Yeda Lopes Nogueira

VALIDAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO DE ISOLAMENTO DE VÍRUS RÁBICO

**PREVALÊNCIA DO VÍRUS RÁBICO EM MORCEGOS ALBERGADOS NO PARQUE
ESTADUAL INTERVALES, ESTADO DE SÃO PAULO: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
DUAS METODOLOGIAS**

YEDA LOPES NOGUEIRA

*Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Práticas de Saúde Públicas
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de
São Paulo para obtenção de Grau de Doutor*

Área de Concentração: Serviços de Saúde

Orientador : Dr. Wilson Uieda

São Paulo

2001

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A raiva é uma encefalite que pode afetar todos os mamíferos, inclusive o homem, o que a caracteriza como uma zoonose. Essa doença é atribuída a um dos vírus da família Rhabdoviridae.

No artigo “História da raiva e seu aspecto global”, STEELE e FERNANDES (1991) descreveram, com muita propriedade e de maneira detalhada, todos os aspectos históricos e evolutivos do conhecimento acumulado pela humanidade sobre a raiva como doença. Esse trabalho relata a história da raiva desde as civilizações mais antigas - como a babilônica, a grega, a egípcia, o império romano, o início da era cristã -, e prossegue citando os casos conhecidos de raiva durante a idade média, período em que teve início o controle dessa doença nos moldes pelos quais a moderna Epidemiologia trata as doenças infecciosas.

O ano de 1995 foi dedicado ao centenário dos trabalhos de Pasteur, que trouxe novos conhecimentos sobre a infecção provocada pelo vírus da raiva, conhecimentos estes que perduram até os dias de hoje, início do século XXI. Esse centenário foi comemorado em instituições de pesquisa científica do mundo inteiro, dentre elas o Museu de Arqueologia e Antropologia na Universidade da Pensilvânia, no qual Koprowski ministrou aula intitulada "O ano de Louis Pasteur". Nesse evento, o autor indagou, com muita propriedade: *"Como 36.000 casos de raiva humana/ano ainda podem existir, apesar de todos os conhecimentos acumulados sobre a vacinação, o controle e o desenvolvimento tecnológico que envolveram o conhecimento sobre o vírus rábico nesta última metade do século XX?"* (KOPROWSKI, 1996).

Sem dúvida muitos conhecimentos foram adquiridos, muitos recursos foram empregados para manter a raiva sob controle, tanto nos países ricos como nas nações em desenvolvimento. Entretanto, nesse segundo grupo de países - aqueles em desenvolvimento -, algumas medidas não são adotadas por razões culturais, administrativas e/ou econômicas.

Já os países ricos - como os Estados Unidos, o Canadá e aqueles situados na Europa Ocidental - utilizam intensivamente tecnologias avançadas para o controle da raiva silvestre, como sofisticadas vacinas, palatáveis aos lobos e às raposas, lançadas por aviões em número adequado e em locais apropriados, acessíveis às populações-alvo (BACHMANN *et al.*, 1990; BROCHIER *et al.*, 1994; 1995; 1996a, b). Além disso, tais países investem considerável volume de recursos em pesquisas sobre o assunto: nos Estados Unidos, por exemplo, são realizados inúmeros exames laboratoriais, e existe um mapeamento da distribuição de toda a raiva que ocorre nos reservatórios silvestres, como nas populações de morcegos *Procyon lotor* (racoons) e *Mephitis mephitis* (skunks) (RUPRECHT *et al.*, 1986; 1987; SMITH *et al.*, 1990; ROBBINS, 1994).

Na verdade, e apesar deste cenário de estratégias tecnológicas e biologia molecular básica, ainda não conhecemos o suficiente sobre o vírus rábico e a dinâmica de infecção viral nas populações silvestres. Existe uma lacuna entre o conhecimento molecular do vírus e a macrogeografia (KREBS *et al.*, 1995).

Também foram realizados estudos dos riscos de transmissão da raiva pelo contacto entre morcegos e humanos ou animais domésticos (PAPE, 1999). Tais estudos, porém, foram realizados com animais suspeitos,

submetidos a exames quando já apresentavam um comportamento anormal. Segundo KREBS (1995), nenhum estudo sistematizado foi realizado sobre a prevalência do vírus em morcegos sadios. Assim, comenta o autor:

"Como previamente descrito, a raiva em animais silvestres nos Estados Unidos tem sido caracterizada, principalmente, por compilar dados de testes positivos de animais submetidos e sendo testados por questões de facilidades, pois em grande parte, os animais submetidos dependem da iniciativa pública e municipal, comprometendo a qualidade de tais dados. Enquanto estes dados são úteis na documentação do acontecimento no tempo ou espaço, eles são limitados para a análise e pesquisa ecológica e epidemiológica. Esforços adicionais são requeridos para estimar a incidência da doença, além de simplesmente contar o número de testes positivos. Sem amostras sistemáticas ou vigilância de um grande número de animais tanto doentes como saudáveis, se torna difícil analisar o impacto da raiva na população animal. Estudos transversais bem desenhados para populações silvestres seriam úteis na determinação da prevalência da infecção, avaliando diferenças demográficas na doença e caracterizando a dinâmica de transmissão."

Essa é uma das grandes lacunas do conhecimento sobre a raiva, e constitui-se em um dos maiores desafios para os grupos de pesquisa envolvidos no estudo da doença. De qualquer forma, preencher as lacunas existentes é um trabalho árduo, pois exige a formação de grupos multidisciplinares, com profissionais de diferentes áreas do conhecimento. Esses grupos, a princípio, deveriam ser constituídos por zoólogos, ecologistas, epidemiologistas, estatísticos, biólogos moleculares e virologistas. Logicamente, grupos desse porte só poderiam efetivamente funcionar em centros de pesquisas de excelência. Contudo, grupos temáticos, formados por estudiosos de diferentes instituições, também podem apresentar condições de desenvolver tais pesquisas. E, apesar dos elevados custos que demandam, tais investigações podem garantir o controle da raiva tanto na população humana como nas populações de animais domésticos e silvestres (KREBS *et al.*, 1995).

Enfim, os desafios existentes - e as perspectivas de vencê-los -, devem servir de motivação para que sejam implementados novos estudos sobre essa antiga doença, que ainda hoje continua sendo um problema de saúde pública.

1.1.1 ETIOLOGIA DA DOENÇA

O agente etiológico vírus rábico pertence à família Rhabdoviridae, constituída por mais de 80 agentes etiológicos de doenças infecciosas em vertebrados, invertebrados e plantas. O vírus rábico que infecta os vertebrados e os insetos pertence ao gênero *Lyssavirus*. A família Rhabdoviridae caracteriza-se por apresentar a forma de bastão (*rabdo* = bastão) ou bala, envolvida por um envelope revestido por espículas (moléculas de glicoproteínas), e contém uma fita negativa de ácido ribonucleico (ARN) (HUMMLER, 1973).

1.1.1.1 MORFOLOGIA

O *Lyssavirus* que provoca a raiva tem a forma de bala, cônica em uma das extremidades e achatada na outra, com diâmetro de 75 nanômetros e 180 nanômetros de comprimento (ATANASIU *et al.*, 1967; MATSUMOTO, 1967). Essa cápsula é revestida por um envelope constituído de uma membrana dupla de fosfolípidios, onde aproximadamente 500 moléculas de glicoproteínas estão inseridas. No seu interior, contém uma fita negativa de ARN (Figura 1.1).

O nucleocapsídeo é composto pela estrutura helicoidal da fita negativa de ARN protegida por subunidades de moléculas de proteína (HUMMLER, 1968; 1973).

- Ácido nucleico - o genoma viral é constituído por uma fita (-) de ARN com peso molecular = 4,6 x10 Daltons, e um coeficiente de sedimentação de 45 S (Svedberg).

A replicação viral requer a ação da enzima transcriptase, que atua em duas direções: na transcrição e na replicação. Ela sintetiza a fita de ARN junto com a molécula de ARN mensageiro, que codifica as proteínas virais.

- Proteínas estruturais - a partícula viral contém em média 74% de proteínas, 22% de lipídios, 3% de carboidratos e 1% de ácido nucleico. No gel de eletroforese, as proteínas essenciais aparecem separadas em cinco bandas (SOKOL, 1973; ATANASIU, 1981):
 - ♦ Glicoproteína G - compõe as espículas do envelope
 - ♦ Nucleoproteína - recobre o ARN viral
 - ♦ 2 Proteínas de Membrana - compõem o envelope
 - ♦ Lipoproteína - também compõe o envelope

1.1.1.2 REPLICAÇÃO

Durante o ciclo de replicação do vírus, o ácido ribonucleico é primeiramente transcrito e depois replicado.

A transcrição da molécula de ARN se processa iniciando o seu alongamento no sentido

daporção 3' terminal para a porção 5' terminal (3' → 5'). Nessa seqüência, é produzido primeiro um ARN líder, seguido por cinco ARNs mensageiros, que codificam as cinco proteínas estruturais acima mencionadas.

Após a transcrição, os ARNs mensageiros são traduzidos para sintetizar as proteínas estruturais no citoplasma celular. A replicação resulta da síntese de uma nova fita positiva do ARN,

complementar ao ARN genômico, que será usada como matriz para a síntese de novos genomas virais; estes, posteriormente, serão incorporados em novos virions (BOURHY, 1991).

1.1.- Organização molecular do vírus rábico

Fonte: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/the-virus.html> [18/10/2000]

Os vírus do gênero *Lyssavirus* foram considerados, durante muito tempo, como um grupo antigenicamente homogêneo.

Atualmente, entretanto, sete sorotipos são reconhecidos por diferentes anticorpos monoclonais, conforme se observa no Quadro 1.1:

Quadro 1.1 - Origem e distribuição dos *Lyssavirus* Família Rhabdoviridae Gênero *Lyssavirus*

Sorotipos	Distribuição geográfica	Espécies animais
1. Raiva	Mundo inteiro, exceção Austrália, Grã-Bretanha, Irlanda, Escandinávia, Japão, Havaí e Antártica	Humanos, carnívoros, herbívoros e morcegos.
2. Lagos	Nigéria, Zimbábue, República Centro-Africana, África do Sul e Senegal	Morcegos frugívoros
3. Mokola	Nigéria, Zimbábue, República Centro-Africana e Camarão	Humanos, mangustos, gatos e roedores
4. Duvenhage	África do Sul e Zimbábue	Humanos e morcegos insetívoros
5. EBL 1 6. EBL 2	Europa	Humanos e morcegos insetívoros do gênero <i>Pipistrellus</i> Humano e morcegos insetívoros do gênero <i>Myotis</i>
7. ABL*	Austrália	Morcegos frugívoros do gênero <i>Pteropus</i> e <i>Pteropus poliocephalus</i> "flying fox"

* *Emerging Infectious Diseases. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia.* G. Fraser et al., 2:4

(1996). Fonte: *Methods de Laboratoire pour le diagnostic de la Rage*, H.Bourhy, P. Sureau et Hirose. In Pasteur I, ed. Paris (1991), p.15.

1.1.3 PATOGENIA

O atual entendimento da patogênese da raiva ainda se baseia no trabalho de Pasteur. Em seres humanos e animais, o vírus multiplica-se inicialmente no local da inoculação, em seguida penetra nos terminais nervosos, e gradativamente caminha ao longo dos axônios, atingindo o sistema nervoso central. A propagação não ocorre pela via sanguínea.

O tecido nervoso é o principal material para a replicação do vírus. Entretanto, a distribuição do vírus é heterogênea entre o cérebro, a medula espinhal e os gânglios. O vírus também se difunde em outros tecidos, por migração centrífuga, e é eliminado nos fluidos de secreções e excretas. Pode ser detectado nas glândulas salivares e na saliva. A ausência de lesões histopatológicas, aliada à resposta imunopatológica durante uma infecção natural, sugere que a causa dos sintomas é a disfunção neuronal cerebral, que leva ao coma (BAER, 1968).

1.1.3.1 A DOENÇA

A manifestação da doença ocorre após a infecção viral transmitida por um animal infectado, geralmente por mordida, ou por contacto da mucosa ou pele escoriada da vítima com a saliva do animal infectado. A contaminação, ainda que remota, pode se dar por via aérea (aerossol), em ambientes fechados nos quais exista alta concentração de partículas virais (PIKE, 1976; WIKLER, 1972; 1973).

Outro modo de transmissão inter-humanos são os transplantes de córneas, havendo oito casos registrados na literatura (HOUFF, 1979; CDC, 1980; 1981; GODE e Bhide, 1988; WHO, 1994).

Os aspectos clínicos da doença são bem conhecidos desde a antiguidade, e foram descritos por diferentes autores, como ANDERSON (1985), que constatou o período variável de incubação, e HATTWICK (1974); CHOPRA (1980) e KAPLAN (1986), que abordaram as manifestações da doença. HURST (1931) e PAWAN (1939) ativeram-se aos aspectos característicos da raiva paralítica, e TUNNER (1983) fez observações sobre a síndrome de Landry-Guillan-Barré, que provoca a paralisia simétrica.

1.1.4. TRATAMENTO

Após o aparecimento dos sintomas, a letalidade da doença é de praticamente 100%. O único tratamento efetivo é a vacinação, aplicada profilaticamente. A aplicação da vacina pode ser realizada antes de qualquer mordedura, nas pessoas expostas a riscos, ou imediatamente após a mordida. Em alguns casos, a soroterapia é associada à vacinação. Os procedimentos para o uso de vacinas e de soroterapia podem ser encontrados em COSTA (2000).

1.1.5 DIAGNÓSTICO

Em animais e em seres humanos, a raiva caracteriza-se por um quadro clínico de encefalite viral, mas os sinais e sintomas da encefalite causada pela raiva podem variar de acordo

com a espécie animal e os indivíduos. Clinicamente, é possível diferenciar a raiva de outras encefalites virais.

O diagnóstico da raiva no animal responsável pela infecção é o mais importante: se positivo, pode-se iniciar ou dar continuidade ao procedimento de tratamento pós-exposição; se negativo, e no caso de animal doméstico conhecido e mantido sob observação, interrompe-se o tratamento. A interrupção do tratamento não é válida quando o animal responsável pela infecção for silvestre, pois que não há conhecimento acumulado sobre a história natural da raiva em todos os animais silvestres que possam transmiti-la.

1.1.5.1 IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os métodos laboratoriais são necessários para confirmar o diagnóstico clínico da raiva. No entanto, alguns requerimentos são necessários para que se possam detectar os antígenos do vírus rábico na impressão da córnea, no fluido cerebrospinal (líquor), na saliva, na raiz do bulbo capilar e no local da mordida. Em seres humanos, os anticorpos específicos para a raiva nem sempre aparecem ao final da fase clínica da doença. É recomendável observar anticorpos tipo IgM no líquido e no soro. Esses materiais biológicos, colhidos *intra-vitam*, podem freqüentemente apresentar resultados negativos - o que não deve levar à exclusão do diagnóstico positivo para a raiva. É recomendável colher os mais diferentes tipos de material para repetir os testes.

1.1.5.2 SELEÇÃO DO MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO

A seleção do material a ser submetido ao laboratório deve ser realizada com base na sensibilidade do método a ser utilizado. Na prática, nem toda a técnica laboratorial é aplicada a todos os tipos de material. O laboratório de diagnóstico trabalha com duas espécies de material quando o paciente suspeito de raiva está vivo:

- **para pesquisa de antígeno:** saliva, líquido, biópsia de pele e bulbo capilar (método direto)
- **para pesquisa de anticorpo:** sangue e líquido (método indireto)

1.1.5.2.1 Material colhido *intra-vitam*

Este tipo de material é colhido na fase clínica da doença, mais precisamente na fase tardia da fase clínica, e permite a observação de antígeno - vírus rábico - nos fluidos biológicos e nos tecidos, e de anticorpos específicos para a raiva - na ausência de vacinação - no líquido e no sangue.

1.1.5.2.2 Material colhido *post-mortem*

O tipo de material colhido e submetido ao laboratório varia com a espécie animal (BOURHY, 1991).

- **pequenos animais silvestres** (inclusive morcegos): encaminha-se o corpo intacto, de maneira que possibilite a identificação da espécie. Em geral, colhe-se apenas o cérebro para diagnóstico.
- **animais de médio porte domésticos e silvestres** (cães, gatos, lobos, raposas, gambás etc.): em geral, encaminha-se a cabeça inteira e examina-se o corno de Ammon no hipocampo.

- **animais de grande porte - herbívoros domésticos** (gado bovino e bubalino) e **silvestres** (cerdo e antílope): coleta-se e encaminha-se apenas o corno de Amon (hipocampo).
- **humanos**: colhe-se o material pela introdução de um cilindro (pipeta) pelo foramen retro-orbital, e retira-se o tecido cerebral constituído por parte da massa cinzenta, parte do hipocampo, tálamo e cerebelo.

1.1.5.3 Exames laboratoriais

- **Deteção do antígeno** por impressão do tecido nervoso em lâmina:

É usada com mais frequência a técnica de **imunofluorescência** direta (IF) (GOLDWASSER e KISLING, 1958), com impressão do tecido cerebral em lâmina e reação com conjugado anti-rábico marcado com isotiocianato de fluoresceína.

Recentemente, tem-se utilizado a técnica de **PCR** (*polimerase chain reaction*) (BOURHY, 1993) para detectar pequenas quantidades de antígenos, principalmente de materiais preparados em parafina para cortes histológicos, no preparo de material para realizar genotipagem ou em material mal conservado (WANER, 1997).

- **Isolamento do vírus**

O procedimento preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o isolamento do vírus rábico é a inoculação intracerebral do material suspeito em cérebro de camundongos jovens (21 dias de idade), também chamada de prova biológica. Essa prova tem sido considerada a prova de referência para o isolamento do vírus rábico por laboratórios que não dominem a técnica de isolamento em cultivo celular, pois é possibilita a reprodução da doença.

Com o desenvolvimento das técnicas de cultivo celular, algumas linhagens celulares foram utilizadas para o isolamento e a replicação do vírus rábico. Dentre as culturas de células mais usadas há a linhagem BHK-21 e a linhagem WI-38 (WIKTOR, 1964; 1972).

Recentemente, têm sido utilizadas células de neuroblastoma murino para o isolamento e o diagnóstico do vírus rábico; essa linhagem celular é considerada a mais sensível para o diagnóstico rápido do vírus. Tais células têm a capacidade de apresentar a replicação viral após 24 horas de inoculação do material suspeito, com a revelação do antígeno feita com a reação de imunofluorescência direta nas culturas infectadas (BOURHY, 1991). Essa metodologia substitui a prova biológica nos laboratórios (RUDD, 1980; PORTNOÏ, 1982; SUREAU, 1986).

1.1.6 EPIDEMIOLOGIA

Os avanços tecnológicos e as metodologias que envolvem os aspectos moleculares da imunologia e da patogenia, associados ao estudo do comportamento das doenças em populações, comunidades e ecossistemas, têm sido objeto de atenção em programas de controle de doenças infecto-contagiosas. No caso da raiva, programas de controle da doença em animais silvestres já aplicaram esses conhecimentos - além do estudo da distribuição geoespacial das espécies -, em

populações de lobos, raposas (Europa, Estados Unidos e Canadá) e de *Procyon lotor* (racoons) (Estados Unidos) (ANDERSON, 1981; RUPRECHT, 1995; KREBS, 1995).

Os trabalhos de ANDERSON (1981) e ANDERSON e MAY (1982a, b), que contemplam estudos da população, de biologia, de ecologia e de evolução, em muito contribuíram para a compreensão das relações hospedeiro-parasita. Esses autores investigaram, por meio de modelos matemáticos e teóricos, a proporção ideal de animais vacinados necessária para o controle da epidemia da doença em populações com indivíduos infectados e susceptíveis. Tais estudos incluem os índices de dispersão, a demografia e a geografia - distribuição geoespacial.

A raiva ocorre em distintas regiões geográficas, e casos dessa doença têm sido diagnosticados em diferentes espécies de mamíferos. Com o desenvolvimento da técnica de anticorpos monoclonais, foi possível demonstrar que distintas variantes antigênicas circulam em diferentes populações hospedeiras, e que essas variantes podem ser restritas a determinadas áreas geográficas (RUPRECHT, 1991).

WIKTOR (1978, 1980) e FLAMAND (1980) realizaram os primeiros trabalhos com anticorpos monoclonais, e identificaram as primeiras variantes antigênicas do *Lyssavirus*. Outros métodos, envolvendo técnicas de caracterização estrutural do genoma viral (SACRAMENTO, 1991; BOURHY, 1992 e SMITH, 1992 a, b), também demonstraram que as cepas virais e seus hospedeiros estão mutuamente adaptados, o que favorece e prolonga a coexistência entre o vírus e a espécie hospedeira.

Para que o vírus da raiva sobreviva na espécie hospedeira, é essencial que a transmissão ocorra de um animal infectado, durante o período de excreção do vírus, para outros animais susceptíveis da mesma espécie. Para Tanto, é necessário que a cepa do vírus esteja bem adaptada à fisiologia e à biologia da população hospedeira (BACON, 1985).

Em estudo realizada com raposas da Europa, WANDERLER (1994) observou que a transmissão da raiva depende tanto da participação dos indivíduos doentes como daqueles não doentes. Geralmente, o animal doente (agressivo) morde um indivíduo não doente. As condições para que o indivíduo doente se aproxime de um indivíduo não doente dependem de fatores como idade, sexo, *status* social e variações cíclicas ligadas à demarcação de território e cópulas. Fatores como a geografia espacial e a distância entre um animal e outro têm influência sobre a disseminação do vírus (ANDRAL, 1982), e geralmente o animal infectado morre perto do local onde vive.

A frequência com que as espécies carnívoras adquirem a doença depende da susceptibilidade e da proximidade à exposição, além do comportamento da vítima. Assim, no caso de cães machos infectados, o comportamento de demarcação do território - caracterizado pelo aumento da agressividade -, pode fazer com que a transmissão atinja maior número de animais; no caso de fêmeas, a transmissão pode ser vertical - da mãe para os filhotes (WANDERLER, 1994).

O vírus rábico pertencente ao gênero *Lyssavirus* atinge vertebrados da classe Mammalia, e seus principais reservatórios são os mamíferos pertencentes às ordens Carnivora e Chiroptera (ATANASIU, 1979).

Em condições experimentais, nenhum mamífero estudado até hoje é totalmente refratário à infecção do *Lyssavirus* (FEKADU, 1991). No entanto, o grau de susceptibilidade varia de acordo com a espécie. Em geral, os canídeos são mais susceptíveis que os marsupiais. Segundo BAER (1990), tais animais são menos susceptíveis à doença porque apresentam menor número de receptores nicotínicos e à acetilcolina, pois esses receptores facilitam o neurotropismo do vírus (LENTZ, 1982; 1985).

Os padrões de prevalência da raiva variam de acordo com a área. A caracterização e a oscilação dessa prevalência em uma dada área dependem da geografia espacial – paisagem - e das características do *habitat* (JAKSON, 1982). A observação dessas oscilações possibilita que se determine um quadro constante de ondas epizooticas que variam de acordo com a densidade da população atingida. WANDERLER *et al.* (1985) observaram, na Europa, incidência de raiva de 2 raposas/km²/ano; essa incidência aproxima-se dos valores de pré-epizootia, o que provocaria grande índice de mortalidade se a densidade populacional fosse alta.

Muitas epidemias ocorrem pelo potencial contacto infeccioso entre indivíduos doentes e hospedeiros susceptíveis. Grande número de variantes do *Lyssavirus* sobrevive porque desenvolve uma co-adaptação à fisiologia do hospedeiro (estado de latência)¹. Desta forma, alguma falha na vigilância imunológica pode promover a incubação desse vírus durante várias semanas e, após apresentar desordens nas funções neurológicas, o animal excreta-o pela saliva, deflagrando a transmissão. Geralmente o hospedeiro morre em consequência da infecção, mas a excreção do vírus ou a morte nem sempre significam o fim do contacto infeccioso. Além disso, os animais podem ser expostos a doses subletais do vírus sem apresentar efeito aparente - doença ou resposta imune mensurável (FEKADU, 1991).

Há evidências de que a infecção por *Lyssavirus* com o envolvimento do sistema nervoso nem sempre é fatal (WANDERLER, 1994). Em estudos realizados com cães, BELL (1975) e FEKADU (1991) definiram critérios para a diferenciação entre infecção latente, infecção abortiva e recuperação - com ou sem seqüelas -, associando simultaneamente medidas de anticorpos no soro a um sistema sensível de detecção de vírus.

FEKADU (1991) constatou que alguns hospedeiros – cães - infectados e recuperados continuavam a eliminar vírus por longo período de tempo. Em contrapartida, o autor também verificou que animais infectados com cepas virulentas desenvolveram encefalite aguda seguida de morte, o que impediu a transmissão do vírus para outros animais e interrompeu o ciclo de sobrevivência da cepa.

Esses achados coincidem com as observações de RUPRECHT *et al.* (1988) que, em estudo no qual isolaram o vírus de cães e inocularam-no em *Procyon lotor* (racoons), detectaram encefalite mas não recuperaram vírus das glândulas salivares

A infecção abortiva, a recuperação, a reativação do vírus e o portador são bem descritos na literatura virológica. Infelizmente, não há estudos recentes, que combinem técnicas modernas e sensíveis e comparem hospedeiros silvestres, cepas virais, rotas e doses significativas de infecção

¹ Nesse contexto, estado de latência significa presença do vírus no organismos em condições de equilíbrio imunológico, ou seja, os anticorpos do organismo são capazes de neutralizar os virions presentes (infecção com baixa carga viral).

para avaliar criticamente as epidemias. De qualquer forma, é duvidoso que situações geradas nos limites dos laboratórios correspondam realmente ao que acontece com a epizootia em ambientes naturais (FEKADU, 1991).

Para WANDERLER (1994), é necessário rever o conceito de que o portador natural é o reservatório natural e o último mecanismo para a sobrevivência do *Lyssavirus*.

WINKLER (1972) questiona se as fases tradicionalmente aceitas para a raiva - neurotropismo, período de incubação de poucas semanas, excreção pela saliva, encefalite e morte - fundamentam realmente a epidemiologia da doença. Para o autor, se assim fosse, por que os roedores silvestres apresentam, comparativamente a outros animais, insignificante envolvimento com a essa doença, uma vez que são passíveis de se infectar experimentalmente e transmitir o vírus infeccioso?

A perpetuação global do vírus no hospedeiro é assunto bastante complexo - que contempla a heterogeneidade genética, a variedade de hospedeiros mamíferos e a complexa inter-relação da patogênese viral, além da resposta imune individual -, e sua elucidação e compreensão certamente requerem novos e mais aprofundados estudos.

As espécies da ordem Carnívora reconhecidas como as principais hospedeiras do vírus rábico têm algumas características comuns: são de pequeno porte - pesam entre 0,4 e 20kg -; têm comportamento generalista - hábitos alimentares diversos e costume de ingerir resíduos deixados pelo homem -, o que permite espalhar e distribuir o vírus; podem apresentar alta densidade populacional nas proximidades de comunidades humanas (EWER, 1973; EISENBERG, 1981).

A ordem Chiroptera é constituída por mamíferos voadores de pequeno porte, hábitos noturnos e comportamentos alimentares específicos - fitófagos, insetívoros e hematófagos -, além de manterem taxas de crescimento populacional muito baixas (WANDERLER, 1994). Assim como os carnívoros, os morcegos que vivem em zonas temperadas costumam hibernar, e algumas espécies migram sazonalmente por longas distâncias (GAISLER, 1979).

Os morcegos têm uma hierarquia social bem definida e geralmente organizada na forma de harém (KURST, 1983). É comum o jovem macho ser descartado da colônia logo que entra na fase adulta e, freqüentemente, formam-se novos haréns com esses morcegos, que disputam entre si a nova liderança (McCRACKEN, 1981). A transmissão provavelmente ocorre por meio das mordidas, habituais nas interações competitivas que ocorrem nos abrigos (WILKINSON, 1984) e junto às fontes de alimentos (TURNER, 1975).

É possível que a transmissão ocorra por aerossóis. Entretanto, raramente são encontradas cavernas com grande concentração populacional (CONSTANTINE, 1967; MAHAN, 1973). Desta forma, é necessário investigar outras rotas de transmissão viral, entre as quais podem se inscrever o hábito social que os morcegos têm de se lamberem mutuamente, e o tipo de acasalamento em colônias (WILKINSON, 1984).

As considerações até aqui expostas evidenciam que não é possível compreender a manutenção do vírus em cada espécie animal sem conhecer sua organização social, sua hierarquia, sua territorialidade e seus abrigos.

1.1.7 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA RAIVA

A raiva está presente em todo o mundo, até mesmo em territórios anteriormente considerados livres da doença, como a Inglaterra e a Austrália, países nos quais já foram diagnosticados casos de raiva em morcegos (WHITBY, 1996; FRASER, 1996; HOOPER, 1997). Atualmente, ainda são considerados territórios livres da raiva o Japão, a Antártica, a Finlândia e a Suécia (BLAJAN, 1985).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (*World Survey of Rabies*, 1992), aproximadamente 35.000 pessoas morrem de raiva anualmente. Os casos de raiva, bem como a espécie hospedeira predominante, dependem das características locais e da forma como são constituídas as comunidades urbanas e rurais. Em geral, os cães são os mais atingidos e, se suas populações fossem controladas e imunizadas, os casos da doença diminuiriam drasticamente.

O quadro abaixo demonstra a situação da raiva no mundo, segundo dados da Organização Mundial de Saúde.

Quadro 1.2. - Distribuição mundial das espécies hospedeiras domésticas e silvestres, número de casos humanos e exposição mais frequentes em 1992.

	Espécies Domésticas	Hospedeiros Silvestres	Casos Humanos	Exposições mais frequentes
Europa	Cães	Raposas	20	Raposas
Ásia	Cães	Lobos, chacais e raposas	34.950	Cães e desconhecido
África	Cães	Mangustos e chacais	494	Cães
<i>América do Norte</i>	Cães e gatos	<i>Skunks</i> , raposas e <i>racoons</i>	220	Cães e morcegos
Américas Central e do Sul	Cães, gatos e gado bovino	Mangustos e morcegos		
Oceania	Cães		327	Cães e desconhecido
Total	36.011			

Fonte: Adaptado de Koprowski (1996) Res.Virol.Vol.147.p.382.

1.1.8 PROFILAXIA

As medidas profiláticas voltadas ao controle da raiva baseiam-se nas informações epidemiológicas. Na cadeia de infecção da raiva, os animais silvestres são o primeiro elo de ligação. É muito difícil, e financeiramente oneroso, controlar a doença nesse segmento, mas nas regiões em que a raiva silvestre ocorre com maior frequência - como nos Estados Unidos e nos países da Europa -, busca-se vacinar a população silvestre, como citamos anteriormente (ARTOIS, 1987; PASTORET, 1987; BROCHIER, 1994; 1995; 1996).

Para reduzir a população animal responsável pela transmissão da doença em situações de foco epidêmico, os Centros de Controle de Zoonoses adotam medidas de controle sanitário, e os órgãos de defesa animal eliminam os morcegos hematófagos com a utilização de pastas anti-coagulantes (KOTAIT, 2000).

O segundo elo de ligação na cadeia de infecção da raiva são os animais domésticos: nas zonas rurais, esse contingente é constituído por carnívoros e herbívoros; nas zonas urbanas, os cães são os mais importantes reservatórios da infecção, pois mantêm o ciclo epizoonótico nas populações humanas em países da Ásia, África e América Latina (BOURHY, 1990).

Habitualmente, as medidas de controle da doença nas regiões urbanas e peri-urbanas são direcionadas às populações de cães. Para Kotait (2000), o melhor método para controlar a raiva nessas áreas é capturar os cães errantes e sacrificá-los. Quando essa operação é bem conduzida, os casos de raiva urbana caem drasticamente.

Para WHITBY (1996), a raiva em animais domésticos pode ser controlada pela vacinação de carnívoros e do gado bovino. O autor também postula que os países livres da raiva devem proibir a importação de animais, ou impor a quarentena obrigatória, quando a permitirem.

A proteção contra a raiva humana compreende três tipos de medidas:

- **Vacinação preventiva (pré-exposição)**

No Brasil, as normas para a vacinação anti-rábica são determinadas pelo Ministério da Saúde e seguem as recomendações do Comitê de Peritos da OMS, que se reúne com frequência e elabora recomendações, amplamente divulgadas em boletins.

Nas áreas de risco, a vacinação preventiva deve ser recomendada, pois constitui-se em método seguro e fácil de implementar. Também as pessoas que, pela profissão que exercem, estão expostas ao contacto com animais raivosos – como médicos veterinários, tratadores de animais e auxiliares de clínicas e/ou hospitais veterinários – devem ser vacinadas. A OMS também recomenda a vacinação preventiva àqueles que viajam para países afetados por enzootia de raiva, como é o caso de alguns países da África, da Ásia e da América do Sul.

Nas zonas severamente afetadas pela doença é recomendável vacinar as crianças profilaticamente, pois essa população é a mais frequentemente exposta ao contacto direto com animais doentes e, conseqüentemente, sujeita a mordidas (AKAKPO, 1985).

- **Tratamento pós-exposição**

Esse tratamento varia de acordo com o tipo de vacina utilizada. Em geral, seguem-se as recomendações estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde.

No estado de São Paulo, a partir do ano 2000, a vacina Fuenzalida (FUENZALIDA e PALACIOS, 1954) para uso humano foi abolida, em virtude do aumento, constatado por NOGUEIRA (1998), dos casos de acidentes pós-vacinais.

A vacina anti-rábica humana é produzida em cultura de tecidos, e o tratamento segue as normas dos fabricantes. Os tratamentos profiláticos - pré-exposição - e os tratamentos pós-exposição são baseados em critérios que estabelecem o esquema apropriado de vacinação. Quando houver necessidade, pode-se adotar a soroterapia, associada a esquemas de vacinações especiais. A eficácia desse tratamento foi verificada por HABEL e KOPROWISKI em 1954, e mantém-se até os dias atuais. No entanto, tratamentos desse tipo devem ser criteriosos

pois podem acarretar efeitos adversos, uma vez que os produtos utilizados são produzidos em animais.

Os diversos esquemas e os devidos critérios estão normatizados no Manual Técnico do Instituto Pasteur intitulado “Profilaxia da Raiva Humana” (COSTA, 2000).

- **Educação da população**

A população deve ser informada sobre os riscos e sobre os métodos de proteção, principalmente na possibilidade de exposição. Deve ter consciência da obrigatoriedade de vacinar os animais domésticos, sujeitos à infecção rábica.

1.1.9 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Após tantos séculos de convivência com a doença, a raiva ainda nos preocupa porque se insere no cenário das doenças reemergentes. Todavia, enfoque maior deve ser dado à raiva silvestre e seus novos modos de atuar, considerando o estilo de vida do homem no final do século XX e início de século XXI. E essa realidade é assim relatada por RUPRECHT *et al.* (1995), com singular clareza:

*“A epidemiologia da raiva nos Estados Unidos tem mudado substancialmente nesta última metade do século, como a origem da doença tem mudado de animais domésticos para animais silvestres, principalmente racoons (*Procyon lotor*), skunks (*Mephitis mephitis*), raposas e morcegos. No entanto, as mudanças observadas entre as populações silvestres afetadas não tem ocorrido sem a influência humana. Sem dúvida a atração humana pela recreação em ambientes naturais e também cujos recursos econômicos permitem esse acesso têm contribuído para a re-emergência da raiva como a maior zoonose.*

As mortes humanas causadas por raiva tem declinado para uma média de um ou dois casos nos países desenvolvidos, sendo que está associado a este declínio, o custo estimado de centenas de milhões de dólares gastos anualmente.

No futuro, os profissionais de saúde pública terão que aplicar esforços para controlar a raiva abrigada em diversos reservatórios silvestres e terão de usar a criatividade para obter soluções seguras e com custo-eficácia ao lado dos métodos tradicionais de controle no combate dessa antiga doença conhecida pela humanidade.”

A transição epidemiológica da raiva nos Estados Unidos na última metade do século XX tem sido demonstrada pela diminuição dos casos da doença em cães, gatos, bovinos e seres humanos, e pelo seu considerável aumento nas espécies silvestres, conforme mostram as tabelas de séries históricas apresentadas pelo Center for Diseases Control (CDC) e publicadas por BAER (1991) e KREBS (1996).

Essa transição deve-se ao controle vacinal das populações caninas e felinas que habitam as áreas urbanas, e comprova a eficiência da vacinação. Evidentemente, nos países em que não há controle vacinal ou eliminação de animais infectados, essa transição epidemiológica não é observada, mesmo porque nem as estatísticas são confiáveis. De qualquer maneira, há registros de maior número de animais silvestres infectados, o que talvez se deva à melhoria dos métodos diagnósticos, mais sensíveis na atualidade. Entretanto, devemos ter em mente que a raiva é uma

doença endêmica no mundo todo, e só tem sido controlada com grandes esforços e recursos, que oneram a economia de muitos países.

1.2 JUSTIFICATIVA

Dada a complexidade do novo perfil epidemiológico que a raiva apresenta, novos desafios estão surgindo para o conhecimento e o controle do vírus rábico, o que induz os estudiosos a procurarem novas metodologias e técnicas diagnósticas para intervir com maior eficácia no controle dessa doença. No Brasil, que contempla grande diversidade de espécies de morcegos e de ecossistemas, é muito importante dispor de métodos que permitam aprofundar os conhecimentos sobre a raiva.

No momento, a metodologia disponível para estudos dessa ordem é extremamente dispendiosa. Estudando a presença do vírus rábico em populações de morcegos coletados em abrigos diurnos, CORTES *et al.* (1994) observaram percentual de 0,9% de prevalência. Ao realizarem o isolamento do vírus rábico em morcegos *Desmodus rotundus*, NILSON *et al.* (1975) e SUGAY (1966) constataram índices que variavam entre 0 e 3%, dependendo da endemicidade da região.

Geralmente, a técnica de isolamento do vírus rábico adotada é a inoculação em camundongos, mas esse método nem sempre é bem sucedido, principalmente quando a carga viral é baixa. WEBSTER (1987) avaliou o isolamento de material comprovadamente positivo pela técnica de imunofluorescência, e comparou dois procedimentos para esse isolamento: a inoculação intracerebral em camundongos e a inoculação em células de neuroblastoma murino. Os resultados foram similares em 93% dos casos. No entanto, quando da inoculação de baixas concentrações de vírus, a concordância entre os dois procedimentos foi de apenas 50% das amostras.

Com relação ao isolamento do vírus em células de neuroblastoma murino, SMITH já constataria, em 1978, a rapidez desse método, que demanda entre 2 e 6 dias. Assim, em 1990, o mesmo autor utilizou células de neuroblastoma murino para isolamento do vírus rábico em morcegos quando o padrão de reatividade à imunofluorescência era muito baixo, e comprovou que tais células têm dez vezes mais sensibilidade na detecção do vírus que a técnica de isolamento em camundongos.

Também NOGUEIRA (1992 a, 1992b; 1998), que utilizou a célula McCoy, registra melhor desempenho dessa célula no isolamento do vírus rábico que aquele apresentado pela prova biológica - inoculação intracerebral em camundongos. O autor observou que em poucos dias - 72 horas -, facilmente se isolava o vírus quando o título era superior a 10^3 DL 50% / 0,03ml).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento do vírus rábico em uma comunidade de morcegos que habitam a Mata Atlântica, importante ecossistema brasileiro. Além

disso, buscamos desenvolver uma nova metodologia, que apresentasse sensibilidade e validade (acurácia), e uma relação custo-benefício satisfatória, para facilitar novas investigações nesse campo de estudo.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVOS GERAIS

São objetivos do presente estudo:

- Validar um novo método de isolamento do vírus rábico – que utiliza a célula McCoy -, comparando os resultados com ele obtidos àqueles obtidos com o método de referência - que utiliza a célula de neuroblastoma murino (padrão ouro)¹.
- Estudar a prevalência do vírus rábico em uma amostra de morcegos capturados no Parque Estadual Intervales (Mata Atlântica), no período de 1995 a 1997.

Desta forma, e para melhor compreensão dos resultados, optamos por dividir o trabalho em duas partes, de acordo com os objetivos propostos:

- PARTE I: VALIDAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO DE ISOLAMENTO DO VÍRUS RÁBICO.
- PARTE II: PREVALÊNCIA DO VÍRUS RÁBICO EM MORCEGOS ALBERGADOS NO PARQUE ESTADUAL INTERVALES, ESTADO DE SÃO PAULO (ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS METODOLOGIAS).

Portanto a HIPÓTESE DE TRABALHO é:

"Para a hipótese nula a prevalência observada a *posteriori* (pós-teste) é **igual** da prevalência esperada a *priori* (pré-teste) determinada pelo padrão ouro, enquanto que para a hipótese alteranativa a mesma relação é diferente."

¹ O padrão ouro será substituído pelo nome método de referência, uma vez que padrão ouro significa aquele método que é capaz de reproduzir a doença – no presente caso, a prova biológica. Método de referência, neste contexto, indica o método que é capaz de causar a infecção viral na célula pelo isolamento do vírus.

Figura 2.1: Ilustração da leitura realizada em microscópio de fluorescência e a gradação da quantificação do número de cruzes atribuídos a cada campo; A=0 (0%); b=1+ (25%); C=2+ (50%); D=3+(75%) e E=4+ (100%), aumento de 160 vezes.

Fonte: Célula McCoy inoculada com vírus cepa CVS (Challenge Street Virus)

SUMMARY

VALIDATION OF A NEW RABIES VIRUS ISOLATION METHOD

The validation study was carried out with a random sample of bats captured in the Mata Atlântica that assessed in terms of the presence of the rabies virus in two cell cultures for the isolation of the virus. The results were compared in terms of indices to evaluate the validity of the new method. The indices were: Sensitivity, Specificity, Positive and Negative Predictive Values and Accuracy for both methods. The estimates obtained were compared using methods for the *Receiving Operational Curves (ROC)*; the exploratory graphic analysis to check any bias used the Bland & Altman technique and linearity between the two methods was carried out with the use of Passing-Bablok technique. The determination of the value of cut off level for the diagnostic test and the probability of the region being an area free or not free disease were also obtained. It was observed that the isolation of the rabies virus in the two cellular lineages presented different prevalence (6,6 % and 15,12 %) and the alternative method (McCoy cell) showed 100 % Sensitivity and Specificity and the reference method presented 5,9 % Sensitivity and 94 % Specificity in the confrontation of both methodologies through ROC curve computational analysis. However, when analysed individually, the reference method proved numerically superior in 25,0 % Sensitivity and 71,4 % Specificity, while the McCoy cell presented 16,6 % and 75,2 % Sensitivity and Specificity respectively. The study showed that there is a correlation of rabies virus isolation for both cells. Nevertheless, the hypothesis test used for the verification of the epidemicity of the region showed the alternative method (McCoy cell) presented more discriminatory capacity for the presence of the rabies virus, as well as the possibility of region being or not free of the disease.

RESUMO

VALIDAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO DE ISOLAMENTO DE VÍRUS RÁBICO

O estudo de validação foi realizado com uma amostra aleatória de morcegos capturados na Mata Atlântica, avaliada quanto à presença do vírus rábico por dois sistemas de cultivos celulares para o isolamento de vírus, cujos resultados foram comparados por meio de algumas medidas indicadoras. Os indicadores para estimar a validade do novo método foram: sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, e acurácia. As estimativas obtidas foram comparadas pelos seguintes métodos: *Receiving Operational Characteristics (ROC)*; análise gráfica exploratória pela técnica de Bland & Altman, para verificar algum viés; e técnica de Passing-Bablok, para estabelecer a linearidade entre os dois métodos e determinar o valor de nível de corte para o teste de diagnóstico, e a probabilidade de a região ser uma área livre da doença ou não. Nas duas linhagens celulares, o isolamento do vírus rábico apresentou proporções diferentes (6,6% e 15,12%). O método alternativo (célula McCoy) apresentou valores de sensibilidade e de especificidade iguais a 100%, enquanto que o método de referência apresentou valores de 5,9% para sensibilidade, e de 94,0% para especificidade, quando confrontados na análise computacional pelas curvas ROC. Porém, quando avaliados individualmente, o método de referência apresentou superioridade numérica, com valores de 25,0% para sensibilidade, e de 71,4% para especificidade, enquanto que o método alternativo teve valores de 16,6% e de 75,2%, para sensibilidade e especificidade, respectivamente. O estudo demonstrou correlação entre ambos os métodos para o isolamento do vírus rábico. No entanto, o teste de hipótese - aplicado para verificar a endemidade da região - mostrou que o método alternativo (célula McCoy) foi mais eficaz para discriminar a presença do vírus rábico, bem como para estabelecer a possibilidade de a região não estar livre da doença.

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 AS CÉLULAS

Os primeiros isolamentos de vírus rábico em células de linhagem de tecidos de origem não nervosa foram realizados por KISSLING (1958), ATANASIU *et al.* (1963) e WIKTOR *et al.* (1964; 1972). Como objetivavam produzir vacinas a partir das células de cultivo, as células mais usadas e estudadas foram as células homólogas diplóides humanas WI-38 e as células heterólogas poliplóides, como as células HAK, BHK e Vero (ATANASIU *et al.*, 1985; MONTAGNON *et al.*, 1984).

Por outro lado, as células de neuroblastoma murino oriundas de diferentes clones foram introduzidas para o isolamento do vírus rábico (WEBSTER, 1976; 1987; SMITH, 1978; SMITH, 1980; RUDD, 1987), bem como para o estudo da patogenia da raiva (TSIANG e SUPERTI, 1985; TSIANG, 1985). As células de cultivo também foram empregadas para produzir kits a serem utilizados em sorologia (PERRIN e SUREAU, 1986).

Os peritos da OMS preconizavam a inoculação do vírus rábico em camundongos jovens – de até 21 dias de idade - chamada prova biológica (HABEL, 1973), na qual o exame de diagnóstico só é realizado *post-mortem*. Entretanto, depois de sucessivos estudos que comparavam a inoculação em camundongos e o isolamento do vírus em células de neuroblastoma murino, tais peritos admitiram que esse último método pode ser utilizado para diagnosticar a doença, conforme a metodologia descrita nos manuais de técnicas laboratoriais para raiva (BOURHY e SUREAU, 1991; SMITH, 1992).

Em 1982, NOGUEIRA obteve os primeiros resultados de isolamento do vírus rábico em células McCoy que, segundo FERNANDES (1959a; 1959b), são células origem não nervosa de características epitelióides originária de sinóvia humana. Posteriormente a célula McCoy foi descrita como de origem de fibroblasto de camundongo, em decorrência de contaminação casual em laboratório. Assim, atualmente a American Type Culture Collection CRL 1696 (ATCC, 1995) considera as duas características genéticas.

Em estudos nos quais comparou os resultados obtidos com a titulação em camundongos e a titulação com células McCoy - cálculo do *end point* -, NOGUEIRA (1992a; 1992b) demonstrou a replicação do vírus rábico nessas células, e o seu possível uso para a titulação do vírus rábico .

As células McCoy apresentam características de grande sensibilidade para o isolamento do vírus rábico. NOGUEIRA (1998) descreve o isolamento do vírus rábico no líquido de paciente suspeito de raiva com o auxílio desse método; posteriormente, foi comprovado que esse caso era efetivamente de raiva humana, após longo período sem a ocorrência de raiva autóctone no Estado de São Paulo (<http://www.datasus.gov.br>).

O isolamento do vírus rábico em líquido demonstra a capacidade da célula McCoy no isolamento desse vírus mesmo em baixas concentrações - baixa carga viral -, o que faz desse método uma ferramenta de grande utilidade no estudo a circulação do vírus rábico em reservatórios naturais e silvestres.

Devemos lembrar, entretanto que, apesar de sua eficácia, o método de isolamento do vírus da raiva com a célula McCoy ainda não foi validado para ser utilizado em laboratórios de diagnóstico da doença.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GERAL

Esta parte do trabalho destinou-se a estudar a validação do método de isolamento do vírus rábico em células McCoy, comparando os resultados obtidos com esse método àqueles obtidos com o método que se vale das células N2A (neuroblastoma murino).

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o nosso objetivo geral, é necessário atender a cinco objetivos específicos, a saber:

- Avaliar a sensibilidade e a especificidade do novo método em relação ao método de referência.
- Estimar o ponto de corte para definir o resultado considerado positivo (presença de vírus rábico).
- Estimar a concordância entre os dois métodos.
- Estimar os valores preditivos positivos e negativos do novo método.
- Estimar a correlação de prevalência observada (pós-teste) e prevalência esperada (pré-teste).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Conforme GRENIER e GARDNER (2000a), a aplicação de testes de diagnóstico em estudos epidemiológicos ou *screening* de alguma doença exige o estabelecimento de:

3. **UNIDADE DE ANÁLISE** – a unidade de análise, no presente estudo, é o inóculo obtido do cérebro de cada morcego capturado, conforme apresentado na SEÇÃO 3 (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3).
4. **AMOSTRAGEM** - o cálculo da amostra foi baseado nos erros tipos I e II e na prevalência da doença, conforme fórmula apresentada adiante.
5. **REVISÃO DA PREVALÊNCIA** - a prevalência, neste trabalho, foi estabelecida como a prevalência *a priori* obtida em estudos realizados com células de neuroblastoma murino no isolamento do vírus rábico, cujos resultados foram 10 vezes superiores àqueles obtidos quando do isolamento desse vírus pela inoculação em camundongos (SMITH, 1990).

Embora sabendo que a prevalência da raiva em morcegos varia de 1% a 3 % - dependendo da endemicidade da região -, partiu-se do princípio de que 10% é a prevalência esperada no isolamento do vírus rábico com células de neuroblastoma murino (CORTES, 1994; NILSON e SUGAY, 1966).

2.3.1 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com LWANGA e LEMERSHOW (1991), considerando o Intervalo de Confiança como procedimento estatístico para avaliar a confiabilidade dos resultados obtidos. Segundo os autores, nesse teste, conhecendo o erro aceitável e a prevalência esperada é possível calcular o tamanho mínimo da amostra aplicando a fórmula:

$$n = \frac{z^2 \cdot P \cdot d}{d^2}$$

onde: P = prevalência = 10% d = distância (erro) = 0,05

z = z crítico para $\alpha = 5\% = 1,96$

Essa fórmula indicou que a amostra deveria ter o número mínimo de 138 morcegos, que foram capturados aleatoriamente. Após exclusões e perdas, restaram os 120 animais estudados no presente trabalho. A diminuição de 10% não afetou a validade estatística dos resultados obtidos.

2.3.2 VARIÁVEL DE ESTUDO

- **presença de focos fluorescentes** na imunofluorescência direta (IFD), com positividade para a raiva.

2.3.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Os procedimentos laboratoriais seguiram as normas técnicas preconizadas pelo *Center for Diseases Control and Prevention* (SMITH *et al.*, 1984).

2.3.3.1 PREPARO DO MATERIAL A SER ANALISADO

O preparo do material compreendeu várias etapas. Inicialmente, os cérebros dos animais foram retirados e homogeneizados em meio de Eagle sem soro, contendo antibiótico e fungicida (na proporção de 2% de tecido cerebral). Os produtos foram colocados em tubos identificados apenas com códigos numéricos, para que a pesquisa de vírus fosse realizada nas condições de teste cego.

Posteriormente, esse material foi congelado e descongelado por três vezes. Os tubos só foram descongelados para a pesquisa de isolamento de vírus, que foi realizada inoculando a suspensão cerebral nas culturas de células McCoy e de células de neuroblastoma murino, cultivadas em garrafas para cultivo celular (25cm² de área).

2.3.3.2 ORIGEM DAS CÉLULAS

Células N2A: provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro. Essas células foram mantidas em meio de crescimento RPMI suplementado com 10% de soro fetal + antibiótico e fungicida.

Células McCoy: provenientes da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz. As células foram mantidas em meio de crescimento de Eagle suplementado com 5% de soro fetal bovino, além do antibiótico e do fungicida (NOGUEIRA, 1992a; 1992b; 1998).

2.3.3.3 TÉCNICAS DE LEITURA DO MATERIAL ESTUDADO

Após a inoculação da suspensão cerebral em cada um dos tipos de células - N2A e McCoy -, foram realizadas leituras diárias das células para observação da presença de efeito citopático (ECP) nas culturas celulares. Em seguida, as células foram congeladas e descongeladas, e o fluido celular foi filtrado em membrana clarificante (tipo AP 100 da Millipore).

Nova passagem foi então realizada nos dois tipos de cultivos celulares. Essa nova passagem foi feita em microplacas de 96wells - às quais foram adicionados 0,25μ de suspensão celular + 0,25μ do inóculo filtrado + 0,50μ de meios antibióticos -, incubadas em estufa com 5% de CO₂ durante 48 horas.

Transcorridas 48 horas da segunda inoculação, as microplacas foram preparadas para a reação de imunofluorescência. Essa preparação seguiu o procedimento convencional de fixação do tapete celular com solução de ácido acético, água e álcool (10:70:20vol/vol); a seguir adicionava-se uma gota de soro anti-rábico conjugado com fluoresceína, deixando o preparado sob reação durante 30 minutos à temperatura de 37°C, realizavam-se lavagens com solução salina tamponada e água e, após a completa secagem das placas realizava-se a leitura das mesmas em microscópio invertido (IM-35 Zeiss), para observar os focos fluorescentes. A reação de imunofluorescência direta identifica a presença do vírus rábico.

A leitura foi realizada de acordo com uma ordenação baseada na quantidade de focos fluorescentes observados no campo do microscópio, que variava de nenhum foco funcional³ presente à presença de focos - que representavam a quantidade de células infectadas - representados numa escala que ia de uma cruz (1+) a quatro cruzeiras (4+). A Figura 2.1 exemplifica a natureza dessa ordenação.

³ Foco funcional é o foco fluorescente que representa a estrutura viral, ou seja, que corresponda ao corpúsculo com presença do antígeno viral, e não apenas um foco fluorescente qualquer, que seja apenas artefato técnico.

2.3.3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise relativa ao isolamento do vírus rábico foi baseada na presença de foco viral imunofluorescente nas diferentes culturas celulares. A comparação entre os dois métodos foi feita por diferentes procedimentos estatísticos.

Primeiramente foram realizadas análises exploratórias gráficas das frequências – histogramas –, para verificar os tipos de distribuição: paramétrica (normal) ou não paramétrica, além da comparação entre médias, desvios padrão, variâncias etc.

Em seguida foram empregados os procedimentos estatísticos sugeridos por GREINIER e GARDNER (2000), recomendados e aplicados em estudos de validação para testes de diagnóstico.

O banco de dados utilizado foi o mesmo construído para o estudo de prevalência (SEÇÃO 3), gravado como (Epi6:\Tese.rec) no programa Epi-Info versão 6.04 (DEAN, 1994). A única variável utilizada - tanto para as células de N2A como para as células McCoy -, foi a **variável infectividade**.

Além dos aplicativos do Epi-Info versão 6.04 - com banco de dados gravado como (Epi6:\Tese.rec) -, foram utilizados outros programas e aplicativos para os demais procedimentos estatísticos realizadas no presente estudo, como:

3. Pacote estatístico comercial Medcalc (FRANK SCHOOJANS, 1993- 1998);
4. Programa Computer Assistent Mixture Analysis – CAMAN – (BÖHNING *et al.*, 1997), para avaliar o ponto de corte intrínseco (*intrinsic cut-off*).
5. Programa Freecalc, calculadora epidemiológica (CAMERON, 1997), utilizado na análise do teste de hipótese, para verificar se a região de estudo era ou não endêmica.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2.1 mostra os valores estatísticos sumários observados nas células N2A e McCoy.

Tabela 2.1 – Número de isolamentos obtidos com os dois tipos de células de cultivo (N2A e McCoy) , média, intervalo de confiança, desvio padrão e valores máximos e mínimos

<i>Células</i>	Média Aritmética	Intervalo de Confiança	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
N2A (120)	11,33	8,33 – 14,33	16,66	76,00	1,00
McCo (119)*	14,44	10,7 – 18,12	20,27	76,00	1,00

* Como houve perda de um isolamento realizado nas células McCoy, a análise comparativa dos resultados será realizada com o n=119 para os dois tipos de cultivo.

As Figuras 2.2 e 2.3 mostram as frequências de morcegos infectados nos diferentes níveis de ordenamento observados à reação de imunofluorescência. Nessas duas figuras também foi

introduzida a divisão entre os dois primeiros valores (0) e (1+) e os seguintes (2+) e (3+), representada pela mudança de cores – entre o azul e o vermelho. Essa divisão foi adotada para estabelecer a diferença entre o resultado de teste positivo (T+) igual a 1+, e os resultados positivos cujos valores implicam diagnóstico positivo para a doença, correspondentes a 2+, 3+ ou mais. Tal divisão corresponde ao nível de corte (*cut off*), ou seja, ao valor que separa a população em doentes e não doentes, representado pela zona cinza entre as duas subpopulações.

Figura 2.2 - Frequências de morcegos infectados e não infectados, nos diferentes níveis de ordenamento observados à reação de imunofluorescência, em cultura de células N2A.

Figura 2.3 - Frequências de morcegos infectados e não infectados, nos diferentes níveis de ordenamento observados à reação de imunofluorescência, em cultura de células McCoy.

Na zona cinza encontram-se os valores falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN), e nos extremos os valores verdadeiros positivos (VP) e verdadeiros negativos (VN). Essas figuras sugerem o quanto são intuitivas as definições para doença e não doença em testes de diagnóstico.

Assim, e considerando a relevância dos conceitos mencionados, é necessário ter critérios bem definidos para validar um novo teste de diagnóstico, razão pela qual aplicamos outros procedimentos estatísticos no presente trabalho.

O teste de Wilcoxon - com o *valor de* $p < 0,01$ - foi realizado para avaliar as diferenças entre as médias dos dois grupos - sistemas celulares N2A e McCoy -, e apontou número de diferenças positivas igual a 17, e número de diferença negativas igual a zero (teste emparelhado).

O coeficiente de *Spearman* mostrou o seguinte índice de correlação entre os resultados obtidos com os dois sistemas celulares: $r = 0,446$ e $p \leq 0,0001$, e Intervalo de Confiança de 95% (0,2889 - 0,5793).

A análise gráfica de BLAND e ALTMAN (1986) mostrou a existência de viés quando foram selecionados apenas os resultados positivos (Figura 2.4). Por outro lado, quando foram analisados os resultados negativos, o viés praticamente desapareceu (Figura 2.5). Neste caso, os valores resultantes das diferenças entre as médias das células McCoy e N2A estão ao redor da média, que se aproxima de zero (média=-2,8), e dentro do intervalo dos valores dos dois desvios padrão, denominado limite de tolerância. Ainda assim, há dois pontos que estão fora (*otliers*) do intervalo (Figura 2.5). De acordo com BLAND e ALTMAN (1986), o pressuposto dessa análise gráfica é o seguinte:

Quando a diferença entre as médias estiver ao redor de zero e dentro dos valores dos limites dos desvios-padrão superior e inferior, os testes avaliados são considerados equivalentes.

Figura 2.4 - Análise exploratória para verificar viés, segundo a técnica de Bland e Altman (1986). Diferenças entre as médias dos dois métodos em relação à análise dos casos positivos observados nas células McCoy.

O viés observado é representado pela diferença entre as médias, que está ao redor de 40. Esse viés pode ser decorrente das diferenças entre os resultados falsos positivos e falsos negativos observados em cada sistema celular, da introdução de um erro sistemático de observação na leitura dos resultados, ou de características da própria técnica de BLAND e ALTMAN (1986) – que se comporta melhor com amostras cuja distribuição é normal, o que não é o caso da amostra do presente estudo, cuja distribuição não é normal.

O resultado será considerado sem viés quando o valor da diferença entre as médias estiver ao redor de zero.

Figura 2.5 - Análise exploratória para verificar viés, segundo a técnica de Bland e Altman (1986). Diferenças entre as médias dos dois métodos em relação à análise dos casos negativos observados nas células McCoy.

Os erros sistemáticos nos estudos de prevalência, *odds-ratio*, são atribuídos a possíveis confusões nas estimativas de sensibilidade e de especificidade, justamente os fatores que influenciam os resultados considerados falsos positivos ou falsos negativos que, por sua vez, são influenciados pelas medidas ou avaliações de resultados do método empregado (GREINER e GARDNER, 2000a). No presente estudo, por exemplo, o método final de leitura para o isolamento do vírus rábico nos dois sistemas celulares foi a imunofluorescência, que pode apresentar resultados ordenados e classificados em (0), (+), (++), (+++) e (++++). Esse método contempla leitura ao microscópio, com valores correspondentes aos percentis 0%, 25%, 50%, 75% e 100% do campo visual do microscópio.

O valor igual a 1+ pode ser considerado de latência, ou seja, um estágio de pré-infecção, que pode ou não evoluir para doença, dependendo do estado biológico do indivíduo. Esse resultado, no momento da leitura, não significa positividade (doença), mas indica que o indivíduo está infectado. Na análise estatística, esse fator pode promover a introdução de um erro sistemático, dependendo da quantidade de indivíduos com esse *status*, ou da sensibilidade do teste de diagnóstico - que identificará essa situação em maior ou menor escala. Assim, se o teste utilizado tiver menor sensibilidade, pode ocorrer maior número de falsos negativos.

GREINER e GARDNER (2000a) sugerem que a avaliação da linearidade dos resultados seja feita pela técnica de PASSING-BABLOK (1983). Essa técnica é uma regressão que avalia a existência ou não de linearidade entre as células McCoy e N2A, e é aplicável a amostras com distribuição assimétrica.

A figura 2.6 mostra o resultado obtido. A análise computacional (*output*) consta em Apêndices.

Figura 2.6 - Gráfico de regressão para avaliar a linearidade entre os dois métodos, segundo Passing-Bablok (1983).

A interpretação dos resultados depende da análise da equação de regressão a seguir apresentada:

$$Y = -1,0000 + 2,0000X$$

$$\text{Intercepto A} = -1,0000 \quad \text{I.C.: } -2,0000 - 0,0000$$

$$\text{Inclinação da reta} = 2,0000 \quad \text{I. C.: } 1,0000 - 3,0000$$

Essa expressão é entendida da seguinte forma: se o **Intervalo de Confiança (I.C.) do intercepto A** pode ser usado para o teste de hipótese onde:

H0: os dois métodos são iguais

HA: os dois métodos são diferentes

Segundo a técnica de PASSING-BABLOK (1983), o resultado da reta de regressão é avaliado na forma de um teste de hipótese onde:

A = -1,000; a hipótese é aceita, se o I.C. contiver o 0

No caso do **valor da inclinação da reta, o Intervalo de confiança de B** pode ser usado novamente como um teste de hipótese:

H0: os dois métodos apresentam a mesma linearidade

HA: os dois métodos apresentam linearidade diferentes.

Para aceitar H_0 é necessário que o valor de B e o I.C. contenham o 1 ($B=1$). Se o valor de B for diferente de 1, então rejeita-se H_0 e aceita-se H_A . Esse resultado indica que há linearidade mas que ela é proporcionalmente diferente, pois se $p<0,01$, esse valor define o desvio da linearidade.

B= 2,000 I.C.(1,000 - 3,000)

Segundo FLETCHER (1996), as curvas *ROC (Receiving Operator Characteristics)* são valiosas para comparar testes alternativos para um determinado método de diagnóstico. Outros autores (ZWEIG e CAMPBELL, 1993) introduziram essa técnica para melhor estabelecer o ponto de corte para o diagnóstico de doenças em exames laboratoriais.

As curvas *ROC* são construídas em um gráfico no qual as taxas de verdadeiros positivos (sensibilidade) são colocadas no eixo y, e as taxas de falsos positivos (especificidade) são colocadas no eixo x. Os valores obtidos terão probabilidade de 0 a 1,0 ou de 0 a 100%. A curva de melhor ajuste será aquela mais próxima ao canto esquerdo do gráfico. A acurácia é representada pela área abaixo da curva; assim, quanto maior a área abaixo da curva, melhor será a acurácia.

As Figuras 2.7 e 2.8 representam graficamente, pela técnica das curvas *ROC*, os valores da sensibilidade e especificidade das células N2A e McCoy, quando o **ponto de corte é igual ou maior que 26%** de focos fluorescentes visualizados no campo do microscópio.

Conforme é possível observar, ambas as células apresentaram valores de sensibilidade e de especificidade iguais a 100%. O critério ≥ 26 determina que houve isolamento e que o animal apresenta a infecção, mas não está doente. Assim, embora acuse a presença do vírus no animal, não é um diagnóstico positivo para a raiva. Os percentuais correspondentes a essa situação variaram a cada colheita, o que demonstra que o vírus circula no reservatório silvestre.

Todavia, quando elevamos o ponto de corte para o critério maior e/ou igual a 50%, e ao comparar os dois grupos celulares no mesmo gráfico, observa-se que as células McCoy apresentam valor de sensibilidade maior que aquele das células N2A, embora os valores de especificidade tenham sido mantidos em 100% para ambas (Figura 2.9).

A

B

Figura 2.7. Célula N2A. (A) Representação da curva ROC com todos os possíveis valores da Sensibilidade e (100-Especificidade), cujo valor do ponto de corte $\geq 26\%$ tanto a Sensibilidade como a Especificidade apresentam-se igual a 100% . (B) Ponto de corte separa perfeitamente os valores positivos (diagnóstico= 1) dos negativos (diagnóstico= 0).

A

B

Figura 2.8 Célula McCoy) Representação da curva ROC com todos os possíveis valores da Sensibilidade e (100-Especificidade), cujo valor do ponto de corte $\geq 26\%$ tanto a Sensibilidade como a Especificidade apresentam-se igual a 100% . (B) Ponto de corte separa perfeitamente os valores positivos (diagnóstico= 1) dos negativos (diagnóstico= 0).

Figura 2.9 - Representação da curva ROC para os dois métodos (células McCoy e N2A).

Há que se ressaltar, no entanto que, quando os grupos celulares foram avaliados separadamente, e com o mesmo critério de corte, o valor de sensibilidade das células N2A foi igual a 25,0%, superior ao valor das células McCoy, cujo valor de sensibilidade foi igual a 16,6%. Essa diferença de valor numérico indica que, embora ambos os grupos celulares sejam eficazes no isolamento do vírus rábico, as células McCoy têm maior capacidade para detectar resultados falsos negativos (2+) para a infecção que as célula N2A, conforme se constata na Tabela 2 x 2 a seguir apresentada.

N2A				McCoy			
	+	-			+	-	
+	2	32	34		3	25	28
-	6	80	86		15	76	91
	8	112	120		18	101	119
S = 25,0%				S = 16,6%			
E = 71,4%				E = 75,2%			
VP+ = 5,8%				VP+ = 10,7%			
VP- = 93,0%				VP- = 83,5%			

S (Sensibilidade), E (Especificidade), VP+ (Valor Preditivo +), e VP- (Valor Preditivo -).

Como é possível observar, os Valores Preditivos Positivos são baixos para ambas as células. O Valor Preditivo Positivo indica a possibilidade de o animal ficar doente após o resultado positivo do teste. Isso parece ser verdadeiro no presente caso.

Resultados otimizados de acordo com as Figuras 2.7 e 2.8

N2A			McCoy				
	+	-		+	-		
+	2	0	2	+	3	0	3
-	6	112	118	-	15	101	116
	8	112	120		18	101	119
S = 25,0%			S = 16,7%				
E = 100,0%			E = 100,0%				
VP+ = 100,0%			VP+ = 100,0%				
VP- = 94,9%			VP- = 87,7%				

Para nível de corte $\geq 50\%$

Mas, quando se confrontam os valores de sensibilidade e de especificidade utilizando como critério os resultados positivos e negativos atribuídos às células McCoy, os valores de sensibilidade e de especificidade de ambos os grupos celulares modificam-se completamente, conforme se observa na figura 2.9. A sensibilidade e a especificidade das célula McCoy apresentam valores de 100%, enquanto que as células N2A apresentam valor de sensibilidade igual a 5,8%, e de especificidade igual a 98,5%.

Nesse caso, a otimização considera todos os valores com 2+ como verdadeiros casos positivos, eliminando os casos falsos negativos considerados no critério individual. Já os casos avaliados como 1+ são considerados negativos ao serem confrontados com os valores positivos e negativos observados nas células N2A).

Ajustes dos estimadores de Sensibilidade e Especificidade

N2A			McCoy				
	+	-		+	-		
+	1	6	7	+	18	0	18
-	16	96	118	-	0	101	101
	17	102	119		18	101	119
S = 5,9%			S = 100,0%				
E = 94,0%			E = 100,0%				
VP+ = 14,2%			VP+ = 100,0%				
VP- = 86,6%			VP- = 100,0%				

O teste de hipótese foi realizado com o programa *Freecalc* (CAMERON, 1997). Esse programa é uma calculadora epidemiológica que avalia - por meio de um teste de hipótese - se uma região é endêmica ou não endêmica, ou seja, se é uma região livre da doença ou a doença está presente. O teste de hipótese leva em consideração a prevalência baseada na sensibilidade e na especificidade do teste.

H0: região livre de doença (não endêmica)	HA: região
apresenta a doença (endêmica)	

No presente trabalho, o teste de hipótese apresentou os seguintes resultados:

Célula N2A: $H_0 = 0,022591$ $H_A = 0,994838$

Célula McCoy: $H_0 = 0,967868$ $H_A = 0,000001$

que foram assim interpretados:

<u>A hipótese nula é: Prevalência $\geq p$</u>
--

A hipótese alternativa é: Prevalência $< p$
--

Em uma distribuição binomial simples

erro alfa = 0,05% e erro beta = 0,10%
--

p = prevalência estimada

p(N2A) = 0,0168 e p(McCoy) = 0,0216

Células N2A - De acordo com o resultado, é adequado **rejeitar a hipótese nula** e concluir que a população é livre da doença, nas condições preditas em que a prevalência é igual a 1% e o Intervalo de Confiança é de pelo menos 97,74%.

Células McCoy - De acordo com o resultado, não é adequado concluir que a população não seja livre da doença com a prevalência esperada mínima igual a 1%, pois o Intervalo de Confiança foi de 3,21%. Então **aceita-se H_0** e deve-se concluir que a população pode ter doença, quando o Intervalo de Confiança tiver o valor de 100%. **Então a população pode estar numa área endêmica.**

A leitura desses resultados demonstra que a amostra populacional estudada - albergada numa região de mata conservada – manifestou-se, em um dos métodos (células N2A), como livre da doença, mas com o vírus circulando numa prevalência ao redor de 1%. Esse era o resultado esperado quando se considera que a premissa era de que a população amostral era sadia.

Já o método alternativo (células McCoy) apresentou resultado oposto à premissa esperada. Essa constatação, aparentemente contraditória, revela outro aspecto importante: apesar de a população amostral estar albergada em uma região silvestre e de mata conservada, as fazendas vizinhas podem manter gado bovino acometido pela raiva. A região é considerada como área endêmica para a raiva, segundo os Escritórios de Defesa Animal e Agropecuária do Estado de São Paulo (KOTAIT, 2000), como se observa nos mapas no Anexo 1.

É muito difícil discutir tais resultados apenas à luz dos valores dos resultados falsos negativos e falsos positivos, que foram diferentes em cada um dos métodos. Esses resultados podem ser avaliados como erro sistemático apenas. Mas restam as perguntas: Qual a importância dos resultados falsos negativos e falsos positivos? O que eles podem significar?

Para GREINER e GARDNER (2000a), sensibilidade e especificidade são subpopulações cujos valores específicos são informações estimadas apenas pela observação epidemiológica. As incertezas a respeito dos parâmetros devem-se à falta de conhecimento, à inabilidade de processar

as informações do banco de dados, e à própria falta de conhecimento sobre a subpopulação de estudo. Esses são os fatores que influenciam a sensibilidade e a especificidade na validação de testes de diagnóstico aplicados a uma população alvo.

Os estimadores de prevalência que não contenham vícios e que expressem a qualidade da verdade do parâmetro e a precisão requerem a definição do limite de tolerância para estabelecer o nível de discriminação das subpopulações entre o *status* de verdadeira doença ou a condição de latência. Esse procedimento envolve a seleção de um valor intrínseco do nível de corte (*cut off*).

Quando for necessário tomar a decisão sobre um diagnóstico, o valor do nível de corte tem que ser introduzido; assim, os resultados do teste podem ser definidos em teste (+) e teste (-). Como já foi dito anteriormente, o nível de corte é um valor arbitrário que reflete o peso relativo da sensibilidade e da especificidade (SOMOZA, 1989).

É comum determinar o valor do nível de corte adicionando-se 2 ou 3 desvios padrão ao valor médio das reações do teste (-) do teste de referência (RICHARDSON, 1983). Esse valor é crítico, e depende do tamanho da amostra da população alvo, que deve ser suficientemente grande para possibilitar maior consistência estatística (poder do teste).

No entanto, é muito difícil garantir a correta estimativa do parâmetro em amostras desenhadas para inquéritos tipo *screening* de doenças infecciosas, uma vez que tem-se como garantido que controles obtidos em regiões não endêmicas são livres de doença. Por outro lado, resultados negativos em regiões endêmicas podem não representar que tais regiões estão livres da doença (VOLLER, 1977; 1985).

Assim, para determinar o valor discriminante do nível de corte, pode-se misturar uma amostra de uma população endêmica - com casos positivos conhecidos - à população alvo, realizando a análise com a ajuda de computador - utilizando programas como o *Computer Assistent Mixture Analysis* (CAMAN) -, para construir um valor de nível de corte intrínseco à amostra.

A operacionalização do CAMAN consiste em fornecer, ao programa, o banco de dados em estudo associado a outro banco de dados que contenha casos verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos conhecidos. O programa trata numericamente os resultados, e organiza duas populações. Essa é a forma de determinar o valor do nível de corte intrínseco (*intrinsic cut off*).

A representação gráfica apresentada nas Figuras 2.10a e 2.10b mostra a transposição dos resultados obtidos na análise do *cut off* intrínseco.

Na figura 2.11 são representadas duas amostras de morcegos.

Na forma de área: distribuição de todos os resultados de infectividade observados na população estudada neste trabalho, nos dois grupos celulares.

Na forma de barra: resultado obtido de uma pequena amostra (n=19) de morcegos suspeitos, submetidos a exame de raiva no Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo. Os inóculos de tecido nervoso dessa amostra foram submetidos à prova biológica (inoculação em camundongos) e a isolamento nos dois sistemas de cultivos celulares.

Quando o material suspeito (n=19), inoculado em camundongos, foi capaz de reproduzir a doença e matar pelo menos um camundongo dos seis inoculados, os casos foram considerados como verdadeiros positivos. Os casos em que nenhum camundongo

Figura 2.10 Os gráficos no formato de área correspondem a avaliação da infectividade do vírus rábico realizados nas células N2A (A) e McCoy (B). Na forma de barras, representam as re-leituras em células de uma amostra menor, a qual foi testada para o isolamento de vírus rábico com inoculação em camundongos (prova biológica).

A

B

Figura 2.11. Distribuição da infectividade na amostra de morcegos do Parque Estadual Intervales, segundo o isolamento do vírus rábico realizado em células N2A (A) e McCoy (B).

inoculado ficou doente ou morreu foram considerados como verdadeiros negativos.

Quando submetidos ao isolamento nos dois sistemas de cultivos celulares, os casos considerados verdadeiros positivos na prova biológica apresentaram os seguintes resultados à leitura na reação de imunofluorescência: células N2A - 2+ (n=3 casos); células McCoy - 2+ (n=2 casos) e 3+ (n=1 caso). Esses casos estão representados, sob a forma de barras, na Figura 2.11(a e b).

As figuras mostram nitidamente que os resultados iguais ou superiores a 2+ (50%) são aqueles considerados verdadeiros positivos na prova biológica (em que os camundongos inoculados ficaram doentes e morreram). Esse exemplo elucida e destaca a importância da escolha do valor do nível de corte em qualquer teste de diagnóstico.

As Figuras 2.11a e 2.11b correspondem às figuras anteriores (2.10a e 2.10b), porém seu desenho gráfico é diferente. A Figura 2.11b – correspondente às células McCoy – que mostra a distribuição de todos os resultados, delineia uma subpopulação na região compreendida entre 2+ e 3+ com grau de infecção superior a 50% - faixa dos casos verdadeiros positivos -, separando a população em casos verdadeiros positivos e falsos positivos. Já na Figura 2.11a essa transição não está tão delineada, não é clara a separação entre as subpopulações. O *cut-off* intrínseco importante porque possibilita a

as regiões: aquela em que estão os casos positivos (doença ou infecção pré-clínica) e aquela de não doença (sadios). Mas essa separação não é tão definida quanto o teste realizado é menos sensível

Outra forma de definir o valor do nível de corte é realizar a análise com o auxílio das curvas *ROC*. O propósito dessa análise é investigar o impacto da escolha de um determinado valor como nível de corte na prevalência estimada.

A técnica das curvas *ROC* permite escolher a melhor relação entre sensibilidade e especificidade, obtendo-se dessa maneira menor relação de perda, ou seja, o número de falsos positivos é reduzido.

GREINER *et al.* (2000) atribuem um valor utilitário às curvas *ROC*, pois elas permitem determinar a verossimilhança. Além disso, outros índices podem ser explorados pela representação gráfica do melhor valor do nível de corte, como: *YOUDEN*, eficiência, *OR (odds-ratio)*, *kappa* e o modelo logístico de regressão (LINNET, 1998).

O Quadro 2.1 apresenta as outras estimativas realizadas para os dois métodos avaliados no presente trabalho.

2.1 - Resumo dos principais indicadores estimados para o isolamento de vírus rábico nas células N2A e McCoy.

ESTIMATIVAS	N2A		MCCOY	
	OTIMIZADO (%) (I.C.)	OBSERVADO (%) (I.C.)	OTIMIZADO (%) (I.C.)	OBSERVADO (%) (I.C.)
Sensibilidade	25,0 (4,5 - 64,4)	25,00 (4,50 - 64,4)	16,6 (4,4 - 42,3)	16,6 (4,4 - 42,3)
Especificidade	100,0 (95,9 - 100,0)	71,4 (62,0 - 79,4)	100,0 (95,4 - 100,0)	75,2 (65,5 - 83,1)
Valor Preditivo +	100,0 (99,8 - 100,0)	5,9 (1,0 - 21,1)	100,0 (31,0 - 100,0)	10,7 (2,8 - 29,4)
Valor Preditivo -	94,9 (89,2 - 98,1)	93 (84,9 - 97,1)	87,7 (79,6 - 92,67)	83,5 (73,9 - 90,2)
Razão MV +	/0*	89,2 (79,8 - 97,7)	/0*	66,0 (43,5 - 82,0)
Razão MV-	75,0 (65,1 - 82,9)	-	83,0 (74,9 - 89,8)	-
Prevalência real	6,6 (2,9 - 12,7)	6,6 (2,9 - 12,7)	15,12 (9,2 - 22,8)	15,12 (9,2 - 22,8)
Prevalência estimada	1,68 (0,3 - 5,9)	28,3 (25,0 - 44,0)	2,5 (0,5 - 7,2)	23,5 (19,0 - 37,0)
Prevalência corrigida	6,7 (3,0 - 14,0)	6,1 (4,3 - 7,6)	0,9 (0,7 - 1,0)	1,5 (1,4 - 1,6)
Acurácia	98,2 (93,8 - 99,8)	68,3 (59,1 - 76,3)	97,1 (91,8 - 99,4)	66,4 (57,1 - 74,8)
Índice de Youden	19,91	-3,6	16,66	-8,4

* não determinado divisão por zero

Os cálculos apresentados no Quadro 2.1 foram realizados de acordo com as fórmulas apresentadas no Anexo 2; os significados de cada índice medido encontram-se no glossário.

Os resultados do Quadro 2.1 confirmam o estudo de validação da metodologia para isolamento de vírus rábico utilizando células McCoy, demonstram a equivalência entre os dois métodos (N2A e McCoy). Não se observam valores tão diferentes que possam comprometer a validação do uso da célula McCoy.

A maior diferença de valores ocorre entre os indicadores relativos à sensibilidade. Como mencionado anteriormente, a sensibilidade pode sofrer influências da cepa, de eventual reação cruzada ou do estágio da doença (CULLOR, 1994).

2.4.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Para GREINER e GARDNER (2000a), a aplicação de testes de diagnóstico em estudos epidemiológicos inclui a vigilância, o monitoramento ou inquérito (*screening*) sobre alguma doença, e a possibilidade de estudar a prevalência ou os fatores de risco dessas doença.

Nesse mesmo artigo, os autores discutem aspectos relativos aos métodos estatísticos utilizados e às interpretações dos resultados. As limitações decorrentes das imperfeições dos

métodos e dos testes impõem que ajustes sejam implementados para corrigir erros de resultados, superestimados ou subestimados.

Assim, dependendo do propósito ou dos objetivos do estudo, são condições básicas estabelecer: a unidade de análise, a amostragem, a revisão da prevalência, a incidência, os valores médios e o *odds-ratio*.

Outras importantes medidas a serem tomadas quando da análise das informações – a fim de evitar problemas – são avaliar adequadamente os custos e benefícios dos resultados positivos, negativos, falsos positivos e falsos negativos de uma determinada população, e evitar inferências, pois é necessário saber se o teste foi aplicado em uma população endêmica ou não, ou ainda se essa população era vacinada ou não.

Também o processamento dos dados também pode provocar erros. Assim, é necessário classificar adequadamente a variável: aleatória ou não, quantitativa ou qualitativa etc.

Existem ainda os erros decorrentes de resultados obtidos de títulos (*end point*). A própria maneira de definir o título em dose resposta de 50%, dado que o título não é definido pela menor diluição, pode levar à produção de resultados negativos, cujo valor real não é necessariamente 0, ou verdadeiros negativos (-); esses valores podem provocar um viés na interpretação dos resultados, pois a doença pode estar em estado de latência. Também existe a possibilidade de que um valor não observado, também chamado de *missing value*, interfira na correta interpretação do resultado final. As considerações até aqui expostas demonstram que a interpretação e a validação de testes diagnósticos não são tarefa simples.

Os dois métodos por nós estudados apresentaram a mesma capacidade de isolamento do vírus, mas o método alternativo (células McCoy) apresentou uma utilidade a mais, pois demonstrou maior capacidade de identificar falsos negativos, que passaram a ser interpretados como verdadeiros positivos na análise das curvas ROC. Assim, com a otimização dos resultados realizada pelo computador, as células McCoy apresentaram valores de 100% para sensibilidade e especificidade, sendo considerada um **teste perfeito**, cujo valor de **prevalência é verdadeiro**. No caso de se realizar o teste de hipótese utilizando os **valores observados**, a discriminação da área endêmica não ocorreu. Desta forma, os resultados otimizados, quando determinados pela análise computacional, podem fornecer pistas sobre o que pode estar ocorrendo com a presença do vírus no reservatório natural.

Assim sendo, o método alternativo mostrou-se útil para a vigilância epidemiológica pois apresentou a possibilidade de discriminar uma região endêmica, o que é fundamental quando considerados os prejuízos econômicos e a letalidade da raiva. Essa capacidade de discriminação é poderosa para muitas ações de caráter epidemiológico.

Os resultados obtidos ainda permitem a realização de outras análises: a confiabilidade pode ser investigada pelo método de *kappa ponderado* para avaliar a **reprodutibilidade**, e o modelo logístico pode ser examinado para avaliar quais variáveis epidemiológicas influem mais na circulação do vírus. Essas análises, entretanto, não serão objeto desta tese, mas serão trabalhadas para futuras publicações em periódicos especializados.

2.5 CONCLUSÕES

Considerando as informações constantes da literatura e os resultados obtidos no presente estudo, foi-nos possível concluir que:

a célula McCoy tem possibilidade de substituir eficientemente a célula de neuroblastoma murino N2A para o isolamento de vírus rábico.

6. a célula McCoy pode discriminar uma subpopulação de morcegos, apresentando prevalência própria para regiões endêmicas. Esse resultado foi reforçado com o teste de hipótese, que demonstrou que a região do Parque Estadual Intervales (Mata Atlântica) não está livre da doença, e pela informações dos Escritórios de Defesa Animal (constante do Anexo 1).
7. essa capacidade de discriminação da célula McCoy é útil para a vigilância epidemiológica do vírus da raiva.
8. a célula McCoy também pode ser utilizada para o diagnóstico da doença, desde que se determine um valor elevado para o nível de corte do resultado positivo.
9. o Valor Preditivo Positivo da célula McCoy foi seis vezes maior que o Valor Preditivo Positivo da célula N2A.
10. a análise computacional das curvas ROC demonstrou que o método que emprega as células McCoy para o isolamento do vírus rábico comporta-se como um teste perfeito.

2.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

A validação da metodologia de isolamento do vírus rábico com células McCoy permite que novos estudos sejam realizados para melhor entender a história natural da infecção e/ou circulação do vírus rábico em ambientes silvestres. Esses estudos poderão ser realizados também com outras espécies de mamíferos, bem como em outros ecossistemas.

3. Para melhor avaliar os resultados obtidos no presente estudo seria interessante repeti-lo em uma região epizootica, pois assim será possível verificar se a célula de neuroblastoma murino (N2A) apresenta tendência similar à da célula McCoy para definir subpopulação. Assim seria possível avaliar o poder de predição desse método.

Outra perspectiva que se apresenta é a utilização de metodologias de validação para outros sistemas ou testes de diagnósticos, principalmente os *kits* comerciais adquiridos pelos Serviços de Saúde, que não são avaliados quanto às definições de casos. Portanto o domínio de técnicas e modelos de validação é útil para o Sistema de Saúde e Vigilância Epidemiológica.

GLOSSÁRIO

Os métodos de diagnóstico não são medidas perfeitas, e apresentam maior ou menor probabilidade de acerto. A validação de um teste de laboratório é estabelecida pela comparação entre os resultados com ele obtidos e o diagnóstico clínico baseado na história natural e nos sintomas do exame físico. Além disso, também é necessário comparar os resultados obtidos no novo teste e os resultados obtidos com o método de referência (padrão ouro).

Para garantir maior probabilidade de acertos é necessário estabelecer parâmetros que permitam avaliar os resultados obtidos dentro de critérios pré-estabelecidos. Esses critérios são os indicadores, cuja definição apresentamos a seguir (**ver Anexo 4 para os cálculos das estimativas**).

- **Padrão ouro** (*gold standard*) - é o método de diagnóstico que representa com maior fidelidade a presença ou não da doença ou a futura doença, caso ela ainda não tenha se manifestado e esteja na fase subclínica.
- **Acurácia** - é o grau de concordância entre uma medida individual e a verdade, ou seja, a verdade expressa pelo valor de referência. É a medida que mede o que realmente se propõe a medir.
- **Precisão** - é o grau de concordância mútua entre várias medidas individuais, expressas como uma hierarquia do desvio padrão (YUDEN, 1975). Juntamente com a reprodutibilidade, é uma propriedade da confiabilidade.
- **Confiabilidade** - é a extensão das diversas medidas repetidas de um fenômeno estável por diferentes pessoas e instrumentos, em diferentes tempos e lugares, com resultados similares.
- **Reprodutibilidade** - juntamente com a precisão, é uma propriedade da confiabilidade .
- **Sensibilidade** - é a proporção de doentes que o resultado do teste aponta como positivos para a doença.
- **Especificidade** - é a proporção de não doentes que o resultado do teste aponta como negativos para a doença.
- **Nível de corte** (*cut-off*) - é definido pelo limite entre os parâmetros sensibilidade e especificidade. O nível de corte é arbitrário e pode ser intuitivo, mas deve definir uma posição entre as duas curvas de distribuição dos resultados obtidos. Essa posição delimita o valor positivo do teste, ou seja, reúne a positividade do teste e a presença da doença (sensibilidade), e o valor negativo do teste e a não presença da doença (especificidade).

Valor Preditivo Positivo - é a probabilidade de que o paciente apresente a doença após o resultado positivo do teste.

- **Valor Preditivo Negativo** - é a probabilidade de que o paciente não apresente a doença após o resultado negativo do teste.

O valor preditivo informa a probabilidade *a posteriori* (pós-teste) de o paciente ter ou não ter a doença após o resultado do teste ser conhecido.

Enquanto a sensibilidade e a especificidade são características independentes e intrínsecas ao teste, o valor preditivo é determinado pela sensibilidade, pela especificidade e pela prevalência da doença na população testada.

- **Prevalência** é também chamada a probabilidade *a priori* (pré-teste), a probabilidade da doença antes da realização do teste.

A prevalência de uma doença é buscada na literatura em diversos tipos de fonte. Ela também pode variar de acordo com a fração da população analisada como: a idade, fator de risco, e exames clínicos nos pacientes (FLECHER, 1996).

Prevalência real de uma doença na população só é obtida com o uso de um teste de diagnóstico perfeito, ou seja, quando as características de sensibilidade e especificidade fossem iguais a 100% (PEREIRA, 1995).

- **Prevalência corrigida** é a estimativa obtida com a introdução de correção dos cálculos da sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico aplicado e a prevalência observada com os dados da amostra coletada (PEREIRA, 1995), ver anexo 4.
- **Concordância** entre as medidas de sensibilidade e especificidade dos dois métodos de diagnóstico (o novo e o de referência) resulta na validação do novo método de diagnóstico.

• **Razão de Máximo Verossimilhança** é a razão da probabilidade do resultado ser positivo e ocorrer a doença (MV +), ou o resultado ser positivo e não ocorrer a doença (MV -).

SUMMARY

PREVALENCE STUDY OF THE RABIES VIRUS IN BATS LODGED IN THE RAIN FOREST: A COMPARATIVE STUDY OF TWO METODOLOGIES

The prevalence study of the rabies virus was carried out in a sample of bats captured in the Brazilian southeastern São Paulo. Bats are one of the main wild reservoirs of the rabies virus. Brazil holds 144 species of bats and little is known about the circulation of such virus in these species. Two methodologies were used for the estimates of the presence of the rabies virus in the captured in the Parque Estadual Intervales. The results were obtained crossing the variable (presence of rabies virus) with epidemiological variables (bat species, sex, age, site of capture). The McCoy cell line method proved isolating more easily the virus of insectivorous bats besides presenting more capability of detection of infection in the latent phase (sub-clinic phase). On the other hand the N2A cell line were more efficient in detecting the rabies virus in *D. rotundus* hematophagous bats. It was also observed that for both cells the insectivorous, nectarivorous and phytophagous bats presented higher rabies virus isolation proportion. These results suggest that insectivorous bats play an important role in the maintenance of the virus in this reservoir. Although could also be observed that the circulation of the virus occurs intra and inter species, but studies specially designed to assess this issue must be re-evaluated.

RESUMO

ESTUDO DE PREVALÊNCIA DO VÍRUS RÁBICO EM MORCEGOS ALBERGADOS NO PARQUE ESTADUAL INTERVALES, ESTADO DE SÃO PAULO (UM ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS METODOLOGIAS)

O estudo de prevalência do vírus rábico foi realizado em uma amostra de morcegos capturados na Mata Atlântica da região sudeste do Brasil. Os morcegos são um dos principais reservatórios silvestres do vírus rábico. No Brasil existem aproximadamente 144 espécies de morcegos, e pouco se sabe sobre a circulação do vírus rábicos nessas espécies. Foram realizadas estimativas – com duas metodologias de isolamento - para detectar a presença do vírus rábico na população estudada. Os resultados foram obtidos pelo cruzamento entre a variável infectividade (presença de vírus rábico) e as variáveis epidemiológicas (espécies de morcegos, sexo, idade, local de captura). Observou-se que o método de isolamento que utiliza as células McCoy isolou com maior facilidade vírus de morcegos insetívoros, além de apresentar maior capacidade de detectar a infecção na fase latente (subclínica). Já as células N2A foram mais eficientes na detecção do vírus rábico em morcegos hematófagos *D. rotundus*. As duas metodologias utilizadas apresentaram maior proporção de isolamento do vírus rábico em morcegos insetívoros, nectarívoros e fitófagos. Tais resultados sugerem que os morcegos insetívoros desempenham importante papel na manutenção do vírus no reservatório cuja população foi estudada. Também foi possível constatar que a circulação do vírus ocorre inter e intra-espécies, mas estudos especificamente desenhados para avaliar esse aspecto devem ser implementados.

3.1 INTRODUÇÃO

Epizootias de raiva em bovinos ocorrem praticamente em todos os estados brasileiros. Estima-se que o rebanho bovino, no Brasil, seja da ordem de 165 milhões de cabeças. A economia de muitos estados é baseada na criação extensiva de gado. No estado de Mato Grosso do Sul, que possui o maior rebanho do país – de aproximadamente 22 milhões de cabeças –, ocorrem surtos epizooticos de raiva (SIDRA-IBGE, 1999).

No Vale do Paraíba, tradicional região produtora de leite do Estado de São Paulo também ocorrem surtos epizooticos de raiva em herbívoros, cuja transmissão é feita pelos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). Essa região possui uma faixa de Mata Atlântica na qual provavelmente se mantém o ciclo silvestre do vírus rábico (KOTAIT, 2000).

A complexa epizootia da raiva silvestre compreende tanto mamíferos carnívoros (lobos, raposas, cachorros do mato, quatis) como quirópteros, sendo estes últimos os maiores transmissores do vírus e o seu principal reservatório silvestre (CONSTANTINE e WOOD, 1966; 1968; ATANASIU, 1979).

Portanto, o fator econômico presente no ciclo silvestre da raiva envolvendo morcegos hematófagos e herbívoros é bastante relevante. No Brasil, segundo dados da Comissão Permanente de Controle da Raiva, aproximadamente meio milhão de dólares são desperdiçados anualmente com a perda de animais acometidos por raiva.

Os problemas econômicos decorrentes da raiva não se restringem às perdas de animais que chegam a óbito pela doença. Também a produção, a importação os programas de imunização de animais envolvem custos consideráveis e elevados.

Há que se considerar, ainda, que o Brasil possui grandes áreas de florestas e diferentes tipos de ecossistemas, e pouco se sabe sobre o ciclo silvestre do vírus rábico nos reservatórios naturais. Com relação aos morcegos, não são apenas os hematófagos que transmitem o vírus da raiva - outras espécies participam dessa cadeia -, e não são conhecidas as relações de circulação desse vírus entre as diversas espécies.

O Brasil abriga cerca de 144 espécies de morcegos entre as 950 conhecidas no mundo todo, e pouco ou praticamente nada se sabe sobre a história natural do vírus rábico e sua prevalência nesse enorme contingente de espécies (TADDEI, 1996).

Assim, o objeto de estudo do presente trabalho foi estimar a prevalência do vírus rábico em uma comunidade de morcegos albergados dentro de uma Unidade de Conservação - Parque Estadual Intervales - com 7% de Mata Atlântica, remanescente no Estado de São Paulo (<http://www.fundacaoflorestal.gov.br>). Para tanto, realizamos comparações entre as variáveis epidemiológicas da amostra estudada e a variável infecção celular - infectividade do vírus rábico - em dois tipos de cultivos celulares, como descrevemos na SEÇÃO 2 desta tese.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GERAL

Esta parte do trabalho destinou-se a estudar a prevalência do vírus rábico em uma amostra de morcegos capturados no Parque Estadual Intervales (Mata Atlântica), utilizando duas metodologias de isolamento do vírus (células N2A e células McCoy).

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentro desse objetivo, buscamos:

- Analisar as variáveis espécie, sexo, idade e local de captura, quanto à frequência e à presença de vírus rábico.
- Analisar essas mesmas variáveis quanto à frequência e à presença de vírus, relacionado-as ao período da captura (sazonalidade) dos morcegos.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 LOCAL DA CAPTURA DOS MORCEGOS

O Parque Estadual Intervales é uma área de proteção ambiental da Serra do Mar situada na região sul do Estado de São Paulo, entre os municípios de Riberão Grande, Eldorado, Guapiara, Iporanga e Sete Barras (entre 24°12' e 24°25' S e 48°05' e 48°30' W), com área de 38.354,46ha. A nordeste limita-se com o Parque Estadual Carlos Botelho, a noroeste com a Estação Ecológica do Xituê e a sudoeste com o Parque Turístico do Alto Ribeira (PETAR), que juntos perfazem o total de 116.863,99ha de área preservada.

3.3.2 DESENHO DO PLANO AMOSTRAL

Os estudos transversais preconizam que, em uma população alvo, todas as amostras - obtidas aleatoriamente - refletem os parâmetros populacionais, de forma direta ou após ajustes necessários, exceto se forem introduzidos erros no processo de amostragem e/ou na análise (GREINER, 2000b).

A amostra, de modo geral, reflete o espectro da doença e a distribuição de outra condição relevante ou fatores biológicos da população, razão pela qual é denominada amostra natural (KRAEMER, 1992).

Os morcegos foram capturados entre outubro de 1995 e abril de 1997. A amostra foi intencionalmente aleatória, pois sabe-se que trabalhos que investigaram a prevalência do vírus rábico em morcegos utilizaram amostras viciadas, - compostas por morcegos já doentes por animais suspeitos (Brass, 1991).

A estratégia de captura foi estabelecida de modo a possibilitar a colheita de todas as possíveis espécies existentes. Em geral, as redes para a captura eram armadas em trilhas localizadas nos diversos segmentos da mata, e na boca de cavernas espalhadas no entorno da sede do parque, próximas às fontes de alimento (Anexo 3).

3.3.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

No levantamento da mastofauna realizado por VIVO e GREGORIN (2001) no Parque Estadual Intervales no período de junho de 1988 a setembro de 1990 foram encontradas 28 espécies de morcegos, distribuídas em quatro famílias.

Nas cinco colheitas realizadas para o presente trabalho foram capturadas 12 espécies (Tabela 3.1), distribuídas entre as mesmas famílias já encontrados no parque (Phyllostomidae, Emballonuridae, Vespertilionidae e Molossidae). Para VIVO e GREGORIN (2001), na latitude em que se localiza o Parque Estadual Intervales o número de espécies encontradas deveria ser menor. No entanto, apesar do reduzido número de indivíduos, a amostra capturada neste estudo é representativa das espécies e principais famílias que habitam essa região da Mata Atlântica.

3.3.4 TAMANHO DA AMOSTRA COLHIDA

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com LWANGA & LEMERSHOW (1991), conforme demonstrado na SEÇÃO 2, item 2.3.1. O valor encontrado foi de 138 elementos (para um erro $\alpha = 5\%$); considerando mais 20% de possíveis perdas, o valor ideal da amostra seria de 166 indivíduos, mas foram capturados 163 morcegos no período de 1995 a 1997.

3.3.4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DA AMOSTRA

Foram excluídas espécies consideradas raras ou em processo de extinção, além de fêmeas grávidas. Essas fêmeas, após a captura, foram identificadas, tiveram tomadas as suas medidas morfológicas e retiradas pequenas amostras de sangue, sendo posteriormente libertadas. Essas precauções foram solicitadas pelo comitê científico do Parque Estadual Intervales, como medida de preservação da comunidade de morcegos.

Após a aplicação desses critérios restaram 120 animais, utilizados no estudo de validação das duas metodologias de isolamento de vírus rábico (SEÇÃO 2). Embora esse número seja 10% inferior ao número mínimo previamente estabelecido, de 138 elementos, isso não afetou a validade dos resultados obtidos.

3.3.5 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Na presente investigação foram analisadas as seguintes variáveis e categorias, que fizeram parte do banco de dados construído.

- **espécie coletada**
- **sexo** : macho ou fêmea
- **idade**: jovem ou adulto (estágio de desenvolvimento)
- **tamanho**: medida do antebraço (em milímetros)
- **peso**: medida da massa corporal (em gramas)
- **estado reprodutivo**: prenhez ou não nas fêmeas, e posição dos testículos (escrotados ou abdominais) nos machos - que indica atividade reprodutiva ou não.
- **locais de captura**: nas cinco sessões de colheitas realizadas, os pontos de captura foram mantidos nos mesmos locais, ou alocados nas proximidades.

3.3.6 COLHEITAS

3.3.6.1 CAPTURAS NO CAMPO

A colheita do material seguiu a metodologia preconizada por BREDD *et al.* (1996). O projeto foi submetido à aprovação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), de acordo com a Portaria 332 de 13 de março de 1990 - licenciado sob o nº 273/95 (Anexo 4) -, e ao comitê científico da Fundação Florestal. Esse comitê sugeriu que as colheitas fossem realizadas nas proximidades da sede do Parque Estadual Intervales, em trilhas na mata e nas cavernas, e que o número de indivíduos coletados por sessão (a cada visita pré-programada ao parque) deveria ser de aproximadamente 20, sugestões estas que acatamos.

3.3.6.2 MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA

Foram determinados alguns critérios para manter a integridade física da equipe de campo e dos espécimes: a equipe de captura fazia o reconhecimento da área e das cavernas - sempre acompanhada por um guia local - durante o período diurno e, ao entardecer, as redes eram colocadas estrategicamente para a captura noturna dos animais. Todos os membros da equipe receberam tratamento anti-rábico pré-exposição, e manipularam os morcegos sempre protegidos por luvas de couro e pinças longas de 30cm de comprimento.

3.3.7 PROCEDIMENTO LABORATORIAL

Após as capturas, os animais eram levados vivos ao laboratório do parque, onde eram identificados, tinham as medidas biométricas tomadas e coletadas amostras de sangue. Os animais selecionados para o estudo foram anestesiados e sacrificados.

Em seguida, esse material era congelado e encaminhado para o Laboratório de Raiva do Instituto Adolfo Lutz. Somente após realizadas as leituras de todos os elementos nas duas culturas de células usadas os códigos foram identificados com as espécies coletadas. Os aspectos comportamentais das espécies e o local de captura foram então analisados e correlacionados ao isolamento ou não do vírus rábico.

3.3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS (ESTUDO DESCRITIVO)

O estudo descritivo das variáveis observadas no campo e no laboratório foi realizado a partir do banco de dados (Epi6:\Tese.rec), montado com as informações coletadas no campo (variáveis epidemiológicas) e as variáveis observadas no laboratório. Essas variáveis foram tabuladas distribuídas freqüencialmente com o auxílio do aplicativo EpiTables do programa estatístico Epi-Info versão 6.04 (Dean, 1994). Os gráficos foram montados no programa Excel 7.0, e as tabelas no programa Word 7.0 (Windows 98).

Na caracterização dos morcegos, utilizamos informações obtidas no presente estudo e informações retiradas da literatura especializada. Nesses casos, a fonte sempre é citada no texto.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 RIQUEZA DE ESPÉCIES

Nas colheitas realizadas no Parque Estadual Intervales foram obtidas 12 espécies de morcegos (Tabela 3.1), pertencentes a quatro famílias, quais sejam: Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae e Emballonuridae. A família mais representada foi a primeira – Phyllostomidae –, com cinco subfamílias e oito espécies.

Tabela 3.1 - Espécies, famílias, frequência e porcentagem dos morcegos capturados no Parque Estadual Intervales no período de 1995 a 1997

Nº Espécies	Família	Frequência	(%)
1. <i>Sturnira lilium</i>	Phyllostomidae	41	(25,1)
2. <i>Lonchorhina aurita</i>	Phyllostomidae	36	(22,1)
3. <i>Tadarida brasiliensis</i>	Molossidae	24	(14,7)
4. <i>Histiotus velatus</i>	Vespertilionidae	14	(8,6)
5. <i>Anoura caudifera</i>	Phyllostomidae	14	(8,6)
6. <i>Desmodus rotundus</i>	Phyllostomidae	10	(6,1)
7. <i>Artibeus lituratus</i>	Phyllostomidae	7	(4,3)
8. <i>Myotis nigricans</i>	Vespertilionidae	7	(4,3)
9. <i>Carollia perspicillata</i>	Phyllostomidae	6	(3,7)
10. <i>Anoura geoffroyi</i>	Phyllostomidae	2	(1,2)
11. <i>Diphylla eucadata</i>	Phyllostomidae	1	(0,6)
12. <i>Peropteryx macrotis</i>	Emballonuridae	1	(0,6)
Total = 12 espécies		163	(99,9)

3.4.2 CARACTERIZAÇÃO E ALGUNS DADOS BIOLÓGICOS DAS ESPÉCIES DE MORCEGOS

Sturnira lilium (E. Geoffroy, 1810)

Família: Phyllostomidae

Subfamília: Stenodermatinae

Distribuição: Pequenas Antilhas, norte do México, norte da Argentina, Uruguai e leste do Brasil, Trinidad e Tobago e talvez Jamaica (KOOPMAN, 1993)

Morfologia: COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 43,71mm; desvio padrão (dp) 0,83
 PESO: 22,15g; dp 2,41

Biologia: DIETA: Frutos e possivelmente pólen e néctar (GARDNER, 1977)
 ABRIGOS: Ocos de árvores e cavernas (REDFORD e EISENBERG, 1992)
 AGRUPAMENTOS: Não há dados na literatura a esse respeito
 REPRODUÇÃO: Pode se reproduzir em qualquer época do ano, mas apresenta dois picos de reprodução por ano (WILSON, 1979)

Lonchorhina aurita (Tomes, 1863)

Família: Phyllostomidae

Subfamília: Phyllostominae

Distribuição: Oaxaca no México, sudeste do Brasil, Peru, Equador; Trinidad & Tobago e talvez Ilhas Bahamas (KOOPMAN, 1993)

Morfologia: COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 52,54mm; dp 1,25
 PESO: 19,15g; dp 2,45

Biologia: DIETA: insetos e material vegetal (GARDNER, 1977). Diversos autores consideram essa espécie como insetívora ou primariamente insetívora (GOODWIN e GREENHALL, 1961; EISENBERG, 1989; BREDET *et al.*, 1999)

ABRIGOS: Há relato de ocorrência dessa espécie em uma mina abandonada (EINSENBURG, 1989)

AGRUPAMENTOS: 20 a 25 indivíduos em cavernas em Trinidad & Tobago (GOODWIN e GREENHALL, 1961), e mais de 500 em uma mina do Panamá (EISENBERG, 1989)

REPRODUÇÃO: Gestação na estação seca e parturação na estação chuvosa (LASSIEVE e WILSON, 1989).

***Tadarida brasiliensis* (I. Geoffroy, 1824)**

Família: Molossidae

Distribuição: Sul e sudeste do Brasil, Argentina, do Chile ao Oregon, sul de Nebraska e Ohio (USA) e grandes e pequenas Antilhas (KOOPMAN, 1993). Aparentemente, não ocorre na Amazônia (WILKINS, 1989) e no nordeste brasileiro.

Morfologia: COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 44,06mm; dp 1,18

PESO: 12,27g; dp 1,01

Biologia: DIETA: insetos, principalmente pequenas mariposas (WILKINS, 1989)

ABRIGOS: grandes cavernas, pontes de concreto, ocos de árvores, telhados de casas e edifícios (WILKINS, 1989). No Parque Estadual Intervales, foi encontrada albergada no telhado da recepção da fazenda.

AGRUPAMENTOS: Algumas dezenas a milhões de indivíduos (WILKINS, 1989). No Parque Estadual Intervales a colônia não era grande, tendo talvez algumas dezenas. A presença dessa espécie foi verificada também em outros edifícios da fazenda.

REPRODUÇÃO: Em Porto Alegre (RS), o nascimento dos filhotes de *T. brasiliensis* ocorre entre o final de dezembro e início de janeiro, coincidindo com o período chuvoso, quando há menor disponibilidade de insetos (MARQUES e FABIAN, 1994).

***Histiotus velatus* (I. Geoffroy, 1824)**

Família: Vespertilionidae

Subfamília: Vespertilioninae

Distribuição: região leste do Brasil e Paraguai (KOOPMAN, 1993)

Morfologia: COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 46,71mm; dp 2,02

PESO: 12,25g; dp 1,28

Biologia: DIETA: insetos

ABRIGOS: cumeeiras e sótãos de casa em áreas periurbanas e rurais. A colônia do Parque Estadual Intervales abrigava-se no forro do prédio de recepção. Foram encontrados três indivíduos atrás de um quadro de avisos da Recepção do Parque

AGRUPAMENTOS: 20 a 30 indivíduos, na região sudeste do Brasil (PERACCHI, 1968)

REPRODUÇÃO: Fêmeas com filhotes têm sido encontrados no mês de outubro na região sudeste do Brasil. Fêmeas e machos não ativos foram capturados em fevereiro no Rio de Janeiro (PERACCHI, 1968)

***Anoura caudifera* (E. Geoffroy, 1818)**

Família: Phyllostomidae

- Subfamília:** Glossophaginae
- Distribuição:** Colômbia, Venezuela, Guianas, Brasil, Equador, Peru, Bolívia e noroeste da Argentina (KOOPMAN, 1993)
- Morfologia:** COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 37,5mm; dp 0,70
PESO: 12,25g; dp 0,95
- Biologia:** DIETA: néctar, pólen, frutos e insetos (GARDNER, 1977)
ABRIGOS: fendas de rochas, cavernas, bueiros e folhagens de palmeiras e bananeiras (BREDT *et al.*, 1999)
AGRUPAMENTOS: de 5 a 10 indivíduos (CAMPANHÃ e FOOWLER, 1993)
REPRODUÇÃO: No Vale do Ribeira, fêmeas grávidas e lactantes foram encontrados somente na estação chuvosa (dezembro a março) (TRAJANO, 1985)

***Desmodus rotundus* (E. Geoffroy, 1810)**

- Família:** Phyllostomidae
- Subfamília:** Desmodontinae
- Distribuição:** Uruguai, norte da Argentina, do norte do Chile a norte do México, Ilhas Margaritas e Trinidad & Tobago (KOOPMAN, 1993).
- Morfologia:** COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 64,47mm; dp 2,2_
PESO: 36 mm; dp 6,55
- Biologia:** DIETA: especializado em sangue de mamíferos, mas também pode sangrar aves (GARDNER, 1977; UIEDA, 1996)
ABRIGOS: locais mais escuros das cavernas, ocos de árvores, minas e casas abandonadas, bueiros, sob pontes de estradas (BREDT *et al.*, 1996; 1999).
AGRUPAMENTOS: 10 a 50 indivíduos, porém não raramente os abrigos contêm mais 100 (BREDT *et al.*, 1996)
REPRODUÇÃO: qualquer época do ano (WILSON, 1979); porém nas regiões sul e sudeste do Brasil, o nascimento dos filhotes ocorre freqüentemente na estação chuvosa (outubro a março) (UIEDA, comunicação pessoal)

***Artibeus lituratus* (Olfers, 1818)**

- Família:** Phyllostomidae
- Subfamília:** Stenodermatinae
- Distribuição:** Do norte do México ao sul do Brasil, norte do Argentina e Bolívia, Trinidad & Tobago, sul das pequenas Antilhas e ilhas de Três Marias (KOOPMAN, 1993)
- Morfologia:** COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 67,5mm; dp 1,06
PESO: 56,25g; dp 4,57
- Biologia:** DIETA: frutos, pólen, néctar, flores, folhas e insetos (GARDNER, 1977)
AGRUPAMENTOS: solitários ou pequenas colônias entre 5 e 16 indivíduos (BREDT *et al.*, 1996)
ABRIGOS: Exemplares foram capturados somente em corredores de vôo, por isso não há informações sobre seus abrigos na Fazenda Intervalles. Contudo, na literatura essa espécie é conhecida por se abrigar habitualmente nas folhagens da copa das árvores (BREDT *et al.*, 1996).

REPRODUÇÃO: Fêmeas grávidas encontradas nos meses de fevereiro a março e outubro a novembro (BREDT *et al.*, 1996)

***Myotis nigricans* (Schinz, 1821)**

Família: Vespertilionidae

Subfamília: Vespertilioninae

Distribuição: Do México ao Peru, norte da Argentina e sul do Brasil, Trinidad & Tobago e Granada (KOOPMAN, 1993)

Morfologia: COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 35,5mm; dp 1,07

PESO: 3,25g; dp 1,71

Biologia: DIETA: insetos, incluindo Lepdoptera (WILSON, 1971).

ABRIGOS: cavernas (TRAJANO, 1985; BREDT *et al.*, 1999), ocos de árvores e edificações (GOODWIN e GREENHALD, 1961)

AGRUPAMENTOS: No Panamá, a colônia estudada por WILSON (1971) continha 1000 indivíduos de ambos os sexos. No Parque Estadual Intervales seus agrupamentos devem ser bem menores, talvez de algumas dezenas (W. UIEDA, comunicação pessoal).

REPRODUÇÃO: Na região do Distrito Federal (Brasília), fêmeas grávidas foram observadas somente em maio e outubro (BREDT *et al.*, 1999). No Panamá, a atividade reprodutiva inicia-se em dezembro (período de abundância de insetos), com um pico de nascimento em fevereiro; também ocorre um pico secundário de nascimento em abril-maio e um em agosto (EISENBERG, 1989)

***Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758)**

Família: Phyllostomidae

Subfamília: Carollinae

Distribuição: Norte do México ao Peru, Bolívia, Paraguai, sudeste do Brasil, Guianas, Trinidad & Tobago, Granada e talvez Jamaica e norte das Pequenas Antilhas (KOOPMAN, 1993)

Morfologia: COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 39,75mm; dp 1,06

PESO: 14g; dp 1,41

Biologia: DIETA: frutos, insetos e flores (GARDNER, 1977), principalmente néctar e polén (CLOUTIER e THOMAS, 1992)

ABRIGOS: cavernas, minas, coberturas de casas sem forros e bueiros (BREDT *et al.*, 1996)

AGRUPAMENTOS: colônias pequenas ou de até centenas de indivíduos (BREDT *et al.*, 1996).

REPRODUÇÃO: ocorrência de gravidez foi detectada nos meses de fevereiro, abril, agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro. Fêmeas com filhotes foram encontradas em fevereiro e outubro (BREDT *et al.*, 1999).

***Anoura geoffroyi* (Gray, 1838)**

Família: Phyllostomidae

Subfamília: Glossophaginae

- Distribuição:** Peru, Bolívia, sudeste do Brasil, Guiana Francesa, do Equador ao norte do México; Trinidad e Granada (KOOPMAN, 1993)
- Morfologia:** COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 35,5mm; dp 0,70.
PESO: 11,5g; dp 0,70
- Biologia:** DIETA: néctar, pólen, frutos e insetos (GARDNER, 1977)
ABRIGOS: Parece ser exclusivamente cavernícola (GOODWIN e GREENHALL, 1961), tendo sido registrada apenas em cavernas nas diversas regiões de sua distribuição geográfica
AGRUPAMENTO: colônias entre 100 a 300 indivíduos, na região do Distrito Federal (BREDT *et al.*, 1999). Grandes agrupamentos dessa espécie foram também observados nas cavernas do Alto Ribeira (TRAJANO, 1985)
REPRODUÇÃO: fêmeas grávidas foram capturadas em maio e outubro, e fêmeas grávidas e lactantes em junho, na região do Distrito Federal (BREDT *et al.*, 1999)

***Diphylla ecaudata* (Spix, 1823)**

- Família:** Phyllostomidae
- Subfamília:** Desmodontianae
- Distribuição:** Do sul do Texas (EUA) à Venezuela, Peru, Bolívia e Brasil (KOOPMAN, 1993)
- Morfologia:** COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 50 a 56mm (GREENHALL *et al.*, 1984)
PESO: 24 a 43g (GREENHALL *et al.*, 1984).
- Biologia:** DIETA: preferencialmente sangue de aves (UIEDA, 1996). Os poucos dados sobre ataques a mamíferos deram-se em cativeiro, e é necessário confirmá-los na natureza (UIEDA, 1996)
ABRIGOS: cavernas, minas, túneis abandonados, raramente em ocos de árvores (GREENHALL *et al.*, 1984; UIEDA *et al.*, 1996)
AGRUPAMENTO: As informações não são precisas, há referências sobre indivíduos solitários, grupos de 13 a 18 indivíduos até 50 indivíduos (UIEDA, 1996).
REPRODUÇÃO: No Distrito Federal, fêmeas grávidas são encontradas no meses de fevereiro, março, julho, setembro e outubro (BREDT *et al.*, 1999). Fêmeas com filhotes têm sido observadas nos meses de agosto e setembro, no Distrito Federal (BREDT *et al.*, 1999) Há relatos de captura de fêmeas grávidas em janeiro e fevereiro, e de fêmeas lactantes em dezembro e março (TRAJANO, 1985).

***Peropteryx macrotis* (Wagner, 1843)**

- Família:** Emballonuridae
- Sub-família:** Emballonurinae
- Morfologia:** COMPRIMENTO DO ANTEBRAÇO: 45,5mm
PESO: 8,0g
- Biologia:** DIETA: insetos
ABRIGOS: cavernas, fendas de rochas e sótãos e porões de casas e prédios (BREDT *et al.*, 1996)
AGRUPAMENTOS: mais de 10 indivíduos, provavelmente formando harens (BREDT *et al.*, 1996)

REPRODUÇÃO: foram encontrados fêmeas lactantes e/ou filhotes nos meses de dezembro e janeiro, no Vale do Ribeira. Sugere-se um ciclo monoestro sazonal, com pico de nascimento entre o fim da estação seca e o início da chuvosa TRAJANO (1985)

3.4.2.1 VARIÁVEL IDADE

Não foi considerada, pois a grande maioria dos morcegos capturados eram adultos. As **variáveis tamanho e peso** estão apresentadas como valores médios em cada espécie descrita acima.

3.4.2.2 VARIÁVEL ESTADO REPRODUTIVO

Foi avaliada apenas em 127 animais, capturados nas três primeiras coletas (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Número de morcegos machos e fêmeas ativos sexualmente capturados no Parque Estadual Intervales no período de 1995 a 1997

Período	Machos			Fêmeas		
	Ativos	Não Ativos	Total	Ativos	Não Ativos	Total
outubro/1995	5	7	12	13*	8NG	21
março/1996	4	15	19	2**	12NG	14
agosto/1996	3	10	13	3	9NG	12
janeiro/1997	5	14	19	0	17NG	17
Total	17	46	63	18	46	64

* fêmeas grávidas

NG = não grávidas

** fêmeas lactantes

3.4.2.3 VARIÁVEL SEXO NAS ESPÉCIES DE MORCEGOS CAPTURADAS.

A Figura 3.2 mostra a proporção entre machos e fêmeas o total de espécimes coletados.

Figura 3.2 - Proporção de machos e fêmeas do total das capturas, após a exclusão dos animais liberados, sendo 71 fêmeas e 78 machos (n=149).

A Figura 3.3 mostra a distribuição de machos e fêmeas em cada espécie, e a Figura 3.4 mostra a distribuição de machos e fêmeas em cada captura realizada.

Figura 3.3. Distribuição de espécies de morcegos capturados no Parque Estadual Intervales no período de 1995-1997.

Figura 3.4 - Distribuição de machos e fêmeas em cada captura realizada no Parque Estadual Intervales no período de 1995-1997.

3.4.2.4 VARIÁVEL INFECTIVIDADE OBSERVADA NO LABORATÓRIO.

A maioria dos morcegos analisados apresentou grau zero de infectividade (64,0% - 67,0%), ou seja, não apresentaram isolamento de vírus (Tabelas 3.2 e 3.3). Resultado semelhante foi obtido também quando cada espécie foi analisada individualmente. Um número relativamente grande de indivíduos apresentou grau 1+ (21,0% -27,0 %) nos dois sistemas celulares utilizados para o isolamento do vírus (N2A e McCoy). Um número bem menor de elementos inseriu-se nas faixas 2+ e 3+. O sistema celular McCoy apresenta superioridade no isolamento do vírus, principalmente no grupo representado pelo grau de infectividade 2+: 12,60% para as células McCoy e 5% para as células N2A.

Tabela 3.2 - Espécies de morcegos capturados, segundo grau de infectividade, número e porcentagem de isolamento do vírus rábico observado nas células de neuroblastoma murino (N2A)

Espécies	0 (%)	+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	Total (%)
1. <i>Sturnira lilium</i>	21 (17,50)	9 (7,50)	1 (0,83)	0 (0,00)	31 (25,83)
2. <i>Lonchorhina aurita</i>	14 (11,66)	9 (7,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	23 (19,16)
3. <i>Tadarida brasiliensis</i>	13 (10,83)	5 (4,16)	1 (0,83)	0 (0,00)	19 (15,83)
4. <i>Anoura caudifera</i>	9 (7,50)	3 (2,50)	0 (0,00)	1 (0,83)	13 (10,83)
5. <i>Desmodus rotundus</i>	6 (5,00)	2 (1,66)	1 (0,83)	0 (0,00)	9 (7,52)
6. <i>Artibeus lituratus</i>	5 (4,16)	1 (0,83)	1 (0,83)	0 (0,00)	7 (5,83)
7. <i>Myotis nigricans</i>	5 (4,16)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,83)	6 (5,00)
8. <i>Carollia perspicillata</i>	2 (1,66)	1 (0,83)	2 (1,66)	0 (0,00)	5 (4,16)
9. <i>Histiotus velatus</i>	1 (0,83)	2 (1,66)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (2,50)
10. <i>Anoura geoffroyi</i>	2 (1,66)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,66)
11. <i>Diphylla ecaudata</i>	1 (0,83)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,83)
12. <i>Peropteryx macrotis</i>	1 (0,83)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,83)
Total	80 (66,66)	32 (26,66)	6 (5,00)	2 (1,66)	120 (100,00)

Tabela 3.3 - Espécies de morcegos capturados, segundo grau de infectividade, número e porcentagem de isolamento de vírus rábico observado nas células de McCoy

Espécies	0 (%)	+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	TOTAL (%)
1. <i>Sturnira lilium</i>	19 (15,96)	7 (5,88)	5 (4,20)	2 (1,68)	32 (26,48)
2. <i>Lonchorhina aurita</i>	15 (12,60)	5 (5,88)	2 (1,68)	0 (0,00)	22 (18,48)
3. <i>Tadarida brasiliensis</i>	8 (6,72)	7 (5,88)	4 (3,36)	0 (0,00)	19 (15,96)
4. <i>Anoura caudifera</i>	10 (8,40)	2 (1,68)	1 (0,84)	0 (0,00)	13 (10,92)
5. <i>Desmodus rotundus</i>	7 (5,88)	3 (2,52)	0 (0,00)	0 (0,00)	10 (8,40)
6. <i>Artibeus lituratus</i>	5 (4,20)	1 (0,84)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (5,04)
7. <i>Myotis nigricans</i>	4 (3,36)	0 (0,00)	1 (0,84)	1 (0,84)	6 (5,04)
8. <i>Carollia perspicillata</i>	3 (2,52)	1 (0,84)	2 (1,68)	0 (0,00)	6 (5,04)
9. <i>Histiotus velatus</i>	1 (0,84)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,84)
10. <i>Anoura geoffroyi</i>	2 (1,68)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,68)
11. <i>Diphylla ecaudata</i>	1 (0,84)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,84)
12. <i>Peropteryx macrotis</i>	1 (0,84)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,84)
Total	76 (63,86)	25 (21,00)	15 (12,60)	3 (2,52)	119 (99,98)

As Figuras 3.5a e 3.5b representam graficamente as Tabelas 3.2 e 3.3, e mostram a distribuição de infectividade nos dois tipos de culturas celulares.

3.4.2.5 VARIÁVEL INFECTIVIDADE SEGUNDO A SAZONALIDADE

Na Figura 3.6 observa-se o grau de infectividade em relação ao vírus e a sua distribuição durante todo o período de colheita, que representa o isolamento segundo a sazonalidade. As Tabelas 3.5 e 3.6 apresentam o mesmo resultado da Figura 3.6. Nessas tabelas é possível observar que não há diferenças significativas entre as proporções apresentadas.

Figura 3.5 : Número de animais infectados e não infectados segundo sexo observados pela técnica de imunofluorescência nas células A (N2a) e B (McCoy).

Tabela 3.5 - Número e proporção de infectividade dos morcegos segundo a sazonalidade, observados em células de neuroblastoma murino

Estações	Chuvosa (%)			Seca (%)		Total (%)
Infecção	jan/97	mar/96	abr/97	ago/96	out/95	
0	11 (9,24)	21 (17,64)	19 (15,96)	14 (11,76)	15 (12,60)	80 (67,22)
1+	15 (9,24)	5 (4,20)	2 (1,68)	5 (4,20)	4 (3,36)	31 (26,04)
2+	0 (0,00)	3 (2,52)	1 (0,84)	1 (0,84)	1 (0,84)	6 (5,04)
3+	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,68)	0 (0,00)	2 (1,68)
Total	26 (21,85)	29 (24,37)	22 (18,49)	22 (18,49)	20 (16,80)	119 (99,99)

Tabela 3.6 - Número e proporção de infectividade, nos morcegos segundo a sazonalidade observada nas células McCoy

Estações	Chuvosa (%)			Seca (%)		Total (%)
Infecção	jan/97	mar/96	abr/97	ago/96	out/95	
0	9 (7,56)	21 (17,64)	17 (14,28)	13 (10,92)	16 (13,44)	76 (63,83)
1+	10 (8,40)	4 (3,36)	2 (1,68)	4 (3,36)	5 (4,20)	25 (21,01)
2+	3 (2,52)	3 (2,52)	3 (2,52)	3 (2,52)	3 (2,52)	15 (12,60)
3+	0 (0,00)	1 (0,84)	0 (0,00)	2 (1,68)	0 (0,00)	3 (2,52)
Total	22 (18,48)	29 (23,46)	22 (18,48)	22 (18,48)	23 (19,32)	119 (99,96)

Valor de $p < 0,3878$ (X^2 realizado entre as datas de capturas)**VARIÁVEL INFECTIVIDADE SEGUNDO SEXOS**

A Figura 3.7 mostra a distribuição de machos e fêmeas infectados e não infectados observados nos dois sistemas celulares, enquanto que as Tabelas 3.7 e 3.8 mostram a distribuição sexual, por espécie, segundo o grau de infecção ou não infecção.

A

N2A

B

McCoy

Figura 3.6.: Número de animais infectados e não infectados em isolamentos realizados nas células N2a (A) e McCoy (B)., segundo a época de cada captura realizada.

Tabela 3.7 - Número de machos e fêmeas infectados e não infectados observadas em células N2A, em todas as espécies de morcegos capturadas no período 1995/1997

N2A	Infectados 3+ 2+ (75% e 50%)		Infectados 1+ (25%)		Não Infectados (0%)		Total
Espécies	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	
<i>A.caudifera</i>	1	0	1	2	5	4	13
<i>A.geoffroyi</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>A.litiratus</i>	0	1	1	0	2	3	7
<i>C.perspscillata</i>	1	1	0	1	1	1	5
<i>D.rotundus</i>	1	0	1	1	4	2	9
<i>D.ecaadata</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>H.velatus</i>	0	0	2	0	0	1	3
<i>L.aurita</i>	0	0	6	3	7	7	23
<i>M.nigricans</i>	0	1	0	0	3	2	6
<i>P.macrotis</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>S.lilium</i>	1	0	6	3	8	13	31
<i>T.brasiliensis</i>	1	0	3	2	9	4	19
Total	5	3	20	12	40	40	120

Tabela 3.8 - Número de machos e fêmeas infectados e não infectados observadas em células McCoy, em todas as espécies morcegos capturadas no período 1995/1997

N2A	Infectados 3+ 2+ (75% e 50%)		Infectados 1+ (25%)		Não Infectados (0%)		Total
Espécies	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	
<i>A.caudifera</i>	1	0	1	1	5	5	13
<i>A.geoffroyi</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>A.litiratus</i>	0	0	0	1	2	3	6
<i>C.perspscillata</i>	1	1	0	1	1	2	6
<i>D.rotundus</i>	0	0	2	1	5	2	10
<i>D.ecaadata</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>H.velatus</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>L.aurita</i>	1	1	5	0	7	8	22
<i>M.nigricans</i>	1	1	0	0	2	2	6
<i>P.macrotis</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>S.lilium</i>	4	3	4	3	7	12	32
<i>T.brasiliensis</i>	4	0	5	2	5	3	19
Total	12	6	17	9	34	41	119

Figura 3.7: Número de animais infectados e não infectados segundo sexo observados pela técnica de imunofluorescência nas células A (N2a) e B (McCoy).

VARIÁVEL LOCAL DE CAPTURA VERSUS ESPÉCIES CAPTURADAS

O Quadro 3.1 mostra os locais de capturas e as espécies capturadas mais freqüentemente durante o período de 1995 a 1997.

Quadro 3.1 - Locais de capturas realizadas no Parque Estadual Intervales durante o período de 1995 a 1997.

Locais de captura	Características	Espécies coletadas
Recepção	Parede oca, sotão	<i>T. brasiliensis</i> , <i>H. velatus</i> , <i>S. lilium</i>
Gruta colorida	Caverna	<i>D. rotundus</i> , <i>S. lilium</i> , <i>M. nigricans</i> e <i>L. aurita</i>
Trilha da Gruta colorida	Folhagem, vegetação, rota comum	<i>S. lilium</i> , <i>D. rotundus</i>
Gruta do Sumidouro	Caverna	<i>L. aurita</i> , <i>H. velatus</i> e <i>C. auritus</i>
Hospedaria (Sala de convenções)	Iluminação, paredes ocas	<i>H. velatus</i> , <i>M. nigricans</i>
Casa João Dias	Criação: galinhas, porcos; bananeiras	<i>S. lilium</i> , <i>A. geoffroyi</i> , <i>D. rotundus</i> , <i>A. caudifera</i>
Gruta do Minotauro	Caverna	<i>C. perspicillata</i> , <i>A. caudifera</i>
Gruta do cipó	Caverna	<i>C. auritus</i>
Estrada próximo casa João Dias	Vegetação	<i>S. lilium</i>
Gruta da Britadeira	Caverna	<i>C. perspicillata</i>
Gruta do tatú	Caverna	<i>S. lilium</i> , <i>M. nigricans</i>
Trilha da mata casa João Dias	Vegetação	<i>A. literatus</i>
Trilha do riacho	Vegetação	<i>A. literatus</i>
Trilha da Lagoa Negra	Vegetação	<i>S. lilium</i> , <i>C. perspicillata</i>

3.5 DISCUSSÃO

Como anteriormente explicitamos, o presente estudo utilizou dois métodos de isolamento para avaliar a prevalência do vírus rábico em morcegos coletados no Parque Estadual Intervales: a cultura em células de neuroblastoma murino (SMITH, 1989; 1990), e a cultura em células McCoy (NOGUEIRA, 1998), validada na SEÇÃO 2. Nesta SEÇÃO 3, interessam-nos os aspectos epidemiológicos da doença. Assim, cruzamos a principal variável de interesse (infecção pelo vírus), com as variáveis de interesse epidemiológico: sexo, idade, local de captura dos morcegos e sazonalidade da captura.

A amostra de morcegos capturados, mostrada nas Figuras 3.1, 3.2 e 3.3, apresenta distribuição similar entre machos e fêmeas, o que sugere o equilíbrio da amostra pois, segundo FORATTINI (1992):

“ ... a proporção equânime para ambos os sexos significa uma população em equilíbrio para organismos dióicos. Outro indicador para dimensionar a composição populacional são as características de faixa etária e estado reprodutivo.... “

No presente estudo, a proporcionalidade foi observada tanto no conjunto de todas as espécies coletadas como em cada espécie isoladamente, e ainda se manteve quando a distribuição sexual de cada coleta foi avaliada.

A amostra analisada apresentou proporção de 27% de machos ativos para 73% não ativos, e proporção de 28% de fêmeas em fase reprodutiva (grávidas) ou pós-reprodutiva (lactantes) para 72% que não apresentavam nenhuma dessas características.

A condição de equilíbrio populacional foi uma variável desejável no presente estudo. Cumpre-nos, entretanto, ressaltar que o termo população² aqui empregado não tem o significado atribuído à palavra em trabalhos de ecologia ou de dinâmica populacional, o que exigiria a verificação das taxas de natalidade, de mortalidade e as migrações. Todavia, a importância dessa proporcionalidade mantém-se, pois evita algum eventual viés na interpretação dos resultados referentes à real prevalência do vírus da raiva no reservatório silvestre do qual foi extraída a nossa amostra.

Com relação à dieta, as espécies capturadas apresentam hábitos alimentares diferentes, o que atende a uma condição desejada na amostragem, que é a riqueza de espécies. Considerando que os animais capturados não apresentavam, aparentemente, comportamento anormal - em horário não próprios aos hábitos de cada espécie - para buscar alimento (UIEDA *et al.* 1995), é possível supor que a amostra é constituída por animais aparentemente sadios. Sendo assim, pressupõe-se que a população estudada representa uma comunidade de morcegos sadios.

As espécies capturadas não são as únicas espécies presentes na região do entorno da fazenda; outras espécies habitam a área, mas não foram coletadas em qualquer sessão de captura pois são consideradas raras. A espécie *Chrotopterus auritus* (carnívora), por exemplo, foi observada em várias coletas, mas a colônia não foi tocada. O único exemplar capturado e sacrificado que também se insere no grupo de espécies raras pertencia à espécie *Diphylla ecaudata*, e a captura foi realizada porque um dos integrantes da equipe de coleta foi mordido pelo animal. Esse foi o único acidente ocorrido durante as sessões de captura dos morcegos.

1. VARIÁVEIS IDADE E ESTADO REPRODUTIVO

A amostra de morcegos estudada era composta por animais adultos, com peso médio dentro dos padrões dessa faixa etária. Quanto à variável estado reprodutivo, os machos coletados nas diferentes sessões não apresentaram diferenças, mas deve-se destacar que 1/3 dos animais capturados manifestavam atividade sexual no período das capturas. Ainda com relação ao estado reprodutivo, houve maior incidência de fêmeas grávidas no mês de outubro, e de fêmeas lactantes

²

O significado do termo população, utilizado no contexto deste estudo é: “Uma população sob o ponto de vista estatístico, um conjunto de medidas correspondendo à coleção de unidades para as quais inferências são feitas.” (Statistics Principles and Methods: Richard Johnson and Gouri Bhattacharya (1987) p.8.

observadas no mês de janeiro, enquanto o mês de abril foi aquele que apresentou o menor número de fêmeas em estado não reprodutivo (Tabela 3.2).

2. VARIÁVEL INFECÇÃO VERSUS ESPÉCIES CAPTURADAS

A análise apresentada nas Figuras 3.5a e 3.5b e nas Tabelas 3.2 e 3.3 evidencia que maior proporção do grau de infecção (3+) ocorreu nas espécies nectarívoras, insetívoras e frugívoras (*Anoura caudifera*, *Myotis nigricans* e *Sturnira lilium*), e não nas espécies hematófagas. Dessas três espécies, apenas um mesmo exemplar de *Myotis nigricans* apresentou positividade para infecção nos dois sistemas celulares, enquanto que na espécie *Anoura caudifera* o vírus foi isolado apenas na cultura de células de neuroblastoma murino, e em dois exemplares da espécie *Sturnira lilium* o isolamento se deu na cultura de células McCoy. A espécie *Myotis nigricans* pertence à família Vespertilionidae - maior família de Chiroptera -, constituída por 35 gêneros e 318 espécies (BREDDT *et al.*, 1999). De acordo com CONSTANTINE (1970), vinte espécies de Vespertilionidae apresentaram positividade para a raiva nos Estados Unidos e Canadá. UIEDA *et al.* (1996) relatam o isolamento de vírus rábico em quatro espécies de Vespertilionides brasileiros.

As espécies *Anoura caudifera* e *Sturnira lilium* pertencem à família Phyllostomidae, que é a família americana mais diversificada, com um total de 49 gêneros e 146 espécies, das quais 82 ocorrem no Brasil (BREDDT *et al.*, 1996). A subdivisão em famílias está diretamente relacionada aos hábitos alimentares. Assim, há espécies insetívoro-carnívoras (Phyllostominae e Vampyrinae), nectarívoro-polinívoras (Glossophaginae, Lonchophyllinae, Brachiphyllinae), frugívoras (Stenodermatinae e Carollinae) ou sanguívoras (Desmodontinae).

Em estudo comparativo entre as células MA-104 – de origem epitelial -, e as células de neuroblastoma murino, FU (1997) verificou que as células MA-104 foram mais eficazes no isolamento de vírus de morcegos insetívoros. O autor levanta a hipótese de que tais células têm maior número de receptores para os vírus de morcegos insetívoros porque estes têm uma mudança na cisteína 207 da glicoproteína do vírus rábico para um triptofano. Tal mudança sugere menor estabilidade à temperatura de 37°C; como essa variante do vírus tem um único tropismo e uma habilidade de replicar em temperatura mais baixa, a replicação do vírus na derme é aumentada, o que aumenta a sua capacidade de penetrar na fibra nervosa.

As observações de FU (1997) coincidem com os resultados do presente trabalho, em que o isolamento do vírus em espécies insetívoras foi maior com as células McCoy, com sensível diferença em relação às espécies que têm outros hábitos alimentares. Essa ocorrência pode estar relacionada à origem epitelial das células McCoy (NOGUEIRA, 1998; ATCC, 1985), o que possibilita que o vírus seja mais facilmente isolado em espécies com esse tipo de dieta.

Outro aspecto de interesse é a observação de grau de infectividade 3+ - portanto com o diagnóstico positivo para raiva - em espécies não hematófagas. Mas há registros, que remontam às décadas de 20 e de 30 do século XX, de morcegos não hematófagos com positividade para a raiva. BAER (1988) relata que Haupt e Rehaag (1921) constataram positividade para a raiva em morcegos frugívoros *Phyllostoma superciliatum* em Blumenau, Santa Catarina, durante a década de 20,

concomitantemente à descoberta de transmissão do vírus por morcegos hematófagos no Brasil (CARINI, 1919), e TORRES e QUEIROZ de LIMA (1935) e PAWAN (1936) diagnosticaram a raiva em morcegos frugívoros de Trinidad. O primeiro relato definitivo de diagnóstico positivo para raiva em morcegos não hematófagos foi realizado em *Port of Spain* (Trinidad) em 1931, em um exemplar da espécie Artibeus planirostris. Estudos transversais realizados em Trinidad demonstraram que 4% dos morcegos estavam infectados: a maioria desses animais era constituída por hematófagos, mas havia alguns de hábitos frugívoros ou insetívoros. Em 1953 um menino foi atacado por um morcego raivoso (*Lasarius borealis*) (SCARTTERDAY, 1954) e, a partir de então, as investigações especificamente voltadas à raiva em morcegos não hematófagos - principalmente nos Estados Unidos, no Canadá, no México e na América Central - tiveram início. Esses estudos foram liderado pelos pesquisadores do *Center for Diseases Control and Prevention*, nos Estados Unidos.

Na década de 1970, duas variantes antigênicas relacionadas ao vírus rábico foram encontradas em Lagos (Nigéria), e outra em Duvenhage (Pretória) (SHOPE, 1970; SCHNEIDER, 1973; MEREDITH, 1971). Esses dois vírus parecem representar um vírus com ciclo independente em morcegos frugívoros e insetívoros (SMITH, 1989), e sua transmissão para humanos e animais domésticos tem sido bem documentada (SCHNEIDER, 1973; 1985).

Na presente investigação, graus de infectividade 2+ e 1+ foram encontrados apenas em morcegos hematófago Desmodus rotundus: um indivíduo apresentou grau de infectividade 2+ no isolamento, e outros dois exemplares apresentaram grau 1+ em células de neuroblastoma murino. Já na cultura de células McCoy, apenas dois isolamentos com grau de infectividade 1+ foram constatados em D. rotundus. As espécies que mais apresentaram graus 2+ e 1+ foram T. brasiliensis, S. liliu e A. caudifera, em ordem decrescente, demonstrando que o vírus pode circular nessas espécies, apesar dos hábitos alimentares diferentes (insetívora, frugívora e nectarívora, respectivamente).

Em estudo ecológico sobre variantes epitópicas com anticorpos monoclonais, SMITH (1990) cita que a variante do vírus rábico encontrada em T. brasiliensis apresenta o mesmo padrão antigênico do vírus isolado em D. rotundus. Mas, como isso poderia ocorrer? É possível a transmissão entre espécies de morcegos de diferentes hábitos? Supõe-se que, em decorrência de contactos travados em abrigos comuns a diferentes espécies migratórias, podem ocorrer epizootias inter e intra-espécies (SMITH e BAER, 1988; SMITH, 1988).

Espécies representantes do gênero *Myotis* infectadas nos Estados Unidos têm sido consideradas como hospedeiras casuais, uma vez que três tipos diferentes de variantes foram encontradas, em seis indivíduos isolados dessa espécie, e tais variantes, por sua vez, foram encontradas em outras quatro espécies diferentes, relatam SMITH e BAER (1988). Ainda de acordo com esses autores, tais dados sugerem que pode ocorrer uma enzootia de algumas variantes entre as diferentes espécies (transmissão inter-espécies), envolvendo parte das espécies. Aparentemente, o mesmo ocorreu nas espécies que integram a amostra do presente trabalho. Todavia, devemos salientar que não foram utilizados anticorpos monoclonais, mas sim anticorpos anti-rábicos convencionais para uso no diagnóstico da raiva. Esse fato reforça a possibilidade de que o vírus rábico circule inter e intra-espécies, talvez não em todas espécies por falta de oportunidade de

contágio, ou porque o comportamento dos morcegos não favorece o contacto, ou porque a carga de vírus circulante não é suficiente para a transmissão.

3. VARIÁVEL INFECÇÃO VERSUS VARIÁVEL SAZONALIDADE

Observa-se, nas Figuras 3.6a e 3.6b, que os dois gráficos quase se sobrepõem, além de apresentarem as mesmas tendências. Essa semelhança leva-nos a crer que a sazonalidade observada é real para todas as espécies envolvidas, e que o pico de infecção ocorre no mês de agosto. Esse grau de infecção (3+) é compatível com a possível capacidade de transmissão viral com condições de provocar a doença. Já no mês de janeiro (período de chuvas) observa-se maior número de espécies com baixo grau de infecção (1+). Essa baixa infectividade provavelmente favorece a circulação do vírus em maior número espécies e maior número de indivíduos, mas não implica presença de doença, pois a carga viral é muito baixa. Tais constatações reforçam a tradicional e popular idéia de que o mês de agosto é o **mês do cachorro louco**. KREBS (1996) também observou a sazonalidade da infecção nos Estados Unidos, pois constatou aumento do número de morcegos com raiva do mês de janeiro (baixo) ao mês de agosto (alto), enquanto os casos de raiva em **racoons** (*Procyon lotor*) apresentavam três picos (trimodal): um na primavera (março-abril) e outros dois, de maior importância, em maio e outubro. Os **skunks** (*Mephitis mephitis*) apresentavam dois picos (bimodal): um no verão (maio) e outro, menor, em outubro.

BAER (1970) e CONSTANTINE (1967) encontraram diferentes incidências da doença, para diferentes espécies, em várias épocas do ano, nos Estados Unidos e no Canadá. As variações de incidência estão entre abril e outubro, ou seja, entre a primavera e o outono na América do Norte. No entanto, não é difícil compreender essas variações, uma vez que a América do Norte apresenta clima temperado. O presente estudo foi realizado na região sudeste brasileira - de clima tropical ou subtropical -, com temperaturas não extremas durante o ano. É bem provável que a regularidade sazonal observada corresponda à maior interação da mesma variante de vírus circulante entre as diversas espécies. Por isso foi possível isolar, ou melhor, identificar, uma proporção elevada de vírus rábico utilizando um só tipo de soro anti-rábico.

4. VARIÁVEL INFECÇÃO VERSUS VARIÁVEL SEXO

As Figuras 3.7a e 3.7b evidenciam que os machos carregam a infecção nas faixas 1+ e 2+ - conforme se observa na representação das células McCoy - e 1+ - como é possível visualizar na representação das células de neuroblastoma. Talvez não se observe a mesma tendência nas outras faixas de infecção em virtude do pequeno número representado. Todavia, a tendência retorna quando observamos as Tabelas 3.7 e 3.8 - que apresentam a distribuição sexual da infecção por espécie capturada - que apontam número de machos infectados 1+ bem superior ao de fêmeas, em ambos os sistemas de cultivos celulares.

5. VARIÁVEL INFECÇÃO VERSUS LOCAL DE CAPTURA

O Quadro 3.1 mostra os locais de captura mais constantes; não nos foi possível correlacionar o número de animais infectados ao local de captura. Entretanto, constatamos que as espécies coletadas eram freqüentemente capturadas no mesmo local e nas mesmas rotas de vôo, o que demonstra que os morcegos mantêm os mesmos abrigos. A espécie L. aurita foi a mais capturada em um único dia, e todos os indivíduos vieram da mesma caverna (Gruta do Sumidouro). Essa gruta tem comunicação, no seu interior, com a Gruta Colorida, onde foi capturada a maior parte dos exemplares de D. rotundus. A proporção de infectividade dessas duas espécies se mantém, principalmente nas faixas em que ela é mais freqüente (0 e 1+). Tal fato pode indicar que a circulação de vírus é baixa nessa caverna (Gruta Colorida). A recepção da Fazenda Intervalles parece ter sido o lugar em que a circulação de vírus apresentou carga viral mais elevada, pois foi desse local que veio o M. nigricans que apresentou grau de infecção 3+, e foi ali que foram capturados quase todos os Tadarida brasiliensis, Histiotus velatus e alguns exemplares de Sturnira lilium, talvez porque o espaço de circulação seja menor, facilitando o contacto. Os Histiotus velatus não apresentassem infecção significativa, os Tadaridas brasiliensis apresentavam infecção de grau 2+, mas há que se considerar que os T. brasiliensis foram capturados no mês de agosto, enquanto os H. velatus foram coletados, na sua maioria, no mês de janeiro. Os outros dois Sturnira lilium que apresentaram grau de infecção 3+ (McCoy) foram capturados em outro local - Gruta do Sumidouro -, mas no mês de agosto, no qual prevaleceu a incidência de casos com grau 3+. Já os D. rotundus e L. aurita (com graus de infecção 0 e 1+) capturados na Gruta Colorida e na Gruta do Sumidouro foram capturados majoritariamente nos meses de janeiro, abril e outubro, e nunca no mês de agosto. Esses fatos parecem demonstrar como ocorre a circulação dos animais e o provável contágio. De qualquer forma, não nos é possível concluir com exatidão essa idéia, mas podemos pensar em um desenho experimental que possa avaliar essa tendência.

6. PREVALÊNCIA DE VÍRUS RÁBICO

Entre os diferentes estudos sobre a epidemiologia da raiva em morcegos nos Estados Unidos, podemos mencionar aqueles de CHIELDS *et al.* (1994), que encontraram prevalência de 4,6%; de BAER (1992), que relata valores de prevalência diferentes em diferentes regiões dos Estados Unidos, com base nas informações de outros pesquisadores (TRIMARCHI, 1977, em Nova Iorque; EMERSON, 1986, no Colorado; BIGLER, 1975, na Flórida; CONSTANTINE, 1979, na Califórnia). Segundo tais autores, a prevalência varia de acordo com a espécie de morcego e com a região, e foram observados índices de 74% na espécie E. fuscus, no estado de Nova Iorque; de 36% na espécie T. brasiliensis, na Califórnia; e de 30% em L. borealis, na Flórida. Essas espécies, todas insetívoras, foram aquelas que maiores prevalências apresentaram. Por outro lado, as menores prevalências estão entre 0,5 e 2%, e também variaram de espécie para espécie mas, principalmente, de uma região para outra. Ou seja, uma mesma espécie pode apresentar valor elevado em determinada região e um valor insignificante em outra. Isso parece indicar que os fatores abióticos

podem influenciar os índices de prevalência do vírus em determinada espécie. Entretanto, essa não é uma verdade absoluta. É evidente que todos os exames de diagnóstico foram realizados em animais submetidos ao serviço de controle por uma – ou várias - das razões descritas a seguir: apresentavam história anterior de suspeição; apresentavam algum sintoma; haviam tido contacto com o vírus; haviam agredido, mordido ou arranhado algum animal doméstico ou ser humano. Assim, podemos considerar a hipótese de ocorrência de viés nas amostras analisadas em tais circunstâncias, o que nos leva a considerar que as prevalências apresentadas não são prevalências reais do reservatório silvestre.

Em trabalho publicado em 1999, PAPE relata a possibilidade de risco de transmissão de raiva em encontros entre os morcegos e o homem. Esse trabalho contemplou um período de 20 anos (1977-1996), mas só foram objeto de exame os animais suspeitos ou com comportamento aberrante. Dos 4470 morcegos testados, 685 (15%) tiveram diagnóstico como positivo para a raiva. O autor cita que o risco calculado foi de 2,1 vezes nos humanos, mas não foi comentada a técnica utilizada para o diagnóstico.

Os resultados de prevalência encontrados nesta investigação foram de 6% para a cultura de células de neuroblastoma murino, e de 15% para a cultura de células McCoy - para o nível de corte igual ou superior a 26%. Como tais valores são discrepantes para uma mesma amostra, podemos supor que a sensibilidade das duas metodologias é diferente – o que foi objeto de estudo da SEÇÃO 2. A possibilidade de animais doentes com raiva serem encontrados em uma população sadia é da ordem de 1% (SUGAY, 1966). Portanto, os valores por nós encontrados estão muito acima do padrão, a prevalência estimada, que considerou os resultados superiores a 3+ (75% de células infectadas), foi de 1,68% para as células N2A, e 2,52% para as células McCoy.

Portanto, todos os trabalhos sobre prevalência em morcegos realizados com o auxílio da metodologia de cultivo celular deveriam ser revistos, pois a padronização da técnica deve considerar O DIAGNÓSTICO POSITIVO PARA A RAIVA diferentemente do TESTE POSITIVO PARA A RAIVA. Segundo GRENIER e GARDNER (2000b), há diferença entre os valores do teste diagnosticado como positivo baseado num determinado ponto de corte (valor de *cut off*) que cada técnica deve conter.

Assim sendo, conclui-se que o valor do nível de corte é um valor arbitrário, que deveria ser definido pelo padrão ouro, que deve ser a prova biológica, pois essa prova tem a capacidade de reproduzir a doença. Já o isolamento em cultivo celular tem a capacidade de detectar se os indivíduos estão infectados, e de informar se o vírus rábico está circulando no ambiente. A possibilidade de medir e quantificar a infecção torna possível avaliar o nível de endemicidade da região.

O presente estudo identificou que a célula McCoy, além de ter sido validada com uma técnica de cultivo celular de referência (N2A), também teve a capacidade de definir o estado de pré-infecção da amostra de morcegos estudada, ou de pelo menos identificar uma subpopulação com outro *status* de infecção, conforme é observado na Figura 2.11b (SEÇÃO 2), além de avaliar o estágio da endemicidade da região (programa *freecalc*).

As informações obtidas por este modelo de estudo, se aperfeiçoadas e associadas a modelos de análise espacial - conforme realizou WYATT (1999) ao estudar a epizootia de raiva em **racoons**

(*Procyon lotor*) no estado de Nova Iorque (1993-1994) -, possibilitariam realizar intervenções tais como a vacinação em áreas específicas.

Estudos sobre a dinâmica de infecção viral que considerem a sazonalidade e a densidade populacional, poderiam ser desenvolvidos com simulações em modelos matemáticos especialmente desenvolvidos para o controle de epizootias, como nos trabalhos de ANDERSON (1981) e ANDERSON e MAY (1982 b), para o controle de raposas (*Vulpes vulpes*) na Europa. .

Sem dúvida, a aplicação da metodologia proposta no presente trabalho pode trazer avanços ao controle da raiva em programas de saúde pública e defesa animal, pois possibilitaria que vacinações fossem realizadas de maneira intensiva em determinadas regiões e, onde o risco fosse maior, os rebanhos poderiam ser monitorados por testes sorológicos. Assim, a eficácia dos resultados poderia ser melhorada, e os custos seriam racionalizados.

3.6. CONCLUSÕES

Considerando as informações constantes da literatura, e os resultados obtidos na presente investigação, parece-nos lícito concluir que:

- O vírus rábico apresenta uma sazonalidade, pois o mais alto grau de infecção ocorreu no mês de agosto, em ambos os sistemas de cultivos celulares, enquanto que o mês de janeiro foi aquele em que a circulação do vírus apresentou o menor grau de infectividade (1+), e o mês de março foi o que teve maior número de animais sem infecção.
- No Parque Estadual Intervales, a infecção rábica apresenta predileção pelos machos.
- Os morcegos insetívoros parecem desempenhar importante papel na manutenção do ciclo silvestre, pois o vírus foi freqüente principalmente nessas espécies, seguidas pelas espécies frugívoras e nectarívoras.

3.7 PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

- Os conhecimentos adquiridos com o presente estudo abrem uma variada gama de possibilidades para o conhecimento das relações inter e intra-espécies de caráter molecular, tais como análises fenotípicas (anticorpos monoclonais) ou análises genotípica (técnicas de análise do genoma), ou ainda a utilização de algum tipo de marcador viral (marcadores moleculares) para mapear a interação do vírus nas diferentes espécies de morcegos.
- A facilidade de isolamento do vírus rábico com as células McCoy torna viável a utilização de sofisticadas ferramentas no acompanhamento do processo de interação entre as espécies. Um exemplo seria a implatação de *chips* eletrônicos, associados a medidores eletrônicos colocados em diversos locais, principalmente em abrigos diurnos e

norturnos; esses medidores seriam recolhidos e lidos em programas de computador, possibilitando a criação de modelos matemáticos para estudos epidemiológicos mais avançados, como por exemplo traçar o mecanismo de transmissão do vírus com base no comportamento dos morcegos.

4. BIBLIOGRAFIA

Akakpo AJ. Le chien dans la société noire africaine: un réservoir de rage. In: Kuwert EK, Merieux C, Koprowski H, Bögel K, eds. ***Rabies in the Tropics***. Berlin: Springer Verlag, 1985:516-519.

Anderson Human rabies in the United States, 1960-1979: epidemiology, diagnosis and prevention. ***Ann Intern Med*** 1985;100:728-735.

Anderson R, May R. Coevolution of hosts and parasites. ***Parasitology*** 1982 a;85:411-426.

Anderson R, May R. Population biology of infectious diseases. In: May R, ed. ***Report of the Dahlem workshop on population of infectious diseases agents***. Berlin Heidelberg New York: Springer, 1982 b.

Anderson RM, May RM. Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts ***Proc R Soc Lond*** 1985;B:281-283.

Andral L, Artois M, Aubert MFA, Blancou J. Radiopistage de renard enrangés. ***Comp Immunol Microbiol infect Dis*** 1982;5:97S-108S.

Artois M. ***Contribution à l'étude de la vaccination orale des renards contre la rage***. Docteur Médecine Veterinary Thesis. Toulouse: École Nationale de Vétérinaire de Toulouse, 1987:158 pp.

Atanasiu P, Sisman J. L'aspect morphologique du virion rabique. ***Bull OIE*** 1967;67:521-533.

Atanasiu P, Gamet A, Robin Y, Salaün J-J. La rage. ***Études médicales*** 1979;3 et 4.

Atanasiu P, Perrin P. Microméthode immunoenzymatique de titrage des anticorps antirabiques: utilisation de la glycoprotéine rabique et la protéine A conjuguée à la peroxydase. ***Ann Microbiol (Inst Pasteur)*** 1979;130A:257-268.

Atanasiu P, Perrin P, Delagneau JF. Use of an enzyme immunoassay with protein A for rabies antigen and antibody determination. ***Develop Biol Stand*** 1980; 46:207-215.

Atanasiu P, Segre PPL, Mangans O. Étude comparative de vaccins rabiques inactivés obtenus à l'aide de cellules hétérologues diploïdes et polyplloïdes (HAK, BHK et Vero). ***Arch Inst Pasteur Tunis*** 1981;58:401-421.

Atanasiu P. Les rhabdoviridés; caractères généraux. Virus de la rage. In: J M, ed. ***Virologie médicales***. Paris: Flammarion, 1985:605-624.

ATCC-, ***Collection ATC. Catalogue of Cells Lines & Hybridomas***, 1985.

Bachmann P. Wild carnivore acceptance of baits for delivery of liquid rabies vaccine. **J wildl Dis** 1990;26:486-501.

Bacon P. A system analysis of wildlife rabies epizootics. **Wildlife**. London: Academic Press, 1985:109-130.

Baer GM, Shanta TR, Bourne GH. The pathogenesis of street rabies in rats. **Bull WHO** 1968;38:119-125.

Baer GM. Rabies insectivorous bats in the United States. **Public Health** 1970;85:637.

Baer GM. Oral rabies vaccination: an overview. **Rev Infect Dis** 1988;10:S644-S648.

Baer GM, Schaddock J, Quiron R, Dam T, Lentz T. Rabies susceptibility and acetylcholine receptor. **Lancet** 1990;335:664-665.

Baer GM. **The Natural History of Rabies**. Boca Raton- Florida: CRC Press Inc, 1991.

Bell J. Latency and abortive rabies. In: Baer GM, ed. **The natural History of Rabies**. New York: Academic Press, 1975:331-354.

Bigler WJ, Houff GL, Buff EE. Chiropteran rabies in Florida: A twenty-year analysis 1954-1973. **Am J Trop Med Hyg** 1975;24:347- 352.

Blajan L, Bögel K. Tendence et évolution générales de la rage dans le monde. In: Rosset R, ed. **Pasteur et la rage**. Paris: Ministère de l'Agriculture, 1985.

Bland JM, Altman DG. Statistical Methods for Assessing Agreement Between Two Methods of Clinical measurement. **Lancet** 1986;8:307-311.

Bourhy H, Perrin P, Hirose JAM, Lecocq E, Sureau P. Rapid rabies diagnosis. Proceedings of Sixth International Congress on Rapid Method and Automation in Microbiology and Immunology. Helsinki-Espoo Finland, 1990.

Bourhy H, Sureau P, Hirose JM. **Methods de laboratoire pour le diagnostic de la rage**. Paris, 1991.

Bourhy H, Lafon M, Sacramento D, Tordo N. Antigenic and molecular carcterization of bat rabies virus in Europe. **J Clin Microbiol** 1992;30:2419-2426.

Bourhy H, N T, M L, p S. Molecular diversity of Lyssavirus genus. **Virology** 1993;194:70-81.

Böhning D. CAMAN (**Computer-assisted analyses of mixtures**). Berlin -Germany, 1997.

Brass DA. Some aspects of rabies surveillance in bats. **NSS News** 1991;52-53.

Bredt A, et al. **Morcegos em áreas urbanas e rurais**. Brasília: Ministério da Saúde Fundação Nacional de Saúde, 1996.

Bredt A, Uieda W, Magalhães ED. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro oeste do Brasil (Mammalia Chiroptera). **Revta bras Zool** 1999;15:731-770.

Brochier B. Epidémiosurveillance de la rage en Belgique: bilan 1993. **Ann Méd Vét** 1994;138:199-204.

Brochier B. epidémio-surveillance de la rage en Belgique: recrudescence en 1994. **Ann Méd Vét** 1995;140:263-275.

Brochier B, Costy F, Dechamps P, et al. Epidémiosurveillance de la rage en Belgique: bilan 1995. **Ann Méd Vét** 1996 a;140:247-354.

Brochier B, Costy F, Pastoret P-P. Elimination of fox rabies from Belgium using a recombinant vaccinia-rabies vaccine: an update. **Vet Microbiol** 1996 b;46:269-279.

Cameron. A new probability formula for survey to substantiate freedom from disease. **Prev Vet Med** 1998;34:1-17.

Cameron. Two-stage sampling in surveys to substantiate freedom from disease. **Prev Vet Med** 1998;34:19-34.

Campanhã RA, Fowler HG. Roosting assemblages of bats in arenitic caves in remnant fragments of Atlantic forest in southeastern Brazil. **Biotropics** 1993;25:363-365.

Carini A. Sur une grande epizootic de rage. **Ann Inst Pasteur** 1911;25.

CDC. Human-to-human transmission of rabies via a corneal transplant- France. **MMWR** 1980;29:25-26.

CDC. Human-to-human transmission of rabies virus a corneal transplant- Thailand. **MMWR** 1981;30:473-474.

Childs JE, Trimarchi CV, Krebs JW. The epidemiology of bat rabies in New york State. **Epidemiol Infect** 1994;113:501-511.

Chopra JS, Banerjee AK, Murphy JMK, Pal SR. Paralytic rabies: a clinico-pathologic study. **Brain** 1980;103:789-802.

Cloutier D, Thomas DW. Carollia perspicillata. **Mammal. sp** 1992;417:1-9.

Constantine D. Rabies transmission by air in bat caverns. **CDC** Atlanta (Public Health Service publication) 1967.

Constantine DG. Bat rabies in the southwestern United States. **Public Health Rep** 1967;82:867-888.

Constantine DG. Bats in relation to health,welfare, and economy of man. In: Winsatt WA, ed. **Biology of bats**. New York: Academic Press, 1970:319-440 p.

Cortes V, Souza L, Uieda W, Figueiredo. Abrigos diurnos e infecção por morcegos em Botucatu. **Vet e Zool** 1994;6:179-186.

Costa WA. Vacinas contra raiva humana. São Paulo;2000 **Manual Técnico do Instituto Pasteur**. 2ª. 2000:8-12.

Cullor JS, Eenennaam Av, Gardener I, et al. Performance of various tests used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals. **J Assoc Official Anal Chem Int** 1994;77:862-870.

Cummings SR, Richard RJ. Optimum cutoff points for biochemical validation of smoking status. **Am J Public Health** 1988;78:574-575.

Curtis A. Using a spatial filter and geografic information system to improve rabies surveillance data. **Emerg Infect Dis** 1999;5:603-606.

DATASUS. **Fundação Nacional de Saúde**. <http://www.datasus.gov.br> [ago. 1998)

Dean AG, Dean AJ, Comlombier D, et al. **Epi-Info version 6: a word processing, data base, and statistics program for epidemiology on microcomputers**. Atlanta Georgia, GA USA: Center for Diseases Control and Prevention, 1994.

Eisenberg JF. **The mammalian radiations**. Chicago: University of Chicago Press, 1981.

Eisenberg JF. **Mammals of the Neotropics, the northern Neotropics:Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guyana**. Chicago: Chicago Univ Press, 1989:449 p.

Enoe C, Georgiadis MP, Johnson WO. Estimation of sensitivity and specificity of dianostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. **Prev Vet Med** 2000;45:61-81.

Ewer RF. **The carnivores**. Cornell: Cornell University Press, 1973.

Fekadu M. Latency and abortive rabies. In: Baer GM, ed. **The Natural History of Rabies**. Boca Raton Florida: CRC Press, 1991:191-198.

Fernandes MV. Irradiation of cells in tissue culture VII. Studies on the susceptibility to blue-tongue virus on radiation induced giant cells in vitro. **Z Zellforsch** 1959;50:433-443.

Fernandes M. Isolation and propagation of blue-tongue virus tissue culture. **Amer J vet Res** 1959:398-408.

Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of Hybridoma Monoclonal Antibodies in detection of antigenic Differences Between Rabies and Rabies-related Virus Proteins. I The Nucleocapsid Protein. **J gen Virol** 1980;48:97-104.

Fletcher RH, Fletcher SW. **Clinical Epidemiology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1988.

Forattini OP. **População, Ecologia Epidemiologia e Sociedade**. São Paulo: Edusp, 1992:54p.

Fraser GC, Hooper PT, Lunt RA, et al. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. **Emerg Infect Dis** 1996;2:327-331.

Fu ZF. Rabies and Rabies Research: past, present and future. **Vaccine** 1997;15:S20-S24.

Fuenzalida E, Palacios R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirábica. **Bol Inst bact Chile** 1955;8:3-9.

Fundação Florestal. <http://www.fundacaoflorestal.gov.br> [ago,2001]

Gaisler J. Ecology of bats. In: Stoddart D, ed. **Ecology of small mammals**. London: Chapman and Hall, 1979:281-342 p.

Gardner AL. Feeding Habits. In: Carter RJBKJDC, ed. **Biology of bats of the New World family Phyllostomidae**. Part II Special Publication of the Museum. Texas: Texas Tech University, 1977:1-364.

Gardner AL. Feeding Habits. In: Baker R, Jones J, Carter D, eds. **Biology of bats of the New World family Phyllostomidae**. Part II Special Publication of the Museum. Texas: Texas Tech University, 1977:1-364.

Gode GR, Bhide NK. Two rabies deaths after corneal grafts from one donor. **Lancet** 1988;2:791.

Goldwasser RE, Kissling A. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. **Proc Soc Exp biol med** 1958;98:219-

Goodwin GG, Greenhall AM. A review of the bats of Trinidad and Tobago. **Bull Amer Mus Nat Hist** 1961;122:187-302.

Greenhall AM, Schmidt U, Joerman G. *Dypphylla eucadata*. **Mammal sp** 1984;227:1-3.

Greiner M, Franke CR, Böhning D. Construction of intrinsic cut-off value for the sero-epidemiological study in Brazil: A new approach towards an unbiased estimation of prevalence. **Acta Tropica** 1994;56:97-109.

Greiner M, Gardner IA. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. **Prev Vet Med** 2000b;45:23-41.

Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation diagnostic tests. **Prev Vet Med** 2000a;45:3-22.

Greinner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. preventive **Veterinary Medicine** 2000;45:23-41.

Habel K. Evaluation of a mouse test for the standadization of immunizing power of antirabies vaccines. **Public Health Resp** 1954;55:1473-1487.

Hattwick MAW. Human Rabies. **Public Health Rev** 1974;3:229-254.

Haupt H. Durch fledermause verbricht seuchenhafte solwut unter veichbestand in Santa Catarina (Sud Brasilien). **Z Infek** 1921;21:104.

Hooper P, Lunt R, Gould A, et al. A new Lyssavirus - The first endemic rabies-related virus recognized in Australia. **Bull Inst Pasteur** 1997;95:208-218.

Houff SA, Burton RC, Wilson RW. Human-to--human transmission of rabies virus by corneal transplant. **N Engl Med** 1979;300:603-604.

Hummler K, Sokol F. Morphology of nucleoprotein components of rabies virus. **J Virol** 1968;2:1191-1199.

Hummler K, Atanasiu P. Electronic microscopy. **Laboratory Techniques in Rabies**. Genève, 1973

Hurst EW, Pawan JL. An outbreak of rabies in Trinidad. **Lancet** 1931;II:622-628.

Jackson H. Rabies in federal Republic of Germany. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 1982;5:309-313.

Kaplan C, Turner GS. Rabies: **The facts**. Oxford: Oxford University Press, 1986.

King A, Smith JS. Monoclonal Antibodies for Identification of rabies and non-rabies Lyssaviruses. **Laboratory Techniques in Rabies**. Geneve: WHO, 1992.

Kisling RE. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. **Proc Soc Exp Biol Med** 1958;98.

Koopman KF. Order Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM, eds. Mammal species of the World. **A taxonomic and geographic reference**. Washington: Smithsonian Institution, 1993:137-241.

Koprowski H. Visit to an Ancient Curse. **Sci Am Med** 1995;2:48-57.

Koprowski H. Lectures on rabies the occasion of "The year of Louis Pasteur". **Res Virol** 1996;147:381-387.

Kotait I. **Manual Técnico do Instituto Pasteur**. São Paulo, 2000.

Kraemer HC. **Evaluating Medical tests: Objective and Quantitative Guidelines**. In: Sage, ed. Beverly Hills CA, 1992:294 p.

Krebs JW. Rabies- Epidemiology, Prevention and Future Research. **J Mammal** 1995;76:681-694.

Krebs W. Rabies Surveillance in United States during 1995. **JAVMA** 1996;12:209-.

Kunz TH, August PV, Burnett CD. Harem social organization in cave roosting Artibeus jamaicensis (Chiroptera: Phyllostomidae). **Biotropica** 1983;15:133-138.

Lassie S, Wilson DE. Lonchorhina aurita. **Mammal species** 1989;347:1-4.

Lentz T, Burrage T, Smith A, Crick J, Tignor TG. Is the acetylcholine receptor a rabies receptor? **Science** 1982;215:182.

Lentz TL. Rabies virus receptor. **Trends Neurosci** 1985;8:360.

Lwanga S, Lemeshow S. **Sample size determination in health studies**. In: W.H.O, ed. Genève, 1991.

Mahan W. **An evaluation of relationship between caverdwelling bats and fox rabies in Appalachia**. Athens-Georgia: University of Georgia, 1973.

Marques R, Fabian ME. Ciclo reprodutivo de Tadarida brasiliensis (I Geoffoy, 1824) (Chiroptera Molossidae) em Porto Alegre, **I heringia** 1984;77:45-56.Brasil.

Matsumoto K, Myamoto S. Comparative studies between pathogenesis of street virus and fixed rabies virus. **J Esp Med** 1967;125:447-456.

McCracken GF, Brandbury JW. Social organization and kinship in polygynous bat, Phyllostomus hastatus. **Science** 1981;198:303-306.

Meredith CD, Rossouw AP, Koch HVP. An unusual case of human rabies thought to be chiropteran origin. **S Afr Med J** 1971;45:767.

Montagnon B-J, Fournier P, Vincent-Falquet JC. Un nouveau vaccin antirabique à usage humain-rapport préliminaire. In: Kuwert K, Merieux C, Koprowski H, Bögel K, eds. **Rabies in the tropics**. Berlin: Spreng Verlag, 1985:138-143.

Nilson MR, Nagata CA. Isolamento de vírus rábico do cérebro, glândulas salivares e interscapular, coração, pulmões e testículos de *Desmodus rotundus*, no Estado de São Paulo. **Arq Inst Biol** 1975;42:193-196.

Nogueira YL. Cytopathic effect on tissue culture caused by rabies virus. **International Conference on Impact of Viral Diseases on Development of Latin America and Caribbean Region**. Rio de Janeiro: Oswaldo Cruz Foundation, 1982:113.

Nogueira YL, Amaral CA. Rabies virus in McCoy cell line. Part II: Titration. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1992;52:17-21.

Nogueira YL. Rabies virus in McCoy cell line. Part I: Cytopathic Effect and Replication. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1992;52:9-16.

Nogueira YL. Adverse effect versus quality control of the Fuenzalida-Palacios antirabies vaccine. **Rev Inst Med trop S Paulo** 1998;40.

Nogueira YL. Morphometric analysis of McCoy cells inoculated with cerebrospinal fluid from patient with rabies. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1998;93:509-514.

Nowak RM. **Walker's Mammals of the World**. Baltimore: John Hopkins Univ Press, 1991.

Pape WJ. Risk for rabies transmission from encounters with bats. Colorado, 1977-1996. **Emerg Infect Dis** 1999;5:1-7.

Passing W, Bablok H. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures methods for comparison studies on clinical chemistry (Part I). **J Clin Chem Biochem** 1987;21:709-720.

Pastoret P-P, Frisch R, Blancou J, Wolff F, Brochier B, Schneider G. Campagne internationale de vaccination antirabique du renard par voie orale menée au grand-duché du Luxembourg, en Belgique et en France. **Ann Méd Vét** 1987;131:441-447.

Pawan JL. The transmission of rabies in Trinidad by the vampire bat. **Ann Trop Med Parasitol** 1936;30:101-.

Pawan JL. Paralysis as a clinical manifestation in human rabies. **Ann trop Med und Parasit** 1939;33:21-29.

Peracchi AL. Sobre os hábitos de Histiotus velatus (Geoffroy, 1824) (Chiroptera, Vespertilionidae). **Rev Brasil Biol** 1968;28:469-473.

Pereira MG. **Epidemiologia Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

Perrin E, Rolin PE, Sureau P. A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. **J Biol Stand** 1986;14:217-222.

Pike RM. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3.921. **Health Lab Sci** 1976;13:105-114.

Portnoï D, Favre S, Sureau P. Use of neuroblastoma cell (MNB) for the isolation of street strain rabies virus from field specimens. **CDC** 1982;6:35-36.

Redford KH, Eisenberg JF. The Southern Cone, Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. **Mammals of the Neotropics**. Chicago: Univ Chicago Press, 1992:430p.

Richardson M, Turner A, Warnock D, Llewellyn P. Computer-assisted rapid enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) in the serological diagnosis of aspergillosis. **J Immunol Methods** 1983;56:201-207.

Robbins AH, Niezgoada M, Levine S *et al*. Oral rabies vaccination of racoons (Procyon lotor) on the Cape Cod Isthmus, Massachusetts. **5th Annual International Meeting of Rabies in the Americas**, Niagara Falls, Ontario, Canada 1994; Abstracts,p. 29.

Rudd RJ, Trimarchi CV. Comparison of sensivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of street strain rabies virus. **J Clin Microbiology** 1987;1456-1458.

Ruprecht CE, Wiktor TJ, Johnston DH. Oral immunization and protection of racoons (Procyon lotor) with a vaccinia -rabies glycoprotein recombinant virus. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986;83:7947-7950.

Ruprecht CA, Dietzschold B. Editorial .Perspectives on rabies virus. **Lab Invest** 1987;57:603-608.

Ruprecht CE, Glickman LT, Spencer PA, Wiktor TJ. Epidemiology of rabies virus variants (differentiation using monoclonal antibodies and discriminant analysis. **Am J Epidemiol** 1987;126:298-309.

Ruprecht CE, Hamir AN, Johnston JH, Koprowiski H. Efficacy of a vaccinia-rabies glycoprotein recobinant virus vaccine in racoons (Procyon lotor). **Rev infect Dis** 1988;10:S803-S809.

Ruprecht C, Dietzschold B, Wunner W, Koprpowiski H. Antigenic relationships of lyssavirus. In: Baer G, ed. **The Natural History of Rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991:69-100.

Ruprecht C, Smith J, Fekadu M, Childs E. The Ascencion of Wildlife Rabies: A cause for Public Health Concern or Intervation? **Emerg Infect Dis** 1995;1:107-114.

Sacramento D, Bourhy H, Tordo N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Mol cell Probes** 1991;6:229-240.

Scatterday JE. Bats rabies in Florida. **Vet Med** 1954;49:133.

Schneider LG. Rabies group specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses. **J Virol** 1973;11:748.

Schneider LG. Oral immunization of wildlife against rabies: concept and first field experiments. **Rev Infect Dis** 1985;10:S649-S653.

Schoonjans F. **Medicalc.** Belgium, 1993-1998.

Shope RE. Two African Viruses serologically related and morphologically related virus. **J Virol** 1970;6:690.

Smith A, Tignor G, Emmons R, Woodie J. Isolation of field rabies strains in CER and Murine Neuroblastom cell culture. **Intervirology** 1978;9:359-361.

Smith A, Tignor GH. Host cell receptors for two strains of Sindbis virus. **Arch Virol** 1980;66:11-26.

Smith J, Summer J, Roumillat L. Enzyme immunoassay for rabies antibody in hybridoma culture fluid and its application to differentiation of street and laboratory strains of rabies virus. **J Clin Microbiol** 1984;19:769-774.

Smith JS. Monoclonal antibody studies rabies in insectivorous bats in United States. **Rev Infect Dis** 1988;10:S638-S643.

Smith JS. **Epizootiology of rabies in America.** JB Campbell and K M Chalton, 1988.

Smith JS. **Rabies virus epitopic variation: use in ecological studies.** In: Maramoch K, Murphy K, Shatkin A, eds. San Diego, 1989.

Smith J, Yager P, Bigler W, Hartwig CE. Surveillance and epidemiologic mapping of monoclonal antibody-defined rabies variants in Florida. **J wildl Dis** 1990;26:296-307.

Smith JS, King A. Monoclonal antibodies for identification of rabies and non-rabies lyssavirus: Department of Health and Human Services Public Health. **CDC** 1992.

Smith J, Oricari L, Yager P, Seidel H, Warner C. Epidemiological and historical relationships among 87 rabies isolated as determined by sequence analysis. **J Infect Dis** 1992;166:296-307.

Sokol F. Chemical composition and struture of rabies virus. In: Baer GM, ed. **The natural history of rabies.** Orlando: Academic Press, 1975:79-102.

Somoza D, S, Mossman. Evaluation and optimization of diagnostic tests using receiver operating characteristic analysis and information theory. **Int J Biomed Comput** 1989;24:153-189.

Steele JH, Fernandes PJ. History of rabies and global aspects. In: Baer GM, ed. **The natural history of rabies**. Boca Raton- Florida: CRC Press, 1991:1-24.

Sugay W, Nilsson MR. Isolamento do vírus da raiva em morcegos hematófagos do Estado de São Paulo, Brasil. **Bol Of Sanit Panamer** 1966;60:310-315.

Superti F, Derer M, Tsiang H. Mechanism of rabies virus entry into CER cells. **J gen Virol** 1983;65:781-189.

Sureau P, Rollin P, Wiktor TJ. Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: detection by monoclonal antibodies. **Am J Epidemiol** 1983;117:605-609.

Taddei V, Pedro W. Morcegos (Chiroptera , Mammalia) do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo: Diversidade de espécies. **VIII Seminário Regional de Ecologia**. São Carlos -São Paulo: Univ. Federal de São Carlos, 1998:911-919.

Torres S, Lima EQd. A raiva nos morcegos hematófagos. **Rev dep Nac Prod Anim braz** 1935;1935:385.

Trajano E. Ecologia de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do sudeste do Brasil. **Revta bras zool** 1985;2:225-130.

Trimarchi CV, Debbie JG. Naturally occurring rabies virus and neutralizing antibody in two species of insectivorous bats of New York State. **J wildl Dis** 1977;13:366-369.

Tsiang H. An in vivo study of rabies pathogenesis. **Bull Inst Pasteur** 1985;83:41-45.

Turner D. **The vampire bat: A field study in Behavior and ecology**. Baltimore: Johns Hopkins Univ Press.

Turner GS. **Currents concepts of immunology and pathogenesis of rabies**. Threat Rag. New York: J R Pattison, 1983:27-32p.

Uieda W, Harmani NMS, Silva MMS. Raiva nos morcegos insetívoros (Mollossidae) do sudeste do Brasil. **Rev Saúde Pública** 1995;29:393-395.

Uieda W. Biologia e dinâmica populacional de morcegos hematófagos. Curso de atualização em Raiva dos Herbívoros. Curitiba- PR, 1996:63-87.

Vivo Md, Gregorin R. **Mamíferos**. In: Leonel C, ed. Intervalos, Fundação para a conservação e a produção florestal do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2001:240p.

Voller A. Serodiagnosis of tropical parasitic diseases with special reference to the standardization of labelled reagent tests. In: Standardization IAoB, ed. **Develop Biol Stand**. Basel: S Karger, 1985: 3-9pp.

Wanderler A, Capt S, Kapperler A, Hauser R. Oral immunization of wildlife against rabies. **Ann Inst Pasteur Virol** 1985;136E:161-165.

Wanderler A, Nadin-Davis S, Tinline R, Ruprecht C. Rabies epidemiology : some ecological and evolutionary perspective. In: Ruprecht C, Dietzschold B, Koprowski H, eds. **Lyssavirus**. Berlin Heidelberg New York: Springer - Verlag, 1994.

Warner C, Whitfield S, Fekadu M, Ho H. Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome in situ formalin-fixed tissues. **J Virol Methods** 1997;67:5-12.

Webster W. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. **Can Vet Res** 1987;51:367-369.

Whitby J. Rabies diagnosis and the Central Veterinary Laboratory. **The Veterinary Record** 1996; 2:433.

WHO. World Survey of Rabies. World Health Organization 1993;27:1-37.

WHO. Two rabies cases following corneal transplantation. **Weekly Epidemiol Rec** 1994;44:330.

Wikler WG, Baker EF, Hopkins CC. An outbreak of non-bite transmitted rabies in laboratory animal colony. **Am J Epidemiol** 1972;95:267-277.

Wikler WG, Fashinell TR, Leffingwell L, Paxton H, Conomy JP. Airbone Transmission in laboratory worker. **JAMA** 1973;226:1219-1221.

Wiktor TJ, Fernandes MV, Koprowski H. Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI-38. **J immunol** 1964;93:353-366.

Wiktor TJ, Clark HF. Chronic rabies virus infection of cell culture. **Infect immun** 1972;6:988-995.

Wiktor TJ, Koprowski HK. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. **Proc Natl Acad Sci USA** 1978;75:3938-3942.

Wiktor TJ, Koprowski H. Antigenic variants of rabies virus. **J Exp Med** 1980;152:3938-3942.

Wilkins KT. Tadarida brasiliensis. **Mammal.sp** 1989;331:1-10.

Wilkinson G. Reciprocal food sharing in the vampire bat. **Nature** 1984;308:181-184.

Wilson DE. Ecology of Myotis nigricans (Mammalia: Chiroptera) on Barro Colorado Island, Panama Canal Zone. **J Zool, London** 1971;163:1-13.

Wyatt JD, Barker WH, Bennett NM, Hanlon CA. Human Rabies Postexposure Prophylaxis during a Raccoon Rabies Epizootic in New York, 1993 e 1994. **Emerg Infect Dis** 1999;5:415-423.

Youden D. Index for rating diagnostic tests. **Cancer** 1950;3:32-35.

Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots- a fundamental evaluation tool clinical medicine. **Clin Chem** 1993;39:561-577.