:100 em solução salina tamponada (PBS) e pH 7,2.

3.5 Conjugado anti-espécie policlonal

A detecção de anticorpos no soro dos animais imunizados foi realizada pela prova de IFI utilizando um conjugado anti-camundongo produzido em cabra, absorvido em soro humano e IgG marcada com isotiocianato de fluoresceína da KPL^{®2}. Foi obtida a diluição 1:10 em PBS (pH 7,2) conforme recomendação do fabricante.

3.6 Diluente

O diluente empregado no preparo das suspensões de cérebro e diluição do vírus foi constituído de água destilada esterilizada em autoclave, acrescida de 2% (v/v) de soro de coelho, esterilizado por filtração em filtro Millipore^{®3} de 142 mm de diâmetro, com membrana do tipo HA e porosidade de 0,45 µm, adicionado de terramicina na proporção de 0,2 mg/mL e pH ajustado em 7,2 (KOPROWSKI, 1996).

^{®1} Laboratório Pfizer

^{®2} Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Maryland, USA. Cat. 02-18-06. Lote n°060646

^{®3} Millipore-Millipore Filter Corporation

3.7 Vacina anti-rábica

Foi utilizada na imunização de camundongos, uma vacina comercial importada¹, cedida pela empresa importadora, produzida com amostra fixa de vírus rábico (PV), inativado pela beta propiolactona, desenvolvido em células BHK e contendo o adjuvante avridine.

3.8 Técnica de imunofluorescência direta (IFD)

A técnica de imunofluorescência direta foi realizada de conformidade com a metodologia de Goldwasser e Kissling (1958), com ligeira modificação, descrita por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996). Para a análise das amostras foram feitas impressões cerebrais por pressão nas lâminas de microscopia, secas em temperatura ambiente e fixadas com acetona em cubetas de Coplin, durante 2 horas, em um congelador entre -15°C e -20°C . Após a fixação, foi delimitado um campo com 1 cm de diâmetro, onde foi acrescentado o conjugado anti-rábico policlonal. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e levadas à estufa a 37°C por 30 minutos. Após incubação, foram submersas três vezes em PBS (pH 7,4) por 5 minutos, seguida de lavagem em água destilada. Após secagem, foi colocada uma gota de glicerina tamponada (pH 8,5) sobre a lâmina e montada com lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência, sendo consideradas positivas as amostras com presença de inclusões ou delicados pontos de coloração verde brilhante. As negativas não demonstraram fluorescência.

3.9 Técnica de imunofluorescência indireta (IFI)

Os soros dos camundongos imunizados foram diluídos em série na razão 2 com PBS (pH 7,4). As diluições do soro foram colocadas em contato com

¹ Laboratório Pfizer (Rabivac®). Lote e partida 001/05. Fabricação em agosto/05 e vencimento agosto/07.

impressões cerebrais positivas para raiva e incubadas em câmara úmida à temperatura de 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram submersas três vezes em PBS, (pH 7,4), por 5 minutos e lavadas em água destilada. Após secagem, foi acrescentado o conjugado anti-espécie e acondicionadas em câmara úmida à temperatura de 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS (pH 7,4) por 5 minutos, seguida de lavagem em água destilada e secagem. Após montada com lamínula, utilizando glicerina tamponada (pH 8,5), foi realizada a leitura em microscópio de imunofluorescência. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência resultante da ligação do anticorpo presente no soro com o antígeno da lâmina mediante preconizado por Goldwasser e Kissling (1958). As amostras negativas não revelaram fluorescência.

3.10 Técnica de inoculação intracerebral em camundongo (ICC)

Esta técnica foi empregada conforme Koprowski (1996), com inoculação de 0,03 mL de suspensão a 20% (p/v) do hipocampo, cerebelo e córtex cerebral das diferentes espécies estudadas ou diluições seriadas de suspensão de cérebros de camundongos na titulação. Os animais infectados foram observados diariamente por 21 a 30 dias, sendo registradas para interpretação da prova, as mortes ocorridas após o quinto dia de inoculação e confirmadas pela IFD.

3.11 Titulação das amostras de vírus

As amostras selecionadas com base na espécie animal, após reativação por três a cinco passagens adicionais pela ICC, foram tituladas, utilizando-se diluições seriadas de razão 10, a partir de uma suspensão inicial de cérebro de camundongos a 20% (p/v). Grupos de 10 camundongos para cada uma das diluições de 10^{-1} a 10^{-5} foram inoculados por via intracerebral (IC), com um volume de 0,03 mL, e observados diariamente por 30 dias. Foram considerados positivos

todos os animais mortos após o quinto dia de inoculação e que manifestaram sinais da raiva, com resultado positivo pela IFD. O título do vírus em dose letal 50%, por via intracerebral em camundongos ($DL_{50}/0,03\text{mL/IC}$), foi expresso em logaritmo de base 10 e calculado seguindo o método de Reed e Muench (1938).

3.12 Avaliação da patogenicidade das amostras em camundongos vacinados

A patogenicidade das amostras do vírus da raiva foi avaliada em camundongos previamente imunizados com uma vacina anti-rábica comercial de vírus inativado, adaptando-se aos procedimentos descritos no teste de avaliação de vacina do CDC de Atlanta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1988). A vacina anti-rábica foi diluída a 1:2, 1:10, 1:50, 1:250 e 1:1250, e cada diluição foi inoculada em grupos de 16 camundongos por via intramuscular, no membro posterior direito, com 0,1 mL. Após 30 dias, foi realizado o desafio com cinco isolados de campo de diferentes espécies, inoculando-se 0,1 mL da suspensão viral na musculatura do masseter, contendo de 100 $DLIC_{50}$ a 1000 $DLIC_{50}$ / 0,03 mL. Os animais desafiados foram observados por 30 dias à procura de sinais de raiva e os que sucumbiram durante o período de observação foram examinados pela IFD para confirmar o diagnóstico.

3.13 Caracterização antigênica com anticorpos monoclonais (MAbs)

Quatro amostras de vírus, sendo uma isolada de morcego e três de seres humanos foram caracterizadas pela IFI com a utilização de um painel de 10 anticorpos monoclonais (MAbs) direcionados contra a fosfoproteína, procedentes do "Canadian Food and Inspection Agency", Ottawa - Canadá, conforme a técnica descrita por Smith e King (1996). A amostra de morcego empregada na IFI foi obtida a partir de material original e as humanas foram resultantes de material de primeira passagem em camundongos. Na leitura, as lâminas positivas foram caracterizadas

pelo brilho e intensidade da fluorescência, o número e tamanho dos corpúsculos de inclusão, utilizando-se a gradação 1+, 2+ e 3+ resultante de uma fluorescência de baixa, média ou alta intensidade. As negativas mostraram ausência de fluorescência

3.14 Caracterização genética

A caracterização genética das amostras utilizadas no presente estudo foi realizada mediante um convênio de colaboração internacional que o VPS mantém com os pesquisadores, Prof. Dr. Takeo Sakai e Prof. Dr. Takuya Itou do College of Bioresource Sciences, da Nihon University, Kanagawa, Japão para a realização de estudo molecular do vírus da raiva.

3.14.1 Extração do RNA

As amostras foram diluídas a 20% em PBS, a partir de cérebro de espécimes originais ou a partir de material cerebral obtido na primeira passagem em camundongos. O RNA foi extraído utilizando o QIAamp viral RNA mini Kit¹, de acordo com as instruções do fabricante, no Laboratório de Zoonoses Virais da FMVZ – USP. As amostras foram armazenadas a - 80°C até o momento do uso e diluídas 10 vezes antes da análise.

3.14.2 Transcrição Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)

Após a extração do ácido nucléico, foi realizada a RT-PCR, segundo Sato et al. (2004). Na amplificação do gene que codifica a glicoproteína G (posição

¹ Qiagen, Tokyo, Japan

3318-3916), empregou-se 1 µL de RNA no SuperScript One-Step RT-PCR System¹, utilizando o sense primer Ga3222-40 (5'-CGCTGCATTTT(A/G)TCA(A/G)AGT-3') e o anti sense primer Gb4119-39 (5'-GGAGGGCACCATTTGGT(A/C)TC-3').

O gene que codifica a nucleoproteína N (posição 109-311) foi amplificado com o uso do sense primer P1 (5'-CTACAATGGATGCCGACAAGA-3') e anti sense primer P2 (5'-CCCATATAACATCCAACAAAGTG-3').

Os produtos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, com coloração de brometo de etídio e enviados para o laboratório do College of Bioresource Sciences, da Nihon University, Kanagawa, Japão, para o seqüenciamento e análise filogenética.

3.14.3 Com o gene codificador da proteína G

Neste estudo, para a caracterização genética, foram utilizadas 31 amostras de cérebro sendo 12 caninos, 11 bovinos, 1 felino, 1 ovino, 1 suíno, 1 quiróptero e 4 humanos. Todos os materiais foram positivos para raiva pela IFD (Quadro 2).

Espécies	Número de amostras positivas utilizadas por ano			Total
	2003	2004	2005	
Canina	4	2	6	12
Bovina	-	6	5	11
Felina	1	-	-	1
Ovina	-	1	-	1
Suína	-	-	1	1
Quiróptera	-	-	1	1
Humana	-	2	2	4
Total	5	11	15	31

- = não processado

Quadro 2 - Número de amostras de cérebros positivos para a raiva no Estado do Maranhão utilizadas na caracterização genética do gene G - São Paulo - 2008

¹ Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

3.14.4 Com o gene codificador da proteína N

Para esta análise, foram utilizadas 52 amostras de cérebro sendo 22 caninos, 19 bovinos, 2 felinos, 2 ovinos, 1 suíno, 1 quiróptero e 5 humanos. Todos os materiais foram positivos para raiva pela IFD (Quadro 3).

Espécies	Número de amostras positivas utilizadas por ano			Total
	2003	2004	2005	
Canina	7	8	7	22
Bovina	-	11	8	19
Felina	1	-	1	2
Ovina	-	1	1	2
Suína	-	-	1	1
Quiróptera	-	-	1	1
Humana	-	2	3	5
Total	8	22	22	52

- = não processado

Quadro 3 - Número de amostras de cérebros positivos para a raiva no Estado do Maranhão utilizadas na caracterização genética do gene N - São Paulo - 2008

3.14.5 Seqüenciamento

Os produtos amplificados de RT-PCR foram seqüenciados conforme a metodologia descrita por Sato et al. (2004). Foi empregado o seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), o Kit PRISM Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing Ver. 2.0 Ready Reaction (Applied Biosystems) e o Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

3.15 Análise filogenética

A análise filogenética foi baseada nos resultados do seqüenciamento, com o emprego do DNASIS (2.0), que foram comparados com dados disponíveis no

GenBank/database (accession numbers). O estudo do alinhamento de nucleotídeos entre as amostras com base na região 599 do gene G, posição 3318-3916 e da região 203 do gene N, posição 109-311, foi realizado com os programas de bioinformática Clustal X (1.81) e GENETYX-WIN (5.0), de acordo com Thompson et al. (1997). Foram calculadas homologias de seqüências de nucleotídeos e seqüências deduzidas de aminoácidos. Os agrupamentos foram testados segundo o método de neighbor-joining (NJ), modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e com 1000 replicações de "Bootstrap" considerando-se evidência de agrupamento de linhagens, o valor de "Bootstrap" > 75% (HILLIS; BULL, 1993). O programa TREEVIEW foi utilizado para a ilustração gráfica do dendrograma (PAGE, 1996).

3.16 Delineamento Experimental

Os fragmentos de amostras de cérebro de animais e de seres humanos, colhidos no Estado do Maranhão e positivos para a raiva foram encaminhados ao Laboratório de Zoonoses Virais do VPS da FMVZ – USP. Estas amostras foram novamente submetidas às provas de IFD e ICC, para confirmação do diagnóstico e reativação da amostra. Todos os materiais positivos originais ou de subpassagem foram processados para a extração de ácido nucléico e enviados para o laboratório de Kanagawa - Japão, para o seqüenciamento genético. Paralelamente, quatro amostras foram submetidas a um painel de MAbs visando à caracterização antigênica. Em seguida, foi realizado o estudo do comportamento biológico em camundongos, por meio de passagem intracerebral, para fins de avaliação do período de incubação e registro da sintomatologia clínica. As amostras selecionadas com base na espécie animal foram reativadas e submetidas à titulação viral. Posteriormente, a patogenicidade dessas amostras do vírus da raiva, encontradas no Estado do Maranhão, foi avaliada em camundongos previamente imunizados com uma vacina anti-rábica comercial, seguindo-se o protocolo do CDC de Atlanta. A presença de anticorpos anti-rábicos nos camundongos após 7, 14, 21 e 28 dias de vacinação foi demonstrada pela técnica de IFI.

“A descoberta científica se baseia na excitação do debate”
“Se a idéia se mostra falsa, o cientista repensa, refaz o trabalho e tenta de novo; as
experiências se sucedem até que as idéias e a observação se juntem”
Michael White

RESULTADOS

4 RESULTADOS

No Laboratório de Zoonoses Virais do VPS da FMVZ – USP as amostras recebidas com diagnóstico positivo para raiva foram novamente submetidas às provas de IFD e ICC.

Das 54 amostras de vírus da raiva procedentes do Estado do Maranhão, e cedidas no período de 2003 a 2005, todas foram positivas na IFD e 19 resultaram negativas à ICC, correspondendo respectivamente a 100 % e 35,2 % em ambos os testes (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados obtidos na técnica de IFD (imunofluorescência direta) e ICC (inoculação intracerebral em camundongo) em amostras de cérebros de diferentes espécies do Estado do Maranhão - São Paulo - 2008

Espécies	Amostras testadas	IFD		ICC	
		Positivas	(%)	Negativas	(%)
Canina	22	22	100,0	7	31,8
Bovina	21	21	100,0	7	33,3
Felina	2	2	100,0	1	50,0
Ovina	2	2	100,0	1	50,0
Suína	1	1	100,0	0	0
Quiróptera	1	1	100,0	1	100,0
Humana	5	5	100,0	2	40,0
Total	54	54	100,0	19	35,2

Entre as amostras negativas, 7/22 (31,8%) foram procedentes de caninos, 7/21 (33,3%) de bovinos, 1/2 (50%) de felino, 1/2 (50%) de ovino, 1/1 (100%) de quiróptero e 2/5 (40%) de humanos.

As 35 amostras consideradas positivas na prova de ICC revelaram um período de incubação entre 7 e 17 dias, determinando sinais clínicos variados com duração média de 4 dias e extremos de 1 a 8 dias.

As amostras originárias de cães determinaram manifestação da doença entre o sétimo e o nono dia após a infecção. A maior parte dos camundongos demonstrou aerofobia, hiperestesia generalizada, sensibilidade acentuada a ruídos,

e agressividade. Alguns apresentaram paralisia de membros posteriores. As mortes foram assinaladas a partir do oitavo dia. O período de incubação médio foi 10,9 dias. Das 15 amostras caninas inoculadas que resultaram positivas na ICC, quatro estavam decompostas, revelando nesses casos, discreto aumento do crânio, com presença de massa purulenta e demora na evolução dos sinais clínicos.

Nos animais inoculados com amostras bovinas, as manifestações de pêlos eriçados, emagrecimento, paralisia e morte ocorreram a partir do sétimo dia, sendo que a maioria apresentou sintomas no décimo primeiro dia. O período de incubação médio foi 10,6 dias. Para este inóculo, apenas um grupo de animais desenvolveu excitação e agressividade antes da morte.

Os grupos de camundongos infectados com amostras de felino e de suíno, apresentaram quadro clínico semelhante ao observado nas amostras caninas, com sinais de aerofobia e agressividade. O primeiro desenvolveu a doença a partir do décimo primeiro dia e o segundo, do décimo dia pós-inoculação. O período de incubação médio obtido foi 15 e 11 dias, respectivamente.

A amostra de ovino determinou um período de incubação de 9 a 13 dias, com média de 11 dias e quadro de emagrecimento, paralisia e prostração. Todos os animais morreram até o décimo quinto dia após o início da apresentação dos sinais.

Os camundongos inoculados com amostras humanas mostraram alteração de comportamento caracterizada por agressividade, dificuldade de locomoção, aerofobia e emagrecimento progressivo, de 7 a 13 dias pós-inoculação. Em alguns casos, foram observadas convulsões seguidas de morte. O período de incubação médio foi 12,5 dias.

O cérebro do morcego apresentou-se negativo à prova de ICC, com resultados positivos para IFD e RT-PCR. O espécime estava em adiantado estado de decomposição, porém, foi identificado como *Desmodus rotundus*.

Na avaliação da patogenicidade das amostras em camundongos vacinados, o título viral de desafio obtido em cada inóculo foi muito baixo, mesmo após sucessivas passagens adicionais pela ICC. Dessa forma, foram adaptados os procedimentos do teste do CDC de Atlanta, cujo resultado está apresentado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Titulação das cinco amostras de vírus usadas para desafio na avaliação da patogenicidade em camundongos vacinados, em dose letal 50% (DLIC₅₀) - São Paulo - 2008

Amostra de desafio	Título DLIC ₅₀ /0,03mL
Canina 321	1,21
Humana 327	2,9
Ovina 332	2,22
Bovina 651	1,63
Canina 657	1,66

Tabela 3 - Resultados obtidos no desafio em camundongos previamente imunizados com vacina anti-rábica, frente às cinco amostras de vírus da raiva isoladas de cérebros das espécies canina, humana, ovina e bovina no Estado do Maranhão - São Paulo - 2008

Vacina	Amostras														
	Canina 321			Humana 327			Ovina 332			Bovina 651			Canina 657		
	I	M	%	I	M	%	I	M	%	I	M	%	I	M	%
1:2	16	14	87,5	16	7	43,8	16	2	12,5	16	15	93,8	16	7	43,8
1:10	16	14	87,5	16	10	62,5	16	3	18,8	16	16	100,0	16	9	56,3
1:50	16	14	87,5	16	10	62,5	16	4	25,0	16	16	100,0	16	16	100,0
1:250	16	16	100,0	16	10	62,5	16	7	43,8	16	16	100,0	16	16	100,0
1:1250	16	16	100,0	16	16	100,0	16	3	18,8	16	16	100,0	16	16	100,0

I= Número de camundongos inoculados

M= Número de camundongos mortos

%= Porcentagem de camundongos mortos

As amostras (canina 321, bovina 651 e canina 657) revelaram uma maior patogenicidade e virulência frente às demais analisadas. Todos os camundongos imunizados com a vacina diluída a 1:250 e 1:1250 morreram após o desafio com estas amostras. Verificou-se que na diluição 1:50, a vacina não conferiu proteção contra as amostras bovina 651 e canina 657. Também, não houve

diferença no número de mortes com a vacina 1:2 até 1:50 para os animais desafiados com a amostra canina 321.

A vacina apresentou proteção para a amostra ovina 332, se forem consideradas as diluições 1:2, 1:10 e 1:50, que resultaram na morte de dois, três e quatro camundongos, respectivamente. Por outro lado, na diluição 1: 250 morreram sete dos 16 animais e três na diluição 1: 1250.

A amostra humana 327 apresentou título viral comparativamente maior ao das demais amostras. Notou-se ainda que a menor diluição da vacina não protegeu 43,8% dos camundongos inoculados com este material.

A tabela 4 apresenta os títulos obtidos na imunofluorescência indireta (IFI) em soros de camundongos vacinados. Para se classificar um determinado soro como reagente em qualquer dos períodos avaliados, foi registrada a presença de anticorpos anti-rábicos. O grupo de animais “após 7 dias de imunização” apresentou título na diluição 1:8. Os demais grupos apresentaram título na diluição 1:32.

Tabela 4 – Títulos de anticorpos anti-rábicos obtidos na técnica de IFI (imunofluorescência indireta) em soros de camundongos vacinados em diferentes períodos - São Paulo - 2008

Grupo	IFI					
	Diluição do soro					
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
7 dias	2+	2+	1+	-	-	-
14 dias	2+	2+	2+	2+	1+	-
21 dias	2+	2+	2+	2+	1+	-
28 dias	2+	2+	2+	2+	1+	-

-= reação negativa

1+= muitos corpúsculos pequenos (Fluorescência de baixa intensidade)

2+= muitos corpúsculos pequenos e alguns grandes (Fluorescência de média intensidade)

A caracterização antigênica de quatro amostras de vírus, isoladas de um morcego e de três seres humanos, identificou o perfil antigênico correspondente à variante de morcego hematófago (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados obtidos na caracterização antigênica de amostras de vírus da raiva isoladas de cérebros de morcego e de seres humanos no Estado do Maranhão - São Paulo - 2008

MAbs	Amostra Morcego	Amostra Humana		
	Bat5	671	673	675
32HD2	3+	2+	2+	2+
661C	-	(+)	-	-
1318	3+	1+	2+	2+
1590	3+	-	2+	2+
1745	-	(+)	-	(+)
1386	3+	2+	2+	1+
1748	3+	(+)	2+	3+
32FF1	3+	2+	2+	3+
11DD1	-	-	-	-
1495	3+	2+	2+	2+

-= ausência de fluorescência

(+)= poucos corpúsculos pequenos

1+= muitos corpúsculos pequenos (Fluorescência de baixa intensidade)

2+= muitos corpúsculos pequenos e alguns grandes (Fluorescência de média intensidade)

3+= numerosos corpúsculos pequenos, médios e grandes (Fluorescência de alta intensidade)

Na figura 10 estão representados os resultados da análise genética do gene da proteína G baseado na sequência 599bp, posição 3318-3916, comparada com a amostra Mokola. Estas amostras estão descritas no apêndice A.

Figura 10 - Dendrograma da análise filogenética entre amostras de vírus rábico isoladas no Estado do Maranhão, tendo como referência a amostra Mokola, com base na sequência 599bp (3318-3916) do gene da proteína G

O dendrograma baseado na sequência 203bp do gene da proteína N, tendo como referência a amostra Mokola, está exposto na figura 11. As amostras utilizadas estão representadas no apêndice B.

Figura 11 - Análise filogenética entre amostras de vírus rábico isoladas no Estado do Maranhão, tendo como referência a amostra Mokola, com base na sequência 203bp (109-311) do gene da proteína N

No presente estudo, a caracterização genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos, de morcego e de seres humanos revelou que os isolados foram divididos em dois agrupamentos, geneticamente distintos, mantidos por cães e por morcego hematófago.

O grupo dos carnívoros mostrou dois ramos, constituídos pelos grupos A e B no clado I. As outras amostras formaram o clado II, associado ao morcego hematófago composto pelos grupos C e D.

A análise do gene da glicoproteína G demonstrou que as amostras apresentaram homologia de pelo menos 82,4% nos 599 nucleotídeos. Todos os isolados dos clados I e II mostraram homologia de nucleotídeos igual a 92,6% e 94,3%, respectivamente.

O seqüenciamento do gene da nucleoproteína N indicou homologia entre os 203 nucleotídeos de pelo menos 82,7%. As amostras relacionadas aos cães evidenciaram homologia de nucleotídeos igual a 95,0 % e as relacionadas aos morcegos hematófagos de 94,0%.

Foi constatada, pela análise das seqüências dos genes que codificam a glicoproteína G e a nucleoproteína N, a prevalência da variante de morcego hematófago, no Norte ocidental do Estado do Maranhão, no ano de 2005, e em alguns municípios do Norte oriental, da região Nordeste e Noroeste daquele Estado, nos anos de 2003 – 2005, provocando a doença em um quiróptero e um felino e também em seres humanos, bovinos, caninos e ovinos. A variante canina acometeu as espécies canina, humana, bovina, suína e felina, nas porções Central, Sudoeste, Noroeste e Nordeste do Estado, no período de 2003 - 2005. Além disso, esta variante viral acompanhou a variante de morcego hematófago, nas áreas do Nordeste e Noroeste, onde provocou a infecção em cães, nos anos de 2004 - 2005 (Figura 12).

Em azul = grupo A (■)
 Em vermelho = grupo B (▲)
 Em verde = grupo C (●)
 Em preto = grupo D (●)

Fonte: www.citybrazil.com.br/ma/index.htm adaptado por Brito, C. J. C., 2007.

Figura 12 - Localização geográfica das amostras de vírus da raiva procedentes do Estado do Maranhão, utilizadas na caracterização genética com base nos genes que codificam a glicoproteína G e nucleoproteína N - São Paulo - 2008

“Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância”
Hippocrates

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, todas as amostras submetidas à técnica de IFD foram positivas, revelando inclusões de coloração verde característica, de tamanhos variados, conforme a descrição de Goldwasser e Kissling (1958). Entretanto, houve resultados negativos na prova de ICC em 19 destas amostras, sendo 7/22 (31,8%) provenientes de caninos; 7/21 (33,3%) de bovinos; 1/2 (50%) de felino; 1/2 (50%) de ovino; 1/1 (100%) de quiróptero (*Desmodus rotundus*) e 2/5 (40%) de humanos. Este achado pode ser explicado pelo adiantado estado de decomposição de algumas amostras, tanto por sua má conservação, como pela obtenção de espécimes já decompostos, em vista da dificuldade na localização dos animais para colheita de material para diagnóstico.

A constatação anterior está em consonância com Brito (2002), que verificou maior sensibilidade da IFD em relação à ICC em materiais putrefeitos, concluindo que é menor a confiabilidade no diagnóstico firmado a partir de materiais decompostos.

Acha e Szyfres (2003), comentaram que a IFD é a última prova que resulta negativa no diagnóstico de tecidos em deterioração progressiva, fundamentando a hipótese (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996) de que esta detecta tanto antígenos vivos como mortos, enquanto a ICC apenas detecta partículas virais viáveis nas amostras.

A amostra de morcego incluiu-se no estudo, após visita a Ilha Sapeca (município de Carutapera), onde foi encontrado um bovino morto e constatados relatos de agressões nos animais. A confirmação da atividade viral no *D. rotundus*, capturado naquela localidade, foi realizada com a IFD, RT-PCR e posterior seqüenciamento em decorrência da putrefação do material, o que o tornou impróprio para o isolamento viral. O uso da técnica de RT-PCR, no diagnóstico de rotina é desaconselhado pelos especialistas da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005), porém, representa um instrumento de alto valor em circunstâncias especiais, como no presente caso. De forma semelhante, outros

autores identificaram o vírus da raiva por essa técnica (TORDO; SACRAMENTO; BOURHY, 1996; DAVID et al., 2002; SCHAEFER et al., 2002).

Em relação às amostras positivas na prova de ICC, todos os animais morreram até o vigésimo primeiro dia de observação, concordando com Koprowski (1996). Foi obtido um período de incubação de 7 a 17 dias, semelhante ao relatado por Atanasiu (1975), que descreveu variações de 7 a 20 dias para a incubação da doença após a inoculação intracerebral em camundongos com vírus de “rua”.

Fekadu e Shaddock (1984) referiram que a variabilidade do período de incubação é influenciada pela dose infectante, patogenicidade, local de inoculação, capacidade invasiva do vírus, bem como pela idade e susceptibilidade da espécie animal.

Os camundongos inoculados apresentaram um quadro clínico variado com média de 4 dias e duração de 1 a 8 dias. Estes resultados são coerentes com Oliveira et al. (1995), que em um trabalho de caracterização biológica e imunológica de 35 amostras de vírus da raiva, descreveram uma duração clínica média de 3,3 dias, com o período menor de 1 dia e o maior de 8 dias.

As amostras de vírus isoladas da espécie canina provocaram, na maior parte dos animais inoculados, aerofobia, hiperestesia, sensibilidade a ruídos e agressividade. As manifestações clínicas iniciaram-se entre o sétimo e o nono dia após a infecção. Entretanto, alguns camundongos revelaram paralisia de membros posteriores, similar à dos animais infectados com amostras bovinas. Para este inóculo, com sintomas produzidos a partir do sétimo dia, também foi assinalado um grupo com sinais de excitação e agressividade antes da morte. Ressalta-se que apesar dos casos originários da mesma espécie animal apresentarem comportamento biológico diferente, os períodos de incubação foram semelhantes, concordando com os achados de Germano et al. (1988), que realizando um estudo comparativo de amostras de vírus rábico, não verificaram, em dois isolados de cão antigenicamente distintos, diferenças significantes em relação aos períodos de observação clínica e mortalidade após a inoculação intramuscular no mesmo sistema biológico.

Os grupos de animais inoculados, respectivamente, com suspensões de cérebros de felino e de suíno, demonstraram um quadro clínico “furioso”, conforme constatado nos camundongos submetidos às amostras caninas. Os isolados de vírus diferiram, tanto no período de incubação médio, 15 dias e 11 dias, como no surgimento dos sinais, a partir do décimo primeiro dia para a amostra felina e décimo dia para a amostra suína. As discrepâncias se justificam pela discreta degradação tissular das amostras que mesmo assim, mantiveram a sua infecciosidade (BRITO, 2002).

A análise dos camundongos infectados com amostra de ovino indicou os mesmos sintomas paralíticos das amostras bovinas, contudo, o curso da doença foi mais rápido nos animais com inóculo ovino, cuja morte dos doentes ocorreu até o décimo quinto dia pós-inoculação. Tais observações podem ser consequência da menor proteção do sistema imune diante da carga viral dos inóculos (FEKADU; SHADDOCK, 1984).

As manifestações clínicas dos animais inoculados com amostras de vírus rábico provenientes de seres humanos foram caracterizadas por sintomas mais exacerbados em comparação aos determinados pelas demais amostras do estudo. Os animais desenvolveram, de 7 a 13 dias após a inoculação, alteração de comportamento marcada por extrema agressividade, mordendo as grades da gaiola e atacando durante a realização da leitura. Destacam-se episódios de aerofobia e convulsão. A dificuldade de locomoção foi registrada em alguns casos. Essas alterações não foram diferentes das relatadas em vários estudos de raiva humana (HEMACHUDHA; LAOTHAMATAS; RUPPRECHT, 2002; BRASIL, 2004b; ROSA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008), que descreveram sintomas diversos em pacientes com infecção transmitida por carnívoros e por morcegos hematófagos.

Na avaliação da patogenicidade de cinco amostras em camundongos vacinados, o teste do CDC de Atlanta, não apresentou resultados conclusivos, embora Blancou (1985) e Baer (1997), afirmarem que este método seja o mais adequado para verificar a capacidade de uma vacina em induzir proteção, em virtude da realização de desafio com vírus de campo por via intramuscular, simulando dessa forma, as condições naturais de infecção.

Neste sentido, verificou-se que os isolados empregados no desafio demonstram título viral muito baixo, apesar das sucessivas passagens adicionais pela ICC. Por outro lado, os camundongos inoculados com as amostras canina 321, bovina 651 e canina 657 apresentaram elevados índices de mortalidade após 30 dias de vacinação. Isto pode ser atribuído a uma maior patogenicidade e virulência dos inóculos.

A expressão da glicoproteína G está inversamente associada à indução de apoptose e à inibição da atividade da proteína N no transporte axoplásmico. Dessa maneira, quanto menor a expressão de G em determinada amostra viral, haverá menos apoptose e menor inibição do transporte viral nos neurônios, resultando em maior patogenicidade (MORIMOTO et al., 1999).

Lafon, Bourhy e Sureau (1988) em pesquisa realizada com camundongos, verificaram que a vacina preparada com vírus PV4 conferiu proteção para os animais desafiados com amostras de vírus Duvenhage, ao contrário da vacina com vírus Pitman-Moore (PM).

Cordeiro et al. (1990), avaliando em camundongos os níveis de proteção conferidos por uma vacina de vírus atenuado, preparada em cultivo celular renal a partir da amostra ERA, constataram que o imunógeno foi eficaz contra todas as diferentes variantes de vírus rábico de rua e silváticas, independente do esquema vacinal. Estes autores assinalaram, no entanto, que em dose única a proteção foi menor no desafio com amostras de laboratório, CVS e DR-19 (morcego hematófago), em razão da elevada virulência destes isolados.

Baer (1997), ao utilizar dois testes de potência de vacina, o CDC de Atlanta e o NIH, não encontrou diferenças entre as doses protetoras de uma vacina anti-rábica de vírus inativado para as amostras de desafio.

No desafio com a amostra ovina 332, a vacina apresentou proteção, se forem consideradas as menores diluições (1:2, 1:10 e 1:50). Entretanto, nas diluições 1: 250 e 1: 1250, morreram 43,8% e 18,8% dos animais inoculados respectivamente. As diferenças observadas podem ser decorrentes da imunodeficiência dos camundongos do grupo 1: 250 como referido por Tizard (1998).

Gomes (2004), verificou a eficácia de uma vacina anti-rábica de vírus inativado em asininos e eqüinos desafiados com um isolado de raposa, sugerindo que a proteção obtida pode ter ocorrido em consequência do reforço após 30 dias da primeira dose e da baixa patogenicidade da amostra desafio.

O isolado humano 327 apresentou título viral de $10^{2,9}$ DLIC₅₀/0,03mL, sendo maior que o das demais amostras do estudo. Para este vírus, apenas 43,8% dos camundongos imunizados com a menor diluição da vacina morreram.

Resultados semelhantes de proteção foram obtidos por Nociti (2005), que avaliou, em camundongos, a eficácia de vacina inativada de vírus PV, no teste de CDC de Atlanta, frente a duas amostras de bovinos isoladas no Estado do Mato Grosso, concluindo que a vacina conferiu proteção maior para um dos isolados, em virtude da menor patogenicidade deste.

As mutações na glicoproteína, como a substituição do aminoácido arginina na posição 333 (Arg333), são apontadas como responsáveis pelas diferenças na patogenicidade das amostras isoladas de vírus rábico (TORDO, 1996).

A vacina utilizada no presente estudo foi produzida com amostra de vírus PV, inativada pela beta propiolactona, com indicação para o uso nos animais domésticos de pequeno e grande porte, contudo, a capacidade imunogênica apresentada pelos animais no teste do CDC de Atlanta foi baixa. Tal observação é coerente com o fato dos camundongos terem recebido apenas uma dose do imunógeno. Além disso, durante o período de experimentação, esses animais sofreram situações de *stress* por causa das reformas próximas do local em que estavam alojados, provavelmente influenciando esses resultados. Ressalta-se que no teste de IFI, os soros de grupos de animais vacinados em diferentes momentos, apresentaram títulos detectáveis de anticorpos anti-rábicos, descartando a possibilidade de falha vacinal em decorrência do tipo de vacina empregada.

A presença de anticorpos após a imunização é indício de que os mecanismos de proteção, tanto os humorais como os imuno-mediados por células, foram ativados (SMITH, 1991; TIZARD, 1998).

Germano et al. (1981), analisando 90 amostras de soros da espécie canina, observaram uma elevada concordância entre as provas de IFI e TNC, concluindo que o anticorpo fluorescente dirigido contra a ribonucleoproteína viral, pode ser utilizado como indicador da presença de anticorpo neutralizante, mesmo não existindo uma relação quantitativa direta.

Vários autores (FENNER et al., 1993; TORDO, 1996; WUNNER, 2002) afirmaram que as espículas de composição glicoprotéica do envelope do vírus rábico constituem o único antígeno viral que induz a síntese de anticorpos neutralizantes no hospedeiro e conferem proteção contra o desafio intracerebral.

Smith (1991) relatou que nos camundongos que resistem ao desafio, os anticorpos são inicialmente detectados no período de 4 a 6 dias após a infecção experimental, atingindo pico nos níveis depois de duas semanas da doença.

Na Califórnia em 1995, dois casos de raiva humana transmitidos por morcegos insetívoros foram diagnosticados pela detecção de títulos de anticorpos anti-rábitos (<1:8 a 1:256) na IFI das amostras de soro e líquido cefalorraquidiano, comprovando a utilidade desse método em estudos epidemiológicos (CDC, 1996).

Os achados da IFI em camundongos vacinados concordam, de certa maneira, com Hostnik e Grom (1997), que em experimento com 177 soros de raposas (*Vulpes vulpes*), constataram uma elevada sensibilidade e especificidade da IFI, concluindo que representa um teste adequado para a pesquisa de anticorpos em animais submetidos à vacinação.

Madhusudana, Shamsundar e Saraswati (2001), ao analisarem soros de seres humanos imunizados com diferentes vacinas, observaram que os títulos de anticorpos na IFI foram 2 a 4 vezes menores do que os obtidos na TNC, porém, com uma correlação significativa entre os testes, indicando que IFI pode ser utilizada para monitorar a soroconversão após a vacinação, como no presente estudo.

Os resultados da caracterização antigênica, empregando um painel de 10 MAbs com quatro amostras de vírus isoladas de um morcego e de três seres humanos, demonstram o perfil antigênico relacionado à variante de morcego

hematófago. Este perfil foi confirmado pela análise de seqüências nucleotídicas das amostras, como referido por Tordo et al. (2000).

Estas observações estão em concordância com Rosa et al. (2006), que identificaram a variante de *Desmodus rotundus* em amostras de seres humanos, após a caracterização antigênica com um painel de 8 MAbs anti-nucleocapsídeo viral e seqüenciamento de fragmento do gene da nucleoproteína N.

Na avaliação genética dos genes que codificam a glicoproteína G e a nucleoproteína N os isolados virais obtidos, tanto de seres humanos como das demais espécies estudadas, nas várias regiões geográficas dentro do Estado, foram distribuídos em dois grupos de vírus principais, abrangendo a variante de morcego hematófago em um grupo e a de cão, em outro. Desta forma, estes isolados foram relacionados a populações diferentes no ciclo aéreo e terrestre.

Tais constatações são compatíveis com diversos autores (HANLON; ORCIARI, 2001; SMITH, 2002) que relataram que o seqüenciamento do vírus da raiva permite distinguir precisamente variantes virais associadas a diferentes ciclos ou originárias de reservatórios domésticos e silvestres.

Bernardi et al. (2005), analisaram 50 amostras de vírus rábico, com uma seleção de MAbs contra a fosfoproteína viral e seqüenciamento do gene que codifica a proteína M₁, discriminando um agrupamento mantido independentemente por raposas do Nordeste (*Dusicyon vetulus*).

Schaefer et al. (2005) pesquisando as diferenças antigênicas e genômicas de 79 amostras brasileiras de vírus da raiva, isoladas de diferentes reservatórios e áreas geográficas, distinguiram três conjuntos de variantes, nos grupos formados por “cães”, “bovinos-morcegos hematófagos” e “morcegos não hematófagos”. Os autores basearam seus resultados na tipificação antigênica com um painel de 11 MAbs contra antígenos de lyssavírus e na amplificação do gene N pela RT-PCR, seguida pela análise de restrição de endonuclease, sugerindo que a evolução do vírus esteja direcionada para a adaptação na espécie reservatório.

Batista et al. (2006), ao analisarem a estabilidade antigênica de três amostras virais de espécies distintas, utilizando MAbs antilyssavírus após 20

passagens seriadas pela ICC, observaram, em um dos isolados de morcego insetívoro, modificações antigênicas limitadas em sua oitava passagem, indicando que tais mudanças foram necessárias para adaptação do vírus ao camundongo. Ainda no mesmo estudo, verificaram que os demais isolados de perfis compatíveis com a variante canina e de morcego hematófago, mantiveram a mesma composição antigênica.

No presente experimento, verificou-se pelos resultados obtidos nas amostras estudadas, que o vírus rábico circulante no Estado do Maranhão pertence ao genótipo 1 do gênero *Lyssavirus*.

A análise genética do gene da glicoproteína G (Figura 10) mostra que os isolados foram divididos em dois ciclos endêmicos, estando um associado aos carnívoros e o outro ao morcego hematófago. As amostras apresentaram homologia de pelo menos 82,4% nos nucleotídeos. Estes resultados demonstram que o vírus rábico pode ser transmitido entre animais domésticos e quirópteros, favorecendo a perpetuação da raiva no ambiente.

Observações semelhantes foram feitas por Lima et al. (2005) que ao descreverem 32 surtos de raiva em animais domésticos do Nordeste do Brasil, sendo 24 em bovinos, quatro em eqüinos e dois em cada uma das espécies caprina e ovina, concluíram que a maioria dos casos foi transmitida por morcegos hematófagos, não se descartando a possibilidade de transmissão por canídeos silvestres.

Monte et al. (2006), em um trabalho de vigilância epidemiológica no Estado do Maranhão, encontraram 24 focos da doença, distribuídos na população de animais domésticos da região após um surto de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos em 2005.

Os clados I e II do dendrograma da seqüência protéica do gene da glicoproteína G mostram 92,6% e 94,3% de homologia respectivamente, indicando diversidade genética em ambos os grupos, porém, maior entre as amostras relacionadas aos cães. Estes resultados divergem dos achados de Sato et al. (2004), que em pesquisa baseada no seqüenciamento do gene G e região intergênica G-L de 14 amostras brasileiras, verificaram que a homologia de

nucleotídeos foi mais baixa entre os isolados relacionados à variante de morcego hematófago ($\geq 96,1\%$ de homologia) do que entre aqueles da variante canina ($\geq 98,2\%$ de homologia).

Em outro estudo, Sato et al. (2006), trabalhando com 41 amostras oriundas das regiões Norte e Nordeste do Brasil, constataram que os isolados de caninos, felinos, bovinos, humanos e um suíno, formaram um grupo muito relacionado com os isolados de carnívoros e com diversidade genética maior do que nas amostras relacionadas aos morcegos hematófagos.

A análise da sequência do gene N (Figura 11), das amostras de vírus da raiva obtidas do Estado do Maranhão, indica a existência de duas variantes, a variante canina e outra, relacionada ao morcego hematófago. Nos agrupamentos formados, as amostras são separadas em ramos distintos, contudo, não se verifica uma segregação por espécie. Por outro lado, o grupo relacionado ao morcego hematófago apresenta diversidade genética maior, contando com 94% de homologia de nucleotídeos, em relação ao outro grupo (95% de homologia).

Resultados similares foram obtidos por Ito et al. (2001a), que encontraram percentuais de homologia de nucleotídeos acima de 99% e 96,6% para as amostras relacionadas à variante canina e à de morcego hematófago respectivamente, admitindo que a variação genética reflete a interação entre animais domésticos e morcegos hematófagos em várias áreas.

Smith (2002), afirmou que a homogeneidade entre isolados procedentes de carnívoros domésticos pode ocorrer em consequência de constantes campanhas de vacinação que eliminam um grande número de linhagens de vírus da população de cães.

As árvores filogenéticas (Figuras 10 e 11) revelam a segregação, no Clado I, das amostras canina, felina, humana, suína e bovina, sugerindo que essas espécies foram agredidas por cães. Entretanto, as demais amostras de vírus da raiva que constituem o Clado II, assinalam o morcego hematófago como responsável pela agressão. Estas observações estão em consonância com Ito et al. (2001a,b), Favoretto et al. (2002) e Sato et al. (2004), que apontam o envolvimento de variantes virais distintas em ciclos de transmissão independentes.

Dessa maneira, os resultados do presente estudo indicam o encontro de hospedeiros inesperados em relação à circulação viral, concordando com os achados de Sato et al. (2006) e Carnieli Jr. et al. (2006, 2008), que identificaram diferentes reservatórios do vírus na região Nordeste do Brasil.

Assim, considerando-se as amostras BRbv641, 650 e BRpg667, pode-se constatar que os casos de raiva bovina e suína foram transmitidos por um carnívoro. A observação deste fato pode ser justificada pelo comportamento territorial dos cães que propicia o contato interespecie favorecendo a infecção. Todavia, não se desconsidera a possibilidade de exposição a canídeos silvestres que apresentam hábito sinantrópico. Tal constatação difere de Heinemann et al. (2002), que ao analisarem 30 amostras de vírus da raiva isoladas de bovinos e morcegos hematófagos do Estado de São Paulo, não verificaram diferença genética significativa entre as amostras provenientes de hospedeiros distintos.

Acha e Szyfres (2003), relataram que a raiva em suínos não é freqüente, porém, quando ocorre, o quadro clínico é, em geral, semelhante a dos caninos, com sinais de hiperexcitabilidade e paralisia.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005), afirma que o morcego *Desmodus rotundus* é o principal transmissor da raiva para os herbívoros, que apenas em raras situações infectam-se pela agressão de cães como observado no presente estudo.

Carnieli Jr. et al. (2006), analisando 20 amostras de vírus rábico, indicaram dois ciclos endêmicos distintos entre canídeos do Nordeste brasileiro, um representado por cães domésticos e o outro por cães silvestres, concluindo que existe, nesta região, uma circulação viral espécie-específica.

Em relação aos ovinos, verificou-se que o morcego hematófago foi o responsável pela doença. Nessa espécie, os relatos da enfermidade são raros, demonstrando baixa freqüência, em virtude da menor exposição ao vírus da raiva, conforme afirmação de Lima et al. (2005).

Gomes (2004), ao pesquisar o comportamento biológico de um isolado de raposa em ovinos, observou que os animais apresentaram 100% de

susceptibilidade à infecção experimental por via intramuscular, não revelando agressividade.

Guedes et al. (2007), em um levantamento de doenças do sistema nervoso central em ovinos, observaram que a raiva constitui uma das principais enfermidades diagnosticadas nos Estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, no período de janeiro de 2000 a maio de 2006, causando perdas econômicas importantes.

Os resultados da caracterização genética de uma amostra felina (BRct663) e de cinco caninas (BRdg326,336,337,653 e 664), demonstram que a infecção nesses animais foi atribuída ao morcego hematófago. De fato, a predação de quirópteros por cães e gatos representa risco de transmissão da raiva nos ambientes rurais e urbanos (DELPIETRO; FÁBREGAS; DÍAZ, 1987; DELPIETRO et al. 1994). Além disso, os *Desmodus rotundus* mantêm o hábito de hematofagismo e freqüentemente são encontrados alimentando-se em cães (DANTAS-TORRES et al., 2006).

Estas observações, juntamente com a constatação da existência de abrigos densamente povoados, a alta prevalência da raiva na população de morcegos hematófagos e a ocorrência da infecção em outras espécies animais (CARRIERI et al., 2000), apontam para o perigo da transmissão do vírus para os seres humanos como resultado da interação com animais domésticos (DELPIETRO et al., 1994; SCHAEFER et al., 2002).

Os dados obtidos no presente estudo estão em consonância com Kissi, Tordo e Bourhy (1995) que detectaram, em cães, a variante de vírus de morcego hematófago, comprovando a interferência dos quirópteros no ciclo urbano.

Carnieli Jr. et al. (2005), analisando uma amostra felina originária do município de Cotia - SP, identificaram a variante 3, característica de *D. rotundus*, sugerindo que os morcegos e suas variantes virais devem ser considerados na epidemiologia da raiva em áreas urbanas. Adicionalmente, os autores não descartaram o envolvimento do morcego *Artibeus* sp em razão do sinantropismo desta espécie.

De acordo com os dendrogramas (Figuras 10 e 11), verifica-se que dos cinco isolados de seres humanos, três foram relacionados à variante de morcego hematófago e dois à variante canina, concordando com várias pesquisas (OLIVEIRA et al., 2006; ROSA et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2007; BARBOSA et al., 2008), que indicaram uma alteração do perfil epidemiológico da raiva com aumento no número de casos conferidos pelo morcego hematófago.

Schneider et al. (2001), em estudo realizado no povoado de Mina Nova, situado na região Amazônica, já alertavam sobre as agressões de morcegos hematófagos em seres humanos e o risco potencial de transmissão da raiva.

Entretanto, Gonçalves, Sá-Neto e Brazil (2002), ao descreverem dois surtos de raiva humana no Estado da Bahia, comentaram que a doença transmitida pelos quirópteros depende da presença do vírus na população de morcegos hematófagos e não do número de ataques por morcegos.

No presente trabalho, observou-se que os casos humanos envolvendo o *D. rotundus* foram favorecidos pelas modificações ambientais ocasionadas pelo desmatamento e o extrativismo vegetal e mineral. Em algumas localidades, foram observadas moradias com telhados abertos, oferecendo fácil acesso aos morcegos. Destaca-se a existência de cavernas, minas, crateras e poços abandonados. Alguns habitantes revelaram o hábito de dinamitar áreas em busca de jazidas de ouro, propiciando a formação de abrigos e a propagação de quirópteros. Além disso, o número reduzido de animais para a alimentação dos morcegos, contribuiu para a escolha da espécie humana como fonte de alimento.

Por outro lado, o registro da doença transmitida pelos caninos pode estar relacionado à inadequada cobertura vacinal de cães, a falta de tratamento profilático em seres humanos e a ocorrência de vários animais errantes como referido por Schneider et al. (2007). Ressalta-se ainda, a criação de animais silvestres em cativeiro e a exposição a outras espécies silvestres comuns da região, tais como o gato do mato (*Leopardus tigrinus*) e o macaco (*Cebus* sp), que podem atuar como reservatório do vírus.

Dados da Secretária de Saúde do Maranhão (MARANHÃO, 2007b) indicam que, em 2006, o Estado ainda apresentou cinco casos de raiva humana,

sendo dois relacionados com a variante canina do vírus da raiva e três com a variante de morcego hematófago, concordando com os resultados apresentados neste estudo.

Na análise dos grupos filogenéticos em relação à distribuição geográfica, foi constatada variação regional dentro de uma mesma variante, sugerindo adaptações nas espécies hospedeiras ao longo dos anos (BOURHY et al., 1999).

Morimoto et al. (1998), já afirmavam que as mutações ou variações genéticas observadas entre as variantes virais permitem que o vírus da raiva adapte-se ao ambiente como resultado da interação vírus-hospedeiro. Dessa forma, a transmissão entre diferentes espécies animais pode ser facilitada pela existência de quasiespécies do vírus.

Assim, os resultados apontam a prevalência da variante de morcego hematófago no Norte ocidental do Estado do Maranhão onde a vegetação consiste em manguezais com grandes áreas de desmatamento provocadas pela mineração. Também, foi assinalada em alguns municípios do Norte oriental, região Nordeste e Noroeste do Estado, distribuída na mata de transição, cerrado, campos e floresta equatorial (Figuras 1 e 12). Além da variada cobertura vegetal, nestas regiões, a existência de áreas com extensas bacias hidrográficas e topografia plana, com baixas altitudes, permitiram a esta variante provocar a doença em animais domésticos e seres humanos comprovando a ocorrência do “spillover” em diferentes espécies animais (CHILDS, 2002; CALISHER et al., 2006).

Kobayashi et al. (2006), analisando 77 amostras brasileiras isoladas de bovinos de diferentes Estados, indicaram, pelo seqüenciamento do gene N, que a raiva bovina é originária de diversas variantes regionalmente definidas e sua distribuição geográfica está relacionada com a população de *Desmodus rotundus*.

Barbosa et al. (2008), constataram que o vírus rábico circulante entre animais domésticos e seres humanos de áreas geográficas distantes e distintas da região Amazônica, pertencia à variante de *Desmodus rotundus*, como resultado das transformações no meio ambiente que alteraram o *habitat* dos morcegos.

No presente trabalho, a variante relacionada aos carnívoros foi registrada em diferentes hospedeiros, abrangendo uma vasta região do Estado maranhense coberta por campos, mata de transição, cerrado e floresta equatorial. Nestes ecossistemas, causou a enfermidade nas espécies canina, humana, bovina, suína e felina, em localidades com elevada densidade populacional de cães e situadas junto a rodovias. Tais fatores favoreceram o ingresso e a migração de animais, contribuindo para a disseminação da raiva, o que concorda com os resultados de Ito et al. (2001a) e Kobayashi et al. (2007a).

Neste estudo, as análises mostram que não houve variação temporal nas amostras isoladas em decorrência da rápida transmissão entre as espécies, concordando com os achados de Kissi, Tordo e Bourhy (1995), Heinemann et al. (2002) e Bernardi et al. (2005), que não assinalaram diferenças em relação ao tempo de circulação viral.

Pelos resultados da caracterização genética, observa-se que em algumas áreas do Estado do Maranhão, as duas variantes de vírus da raiva coexistem na mesma região, envolvendo hospedeiros variados em ciclos distintos.

Neste contexto, a infecção foi diagnosticada nas espécies canina e bovina dos municípios de Codó (BRdg646; BRbv649, 651), Capinzal do Norte (BRdg334; BRbv645) e Viana (BRdg659; BRbv647), com diferentes ecologias, mantidas por carnívoros e quirópteros respectivamente, ocorrendo nas duas primeiras cidades no mesmo ano (2004) e na última, no período de 2004 – 2005. Os relatos de agressão pelo *Desmodus rotundus* continuaram em Codó durante 2005, onde dois bovinos (BRbv656, 660) resultaram positivos (Figura 12 e Apêndice B).

Relatos de sobreposição de ciclos em várias áreas do Brasil já foram descritos por outros autores (ITO et al., 2001a, 2003; GOMES, 2004), confirmando os resultados apresentados nesta pesquisa.

Em vista disso, observou-se a transposição (“*spillover*”) da variante de morcego hematófago para outras espécies como demonstrado nas cidades de Presidente Dutra (BRdg326) e São Luís (BRdg336, 337), onde foram acometidos os caninos. Além destas, Centro Novo do Maranhão (BRct663), Godofredo Viana (BRhm671, 673) e Carutapera (BRhm675) identificaram a raiva na espécie felina e

humana, como referido por Badrane e Tordo (2001) e Calisher et al. (2006), que indicaram a transferência de vírus relacionado aos morcegos para os carnívoros. Ressalta-se que no município de São João Batista, registraram-se ambas as situações, a sobreposição de ciclos e o “spillover”, com a doença em cães pela variante de morcego hematófago (BRdg653) e variante canina (BRdg642) no ano de 2004. Em 2005, ainda houve notificações de casos na mesma espécie pela variante canina (BRdg665, 666).

Situação semelhante foi constatada por Favoretto et al. (2002), que identificaram a circulação viral simultânea das duas variantes em um surto de raiva canina no município de Ribeirão Preto - SP.

Tais observações podem ser justificadas pela grande variedade de animais domésticos e silvestres, além dos fatores ecológicos que influenciam o comportamento animal propiciando o contato interespecie (CHILDS, 2002; STERNER; SMITH, 2006).

Os resultados apresentados, indicam que no Estado do Maranhão, onde o vírus da raiva circula em diferentes espécies de reservatórios silvestres e domésticos, as ações de controle da raiva devem incluir, obrigatoriamente, a vacinação de animais domésticos, a captura sistemática e controle de população de animais silvestres, como os morcegos hematófagos, no caso do *D. rotundus*. Neste sentido, é importante o envio de espécimes capturados para diagnóstico laboratorial, para fins de monitoramento da atividade viral. Em ambientes urbanos e suburbanos, continua válida a recomendação de vacinar os cães e gatos, o controle populacional e a redução de animais que oferecem riscos à população humana. Os serviços de saúde pública e educação em saúde devem merecer atenção especial por parte das autoridades, com a realização de campanhas educativas que promovam a conscientização e a mobilização da comunidade no combate à doença (Apêndice C e Anexos A-C). Adicionalmente, o treinamento dos profissionais da área médica para a identificação da enfermidade e a notificação aos órgãos de saúde, contribuem para a tomada de medidas estratégicas na vigilância epidemiológica. Enfatiza-se que apoio financeiro das equipes técnicas de defesa sanitária é fundamental para que se evite a repetição de episódios de raiva humana, como os mencionados neste estudo.

“...as calamidades públicas são a expectativa e a esperança de uma multidão de particulares: uns querem as moléstias; outros, a mortalidade; outros, a guerra; outros, a fome”

Jean – Jacques Rousseau

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1) Todas as amostras positivas para a raiva na prova de ICC apresentaram sinais clínicos variados e período de incubação entre 7 e 17 dias.
- 2) Os isolados empregados no desafio de camundongos imunizados apresentaram diferenças na patogenicidade.
- 3) A proteção conferida pela vacina foi baixa para todas as amostras de desafio.
- 4) A prova de IFI detectou anticorpos anti-rábicos no soro dos camundongos vacinados.
- 5) A caracterização antigênica diferenciou a variante de morcego hematófago entre as amostras de vírus originárias de duas espécies.
- 6) A análise filogenética dos genes que codificam a glicoproteína G e a nucleoproteína N apontou a existência de duas variantes virais distintas mantidas independentemente na população de cães e de morcego hematófago.
- 7) Foram verificados hospedeiros inesperados (um suíno e dois bovinos, com variante canina) nos clados formados.
- 8) Foram observadas variações regionais entre as amostras isoladas em diferentes áreas geográficas do Estado do Maranhão.

- 9) Não houve variação temporal entre as amostras isoladas
- 10) Houve variações genéticas entre as amostras isoladas com a constatação de sobreposição de ciclos e spillover em diferentes espécies animais e seres humanos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana De La Salud, 2003. v. 2, 425 p.
- ALBAS, A.; NOGUEIRA, R. M. B.; FONTOLAN, O. L.; ALBAS, K. S.; BRENER-NETO, H. Efeito do congelamento sobre a imunogenicidade da vacina contra a raiva produzida em tecido cerebral de camundongo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 49-52, 2001.
- ALBERTINI, A. A.; WERNIMONT, A. K.; MUZIOL, T.; RAVELLI, R. B.; CLAPIER, C. R.; SCHOEHN, G.; WEISSEHORN, W.; RUIGROK, R. W. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 360-363, 2006.
- ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A. D. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 333-337, 2003.
- ARAI, Y. T.; YAMADA, K.; KAMEOKA, Y.; HORIMOTO, T.; YAMAMOTO, K.; YABE, S.; NAKAYAMA, M.; TASHIRO, M. Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. **Archives of Virology**, v. 142, n. 9, p. 1787-1796, 1997.
- ATANASIU, P. Animal inoculation and the Negri body. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v.1, p. 373-400.
- BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. **Journal of Virology**, v. 75, p. 8096-8104, 2001.
- BAER, G. M. Evaluation of an animal rabies vaccine by use of two types of potency tests. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 8, p. 837-840, 1997.
- BAER, G. M.; BELLINI, W. J.; FISHBEIN, D. B. Rhabdoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D.M. **Virology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1990. p. 883-930.

BARBOSA, T. F. S.; MEDEIROS, D. B. A.; ROSA, E. S. T.; CASSEB, L. M. N.; MEDEIROS, R.; PEREIRA, A. S.; VALLINOTO, A. C. R.; VALLINOTO, M.; BEGOT, A. L.; LIMA, R. J. S.; VASCONCELOS, P. F. C.; NUNES, M. R. T. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. **Virology**, v. 370, p. 228-236, 2008.

BATISTA, H. B. C. R.; SCHMIDT, E.; TEIXEIRA, T. F.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Rabies virus stability after twenty passages in mice. In: RABIES IN THE AMERICAS, 17., 2006, Brasília. **Annals...** Brasília: Ministry of Health-Brazil, 2006. p. 157.

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

BELOTTO, A. J. Situação da raiva no mundo e perspectivas de eliminação da raiva transmitida pelo cão na América Latina. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Programa e resumos...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. p. 20-21.

BELOTTO, A. J.; LEANES, L. F.; SCHNEIDER, M. C.; TAMAYO, H.; CORREA, E. Overview of rabies in the Americas. **Virus Research**, v. 111, n. 1, p. 5-12, 2005.

BERNARDI, F.; NADIN-DAVIS, S. A.; WANDELER, A. I.; ARMSTRONG, J.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S.; NOGUEIRA, F. R. B.; ITO, F. H. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 3153-3162, 2005.

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

BOLETÍN DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA RABIA EN LAS AMÉRICAS. Rio de Janeiro: CPFA, 2004. v. 36, 40 p.

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

BOURHY, H.; KISSI, B.; AUDRY, L.; SMRECZAK, M.; SADKOWSKA-TODYS, M.; KULONEN, K.; TORDO, N.; ZMUDZINSKI, F. J.; HOLMES, C. E. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2545-2557, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2005. 104 p. Manual Técnico.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Raiva animal: dados estatísticos**. Brasília, 2004a. 5 p. Documento interno da instituição.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no município de Portel - Pará, março/abril de 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, n. 6, p. 1-5, 2004b. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs/>>. Acesso em: 10 mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Tabela de casos confirmados de raiva no Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990-2006**. 2007. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs/>>. Acesso em: 28 nov. 2007.

BRITO, C. J. C. **Avaliação da técnica de imunofluorescência direta utilizando conjugado antiglicoproteína viral e antinucleocapsídeo viral em material a fresco e em decomposição no diagnóstico da raiva**. 2002. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2002.

BÜCHEN-OSMOND, C. Taxonomy and classification of viruses. In: _____. **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 2, p. 1217-1226. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>>. Acesso em: 08 ago. 2007.

CALISHER, C. H.; CHILDS, J. E.; FIELD, H. E.; HOLMES, K. V.; SCHOUNTZ, T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 531-545, 2006.

CARNIELI JR., P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; MACHADO, L. M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R. C.; CARVALHO, V. A.; MONTEBELLO, L.; WADA, M.; KOTAIT, I. 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.; BRANDÃO, P. E.; CASTILHO, J. G.; BUENO, C. R.; CARRIERI, M. L.; MACEDO, C. I.; OLIVEIRA, R. N.; ZANETTI, C. R.; KOTAIT, I. Phylogeny of a rabies virus identified in a cat closely related to vampire bat rabies based on the nucleoprotein gene. **Virus Reviews and Research**, v. 10, n. 1, p. 50-54, 2005.

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

CARRIERI, M. L.; FAVORETTO, S. R. L.; CARNIELI JR., P.; QUEIROZ, L. H.; SOUZA, M. C. A. M.; PANACHÃO, M. R. I.; TAKAOKA, N. Y.; HARMANI, N. M. S.; KOTAIT, I. *Desmodus rotundus* como transmissor da raiva canina e felina no Estado de São Paulo, 1998-2000. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Programa e resumos...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. p. 42-43.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Human Rabies - California, 1995. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 45, n. 17, p. 353-356, 1996. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm4517.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2007.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. **Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia**. Buenos Aires: OPS/OMS, 1975. 24 p. (Nota técnica, 8).

CHARLTON, K. M.; NADIN-DAVIS, S.; CASEY, G. A.; WANDELER, A. I. The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. **Acta Neuropathologica**, v. 94, p. 73-77, 1997.

CHILDS, J. E. Epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 113-162.

CORDEIRO, C. C.; SILVA, E. V.; MIGUEL, O.; GERMANO, P. M. L. Avaliação da vacina anti-rábica ERA frente a variantes antigênicas do vírus da raiva em diferentes períodos pós-imunização. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 6, p. 512-517, 1990.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843 p.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; VALENÇA, C.; FILHO, G. V. A. Hematofagismo por *Desmodus rotundus* em cão de área urbana na cidade de Olinda, Pernambuco, Brasil. **Clínica Veterinária**, n. 61, p. 74-78, 2006.

DAVID, D.; YAKOBSON, B.; ROTENBERG, D.; DVERES, N.; DAVIDSON, I.; STRAM, Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 111-118, 2002.

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

DELPIETRO, H.; FÁBREGAS, F.; DÍAZ, M. Riesgo de transmisión rábica em la predación de quirópteros por carnívoros domésticos. **Veterinaria Argentina**, v. 4, p. 119-124, 1987.

DELPIETRO, H.; KONOLSAISEN, F.; MARCHEVSKY, N.; RUSSO, G. Domestic cat predation on vampire bats (*Desmodus rotundus*) while foraging on goats, pigs, cows and human beings. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 39, n. 2, p. 141-150, 1994.

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

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ARAÚJO, F. A. A.; DE MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1062-1065, 2001.

FEKADU, M.; SHADDOCK, J. H. Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 724-729, 1984.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Veterinary virology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. 666 p.

FOOKS, A. R. The challenge of new and emerging lyssaviruses. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 333-336, 2004.

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.

FU, Z. F. Rabies and rabies research: past, present and future. **Vaccine**, v. 15, p. 20-24, 1997. Supplementum.

GERMANO, P. M. L.; ISHIZUKA, M. M.; NILSSON, M. R.; MIGUEL, O. Estudo comparativo entre as provas de soroneutralização e imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 18, n. 2, p. 139-145, 1981.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M. M.; SILVA, E. V. Avaliação de três cepas de vírus rábico antigenicamente distintas em camundongos. I - Estudo dos períodos de observação clínica. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 375-383, 1988.

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

GOMES, A. A. B. **Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil**. 2004. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GONÇALVES, M. A. S.; SÁ-NETO, R. J.; BRAZIL, T. K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 461-464, 2002.

GOTO, H.; MINAMOTO, N.; ITO, H.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; KINJO, T.; KAWAI, A. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 1, p. 119-127, 2000.

GOTO, H.; MINAMOTO, N.; ITO, H.; SUGIYAMA, M.; KINJO, T.; MANNEN, K.; MIFUNE, K.; KAWAI, A. Nucleotide sequence of the nucleoprotein gene of the RC-HL strain of rabies virus, a seed strain used for animal vaccine production in Japan. **Virus Genes**, v. 8, n. 1, p. 91-97, 1994.

GUEDES, K. M. R.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D.; NETO, E. G. M.; NOBRE, V. M. T.; MEDEIROS, R. M. T. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 29-38, 2007.

HANLON, C. A.; ORCIARI, L. A. Rabies virus. **Encyclopedia of Life Sciences**. 2001. p. 1-8. Disponível em: <<http://www.els.net>>. Acesso em: 11 dez. 2007.

HANLON, C. A.; KUZMIN, I. V.; BLANTON, J. D.; WELDON, W. C.; MANANGAN, J. S.; RUPPRECHT, C. E. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. **Virus research**, v. 111, p. 44-54, 2005.

HEINEMANN, M. B.; FERNANDES-MATIOLI, F. M. C.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H.; MADEIRA, A. M. B. N.; RICHTZENHAIN, L. J. Genealogical analyses of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiology and Infection**, v. 128, p. 503-511, 2002.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C. H. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **The Lancet Neurology**, v. 1, p. 101-109, 2002. Disponível em: <<http://neurology.thelancet.com>>. Acesso em: 09 ago. 2002.

HEMACHUDHA, T.; WACHARAPLUERSADEE, S. Antemortem diagnosis of human rabies. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 39, p. 1085-1086, 2004.

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

HOSTNIK, P.; GROM, J. An indirect immunofluorescent test for detection of rabies virus antibodies in foxes. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 1, p. 143-145, 1997.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estados@Maranhão**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ma>>. Acesso em: 28 nov. 2007.

ITO, M.; ARAI, Y. T.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v. 284, p. 214-222, 2001a.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; ARAI, Y. T.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction

and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, p. 317-330, 2003.

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

JACKSON, A. C. Rabies pathogenesis. **Journal of Neurovirology**, v. 8, p. 267-269, 2002.

JOGAI, S.; RADOTRA, B. D.; BANERJEE, A. K. Immunohistochemical study of human rabies. **Neuropathology**, v. 20, n. 3, p. 197-203, 2000.

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

KASSIS, R.; LARROUS, F.; ESTAQUIER, J.; BOURHY, H. Lyssavirus matrix protein induces apoptosis by a TRAIL-dependent mechanism involving caspase-8 activation. **Journal of Virology**, v. 78, p. 6543-6555, 2004.

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

KISSLING, R. E. The fluorescent antibody test in rabies. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 401-416.

KOBAYASHI, Y.; INOUE, N.; SATO, G.; ITOU, T.; SANTOS, H. P.; BRITO, C. J. C.; GOMES, A. A. B.; SANTOS, M. F. C.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from carnivora in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 69, n. 7, p. 691-696, 2007a.

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

KOBAYASHI, Y.; OKUDA, H.; NAKAMURA, K.; SATO, G.; ITOU, T.; CARVALHO, A. A. B.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic analysis of

phosphoprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 69, n. 11, p. 1145-1154, 2007b.

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

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; FERREIRA, K. C. S.; ACHKAR, S. M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 2-8, 2007. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40_raiva.htm>. Acesso em: 28 nov. 2007.

KUZMIN; I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T.; SMITH, J. S.; HANLON, C. A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C. E. 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.; BOURHY, H.; SUREAU, P. Immunity against the European bat rabies (Duvenhage) virus induced by rabies vaccines: an experimental study in mice. **Vaccine**, v. 6, n. 4, p. 326-368, 1988.

LEE, T. -X.; HUTCHINSON, H. D.; ZIEGLER, D. W. Comparison of rabies humoral antibody titers in rabbits and humans by indirect radioimmunoassay, rapid-fluorescent-focus-inhibition technique, and indirect fluorescent-antibody assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 320-325, 1977.

LEFFINGWELL, L.; IRONS, J. V. Rabies antibodies in human serums titrated by the indirect FA method. **Public Health Reports**, v. 80, n. 11, p. 999-1004, 1965.

LIMA, E. Adolescente morre de raiva humana no Ceará. **O Povo**, Ceará, 7 fev. 2008. Disponível em: <<http://www.opovo.com.br/saude/764206.html>>. Acesso em: 12 fev. 2008.

LIMA, E. F.; RIET-CORREA, F.; 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, n. 4, p. 250-264, 2005.

LUO, M.; GREEN, T. J.; ZHANG, X.; TSAO, J.; QIU, S. Conserved characteristics of the rhabdovirus nucleoprotein. **Virus Research**, v. 129, n. 2, p. 246-251, 2007.

MADHUSUDANA, S. N.; SHAMSUNDAR, R.; SARASWATI, S. Comparative evaluation of a simple indirect immunofluorescence test and mouse neutralization test for assaying rabies antibodies. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 309-312, 2001.

MARANHÃO (Estado). Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos. **Maranhão em dados 2005**. São Luís: IMESC, 2007a. 99 p. Disponível em: <<http://www.seplan.ma.gov.br/pagina.php?ldpagina=129>>. Acesso em: 02 jan. 2008.

MARANHÃO (Estado). Secretaria de Estado de Planejamento, Orçamento e Gestão. Secretaria Adjunta de Planejamento, Coordenação, Acompanhamento e Avaliação. Superintendência de Estudos e Pesquisas Econômicas e Sociais. **Perfil sócio-econômico dos municípios do Maranhão**. São Luís: SEAPLAN / SEPES, 2006. v. 5, 47 p. Disponível em: <<http://www.seplan.ma.gov.br/pagina.php?ldpagina=100>>. Acesso em: 02 jan. 2008.

MARANHÃO (Estado). Secretaria de Saúde do Maranhão. **Série histórica de raiva humana no período de 1990 a 2006**. São Luís, 2007b. 2 p. Documento interno da instituição.

MARANHÃO (Estado). Serviço Público Federal. Delegacia Federal de Agricultura no Maranhão. Seção de Sanidade Animal. **Casos de raiva notificados a seção de sanidade animal período jan./1991 a dez./2004**. São Luís, 2004. p. 4. Documento interno da instituição.

MENDES, S. B.; OLIVEIRA, R. C.; WADA, M. Y.; MONTEBELLO, L. R. Situation of animal rabies in Brazil, 2005. In: RABIES IN THE AMERICAS, 17., 2006, Brasília. **Annals...** Brasília: Ministry of Health-Brazil, 2006. p. 192.

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.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 9-27.

MONTE, S. S.; MELO, V. C.; FERREIRA, P. A. S.; SOUSA, J. N. R.; RAMOS, C. C. M.; ARRUDA, R. C. N.; FILHO, V. N.; WADA, M. Y. Capture and control of bats and herbivorous vaccination during an outbreak of human rabies transmitted by vampire-

bats, Maranhão State, Brazil, 2005. In: RABIES IN THE AMERICAS, 17., 2006, Brasília. **Annals...** Brasília: Ministry of Health-Brazil, 2006. p. 129.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D. C.; CARBAUGH, H.; FU, Z. F.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3152-3156, 1998.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D. C.; SPITSIN, S.; KOPROWSKI, H. ; DIETZSCHOLD, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. **Journal of Virology**, v. 73, p. 510-518, 1999.

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

NADIN-DAVIS, S. A.; SIMANI, S.; ARMSTRONG, J.; FAYAZ, A.; WANDELER, A. I. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. **Epidemiology and Infection**, v. 131, p. 777-790, 2003.

NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C. E. Animal rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 163-218.

NOCITI, D. L. P. **Caracterização epidemiológica, genética molecular e da patogenicidade do vírus da raiva de bovinos, nos diferentes ecossistemas do Estado de Mato Grosso, Brasil**. 2005. 103 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, P. R.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A.; VASCONCELLOS, S. A.; SOUZA, M. C. A. M. Caracterização biológica de amostras do vírus rábico isoladas de animais domésticos oriundos de áreas endêmicas do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 32, n. 2, p. 89-95, 1995.

OLIVEIRA, R. C.; WADA, M. Y.; PEREIRA, L. R. M.; MACHADO, R.; CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J. G.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Cambios del perfil epidemiológico de la rabia en Brasil: Estudios antigénicos y genéticos. In: RABIES IN THE AMERICAS, 17., 2006, Brasília. **Annals...** Brasília: Ministry of Health-Brazil, 2006. p. 26.

PAGE, R. A. M. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer applications in the biosciences**, v. 12, n. 4, p. 357-358, 1996.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**. 9. ed. London: W. B. Saunders Company, 2000. 1877 p.

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

RIOS, J. M. T.; MARTINS, J. O. S.; NETO, S. J. W.; SARAIVA, D. S.; SANTOS, H. J.; PEREIRA, M. M.; LEITE, G. L.; WADA, M. Y. Principal risk factors for human rabies transmitted by vampire bats, Maranhão State, Brazil, 2005. In: RABIES IN THE AMERICAS, 17., 2006, Brasília. **Annals...** Brasília: Ministry of Health-Brazil, 2006. p. 176.

ROSA, E. S. T.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J. S.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUSA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. C. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1197-1202, 2006.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined: reviews. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 327-343, 2002. Disponível em: <<http://infection.thelancet.com>>. Acesso em: 09 ago. 2002.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.

SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SANTOS, H. P.; BRITO, C. J. C.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. **Archives of Virology**, v. 151, n. 11, p. 2243-2251, 2006.

SCHAEFER, R.; CALDAS, E.; SCHIMIDT, E.; KING, A. A.; ROEHE, P. M. First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years. **Veterinary Record**, v. 150, n. 7, p. 216-217, 2002.

SCHAEFER, R.; BATISTA, H. B. R.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A. M.; ROEHE, P. M. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 161-170, 2005.

SCHNEIDER, M. C.; ARON, J.; BURGOA, C. S.; UIEDA, W.; VELAZCO, S. R. Common vampire bat attacks on humans in a village of the Amazon region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1531-1536, 2001.

SCHNEIDER, M. C.; BELOTTO, A.; ADÉ, M. P.; HENDRICKX, S.; LEANES, L. F.; RODRIGUES, M. J. F.; MEDINA, G.; CORREA, E. Current status of human rabies transmitted by dogs in Latin America. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 9, p. 2049-2063, 2007.

SMITH, J. S. Molecular epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 79-111.

SMITH, J. S. Rabies serology. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. 2. ed. Boston: CRC Press, 1991. p. 235-252.

SMITH, J. S.; KING, A. A. Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non-rabies lyssavirus. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 145-156.

SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 181-192.

STERNER, R. T.; SMITH, G. C. Modelling wildlife rabies: transmission, economics and conservation. **Biological Conservation**, v. 131, p. 163-179, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, K. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acid Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2. ed. London: Butterworth, 1986. 280 p.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**: uma introdução. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998. 545 p.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 28-51.

TORDO, N.; KOUKNETZOFF, A. The rabies virus genome: an overview. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 263-269, 1993.

TORDO, N.; SACRAMENTO, D.; BADRANE, H.; BAHLOU, C.; AGUILAR-SETIEN, A.; LOZA-RUBIO, E.; GAVILAN-SALINAS, A.; BROCHIER, B.; PASTORET, P. P.; DESMEZIERES, E.; JACOB, Y.; PERRIN, P. **Genetic diversity of lyssaviruses: implications in vaccinology**. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Programa e resumos...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. p. 26-27.

TORDO, N.; SACRAMENTO, D.; BOURHY, H. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 157-174.

TRIMARCHI, C. V.; RUDD, R. D.; SALFORD JR., M. An *in vitro* virus neutralization test for rabies antibody. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 193-199.

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, n. 5, p. 1191-1194, 1991.

UIEDA, W.; CRUZ, R. H.; ALBUQUERQUE, M.; CARNEIRO JR., P. Attacks of the common vampire bats at indigenous villages from northern Brazil. In: RABIES IN THE AMERICAS, 17., 2006, Brasília. **Annals...** Brasília: Ministry of Health-Brazil, 2006. p. 50.

VALLADARES, G. S.; QUARTAROLI, C. F.; HOTT, M. C.; MIRANDA, E. E.; NUNES, R. S.; KLEPKER, D.; LIMA, G. P. **Mapeamento da aptidão agrícola das terras do Estado do Maranhão**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2007. 25 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 6). Disponível em: <http://www.cnpm.embrapa.br/publica/download/bpd6_aprMA.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2008.

WADA, M. Y. **Raiva no Brasil**, 2007. Disponível em:
<<http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/SSaude/Vigilancia/zoonoses/raiva/raivabrasil.pdf>
>. Acesso em: 13 mar. 2008.

WANDELER, A. I. Surveillance and diagnosis: some thoughts In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Programa e resumos...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. p. 28-30.

WEBSTER, L. T.; DAWSON, J. R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 32, p. 570-573, 1935.

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

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

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 49-63, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Consultation on Rabies**: first report. Geneva: WHO, 2005. 88 p. (WHO Technical Series, 931).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of a WHO consultation on potency tests for rabies vaccines**. Geneva: WHO, 1988.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 23-78.

WUNNER, W. H.; LARSON, J. K.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C. L. The molecular biology of rabies viruses. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 771-784, 1988.

APÊNDICE A – Amostras de vírus rábico submetidas à análise filogenética com base na sequência 599bp do gene G - Maranhão - 2003 - 2005

Identificação	Espécie	Localidade	Ano de isolamento	Grupo
BRdg321	Canina	Bacabal	2004	B
BRdg322	Canina	Miranda do Norte	2003	A
BRbv323	Bovina	Presidente Dutra	2004	D
BRbv324	Bovina	Itapecuru Mirim	2004	C
BRdg325	Canina	Santa Inês	2003	B
BRhm327	Humana	Lago da Pedra	2004	B
BRhm328	Humana	Lago da Pedra	2004	B
BRbv329	Bovina	Senador Alexandre Costa	2004	D
BRdg331	Canina	Coroatá	2003	A
BRsp332	Ovina	Paço do Lumiar	2004	D
BRct333	Felina	Gonçalves Dias	2003	B
BRdg334	Canina	Capinzal do Norte	2004	A
BRdg335	Canina	Barra do Corda	2003	B
BRbv641	Bovina	Imperatriz	2004	A
BRbv645	Bovina	Capinzal do Norte	2004	C
BRbv647	Bovina	Viana	2004	C
BRbv655	Bovina	Senador Alexandre Costa	2005	D
BRbv656	Bovina	Codó	2005	C
BRdg657	Canina	São Vicente Ferrer	2005	A
BRbv658	Bovina	Fortuna	2005	D
BRdg659	Canina	Viana	2005	B
BRdg661	Canina	Pindaré Mirim	2005	B
BRdg665	Canina	São João Batista	2005	A
BRdg666	Canina	São João Batista	2005	A
BRpg667	Suína	São Vicente Ferrer	2005	A
BRdg669	Canina	Monção	2005	A
BRbv670	Bovina	Godofredo Viana	2005	C
BRhm673	Humana	Godofredo Viana	2005	C
BRbv674	Bovina	Luis Domingues	2005	C
BRhm675	Humana	Carutapera	2005	C
BRbat5	Quiróptero	Carutapera (Ilha Sapeca)	2005	C

BRdg = Brasil dog; BRbv = Brasil bovine; BRct = Brasil cat; BRhm = Brasil human; BRpg = Brasil pig; BRsp = Brasil sheep; BRbat = Brasil bat

APÊNDICE B – Amostras de vírus rábico submetidas à análise filogenética com base na sequência 203 bp do gene N, Maranhão - 2003 - 2005

Identificação	Espécie	Localidade	Ano de isolamento	Grupo
BRdg321	Canina	Bacabal	2004	B
BRdg322	Canina	Miranda do Norte	2003	A
BRbv323	Bovina	Presidente Dutra	2004	D
BRbv324	Bovina	Itapecuru Mirim	2004	C
BRdg325	Canina	Santa Inês	2003	B
BRdg326	Canina	Presidente Dutra	2003	C
BRhm327	Humana	Lago da Pedra	2004	B
BRhm328	Humana	Lago da Pedra	2004	B
BRbv329	Bovina	Senador Alexandre Costa	2004	D
BRdg331	Canina	Coroatá	2003	A
BRsp332	Ovina	Paço do Lumiar	2004	D
BRct333	Felina	Gonçalves Dias	2003	B
BRdg334	Canina	Capinzal do Norte	2004	A
BRdg335	Canina	Barra do Corda	2003	B
BRdg336	Canina	São Luís	2003	D
BRdg337	Canina	São Luís	2003	D
BRbv639	Bovina	Senador Alexandre Costa	2004	D
BRdg640	Canina	Santa Rita	2004	A
BRbv641	Bovina	Imperatriz	2004	A
BRdg642	Canina	São João Batista	2004	A
BRdg643	Canina	Santa Rita	2004	A
BRbv645	Bovina	Capinzal do Norte	2004	C
BRdg646	Canina	Codó	2004	A
BRbv647	Bovina	Viana	2004	C
BRbv648	Bovina	Itapecuru Mirim	2004	D
BRbv649	Bovina	Codó	2004	D
BRbv650	Bovina	Vitorino Freire	2004	B
BRbv651	Bovina	Codó	2004	C
BRdg652	Canina	Lima Campos	2004	A
BRdg653	Canina	São João Batista	2004	D
BRbv655	Bovina	Senador Alexandre Costa	2005	D
BRbv656	Bovina	Codó	2005	C
BRdg657	Canina	São Vicente Ferrer	2005	A
BRbv658	Bovina	Fortuna	2005	D
BRdg659	Canina	Viana	2005	B
BRbv660	Bovina	Codó	2005	C
BRdg661	Canina	Pindaré Mirim	2005	B
BRsp662	Ovina	Presidente Vargas	2005	C
BRct663	Felina	Centro Novo do Maranhão	2005	D
BRdg664	Canina	Pinheiro	2005	C
BRdg665	Canina	São João Batista	2005	A
BRdg666	Canina	São João Batista	2005	A
BRpg667	Suína	São Vicente Ferrer	2005	A
BRbv668	Bovina	Santo Antônio dos Lopes	2005	C
BRdg669	Canina	Monção	2005	A
BRbv670	Bovina	Godofredo Viana	2005	C
BRhm671	Humana	Godofredo Viana	2005	C
BRbv672	Bovina	Mirinzal	2005	C
BRhm673	Humana	Godofredo Viana	2005	C
BRbv674	Bovina	Luis Domingues	2005	C
BRhm675	Humana	Carutapera	2005	C
BRbat5	Quiróptero	Carutapera (Ilha Sapeca)	2005	C

BRdg = Brasil dog; BRbv = Brasil bovine; BRct = Brasil cat; BRhm = Brasil human; BRpg = Brasil pig; BRsp = Brasil sheep; BRbat = Brasil bat

APÊNDICE C – Realização de palestra sobre raiva no Estado do Maranhão em 2005

Foto: Brito, C. J. C., 2005

Foto: Brito, C. J. C., 2005

ANEXO A – Notícia de jornal sobre visita aos focos de raiva no Maranhão

Estudos sobre a raiva trazidos para o Maranhão

Grupo de japoneses apresenta conhecimentos no combate à raiva e buscou identificação de possíveis focos no Estado

Há mais de 50 anos o Japão não registra nenhum foco de raiva. Para aproximar tal realidade do estado do Maranhão, um grupo de japoneses esteve em São Luís para apresentar suas pesquisas na área de raiva e, ainda, conhecer o trabalho que vem sendo desenvolvido pela Agência Estadual de Defesa Agropecuária, - órgão vinculado à Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (Seagro), em parceria com a Secretaria de Estado da Saúde e com a Superintendência Federal da Agricultura no Maranhão (SFA-MA).

Depois de reunir-se com o corpo técnico da AGED, da Su-

perintendência Federal da Agricultura e da Secretaria Estadual de Saúde, o grupo - formado pelo professor PHD Fumio Homma Ito, Go Sato, Takuya Itou e pela professora maranhense, Cristina Câmara - obteve informações sobre a ação dos dois órgãos nestes focos de raiva, localizados nos municípios de Godofredo Viana, Cândido Mendes, Luís Domingues e Carutapera.

No último dia 16, a médica veterinária da AGED, Sonivalde Santana, coordenadora do Programa de Raiva dos Herbívoros no Maranhão, acompanhou o grupo numa visita de reconhecimento das áreas de foco, onde eles pretendiam verificar de perto os lo-

cais onde moram (*habitat*) os morcegos e analisar as espécies encontradas nestes municípios. O Japão, como é grande importador de produtos e subprodutos de origem vegetal e animal, teme alguma contaminação via importação, ou ainda, alguma possibilidade de migração de morcegos via navios.

Para o diretor geral da AGED, Sebastião Anchieta, a presença dos pesquisadores japoneses no Maranhão é muito valiosa, devido à possibilidade de troca de informações, experiências e colaborações no trabalho de diagnóstico e reconhecimento do vírus no Maranhão, desenvolvido pela AGED-MA e SFA-MA.

Fonte: Trilha verde, 28 ago. 2005. Dicas Ecológicas, v. 1, n. 9, p. 2, 2005. Suplemento O Imparcial.

ANEXO C – Folder alertando sobre risco da raiva em animais silvestres divulgado pelas autoridades de Saúde do Estado do Maranhão

ANIMAIS SILVESTRES

ELES TAMBÉM TRANSMITEM A RAIVA

O MACACO, A RAPOSA, O MORCEGO...

EVITE TOCAR NESTES ANIMAIS

ATENÇÃO:

Quando encontrar morcegos, não os perturbe nem tente capturá-los. Como os demais animais silvestres, eles são protegidos por lei. Afaste as pessoas e animais do local onde os morcegos se instalaram e isole o local. Evite o contato direto com eles. Em caso de agressão por estes animais lave o ferimento com água corrente e sabão. Procure o posto de saúde mais próximo para receber o tratamento com soro e vacina contra a raiva.

OUTROS TRANSMISSORES

EVITE CRIAR ANIMAIS SILVESTRES

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
(DEPARTAMENTO DE ZOONÓSES)
(0xx98) 3218-8701
E-mail: zoonoses@saude.ma.gov.br
AGED/MA:
0800-280-6006