



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO
VÍRUS RÁBICO DOS ESTADOS DO RN, PB E PE**

WANEISSA BASÍLIO DE MENEZES

Médica veterinária

MOSSORÓ-RN-BRASIL

Agosto-2013

WANESSA BASÍLIO DE MENEZES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO
VÍRUS RÁBICO DOS ESTADOS DO RN, PB E PE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como
parte das exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto
Co-orientador: Prof.Dr. Paulo Eduardo Brandão

MOSSORÓ-RN-BRASIL

Agosto-2013

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

M543c Menezes, Wanessa Basílio de.

Características molecular de isolados dos vírus rábicos dos estados do RN, PB e PE. / Wanessa Basílio de Menezes. -- Mossoró, 2013.

63f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal. Área de concentração em Sanidade animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

1. Raiva. 2. Epidemiologia. 3. Nordeste do Brasil. I. Título.

CDD: 636.089

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza
CRB-15/452

WANESSA BASÍLIO DE MENEZES

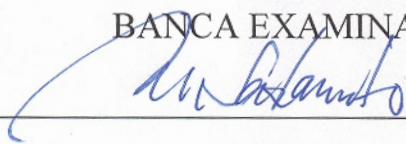
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO VÍRUS RÁBICO DOS ESTADOS DO RN, PB E PE

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como
parte das exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto
Co-orientador: Prof.Dr. Paulo Eduardo Brandão

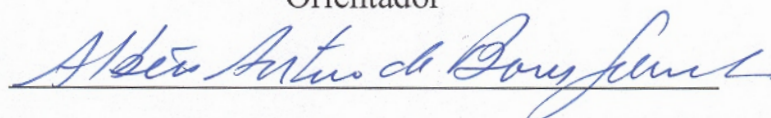
APROVADA EM 28/ 08 /2013

BANCA EXAMINADORA:



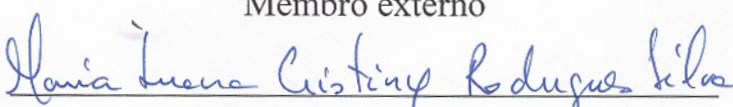
Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFERSA)

Orientador



Prof. Dr. Albério Antonio de Barros Gomes (UFCG)

Membro externo



Prof. Dr. Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva (UFCG)

Membro externo

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

WANESSA BASÍLIO DE MENEZES – Brasileira, solteira, nascida no Rio de Janeiro - RJ em 06/09/1988, graduou-se em Medicina veterinária pela Universidade Federal Rural do Semiárido (2010). Durante sua vida acadêmica foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de iniciação Científica-PIBIC/CNPq e PICI/CNPq nas áreas de anatomia dos animais silvestres e bioclimatologia comportamento e bem estar animal.

Dedico este trabalho a minha família, pelo apoio incondicional, força e incentivo. A família que me deu a melhor educação possível e me incentivou a lutar pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me fortalecer nos momentos difíceis.

Aos meus pais Francisco Alves Basílio e Kátia Rosane e meus irmão Willians e Wallace Basílio pelo incondicional apoio, confiança e incentivo.

Aos meus queridos sobrinhos, Gustavo e Sofia, que apesar da distância e os anos de ausência que me privaram de acompanhar os seus crescimentos, estão sempre presentes na minha lembrança.

À minha grande amiga Manuella Rocha que considero como irmã, pelos momentos de alegria, tristeza, ganhos, perdas, abraços e broncas compartilhadas ao longo da nossa amizade. Conte sempre comigo ☺

Aos meus queridos amigos da veterinária Adriene, Sávio, Rociene , Larissa, Patrícia por fazerem parte da minha vida . ADORO VOCÊS ☺

A Rebeca Falcão e Joelson por toda atenção e ajuda no início do trabalho. Pelas conversas e experiências compartilhadas.

Ao meu orientador Sidnei Sakamoto pela orientação, ensino e compreensão e por acreditar na minha capacidade em desenvolver esta dissertação.

Ao Professor Jean Berg pela amizade, confiança e auxílio durante toda a minha vida acadêmica. Serei sempre grata!

Agradeço ao LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Norte) e o profº Albério Gomes pelo apoio no fornecimento de amostras para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos professores do VPS, Evelise Telles, José Soares (Zezé), Leonardo Ritchzenhaim, Silvio Arruda, Paulo Brandão e Fábio Gregori pelos ensinamentos.

Agradecimento em especial ao professor Paulo Brandão pela oportunidade de pesquisa e por todo apoio na condução deste trabalho.

A técnica Rosana Cleide, do laboratório de zoonoses virais do VPS-FMVZ-USP, pela compreensão, experiência e auxílio durante as fases experimentais do projeto.

As técnicas do laboratório de zoonoses Bacterianas do VPS-FMVZ-USP, Zenaide e Gisele que me receberam de braços abertos e fizeram com que me sentisse em casa.

A Iracema pela grande ajuda nas horas de sufoco e a paciência e por compartilhar seu conhecimento.

A todos os amigos que fiz no VPS em especial Sheila, Cinthia, Alexandre (fininho), Hebert, Andrea, Carol, Patrícia, Léia, Cássia.

A Carla Monadeli e Isadora pela acolhida e amizade durante todo o período em que estive em São Paulo

A todos os animais experimentais que fizeram parte desta pesquisa. O meu respeito!

“Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise supera a si mesmo sem ficar ‘superado’. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência... Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um...”

(Albert Einstein)

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO VÍRUS RÁBICO DOS ESTADOS DO RN, PB e PE

MENEZES, Wanessa Basílio de. **Caracterização Molecular de isolados do vírus rábico dos Estados do RN, PB e PE**. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Produção e sanidade animal). Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

RESUMO: A raiva é uma enfermidade de origem viral, que afeta o sistema nervoso central, ocasionando encefalite e praticamente 100% de letalidade uma vez iniciados os sinais e sintomas. Este estudo descreve a caracterização genética das cepas de vírus rábico isoladas de amostras de animais domésticos e silvestres nos Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco no período de 2001 a 2012 visando contribuir para o entendimento da epidemiologia molecular da raiva. Foram analisadas 85 amostras positivas pela imunofluorescência direta e prova biológica cedida pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Norte (LACEN-RN) e o Laboratório de Raiva da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG-Campus Patos) e submetidas a RT-PCR direcionada ao gene da nucleoproteína e posterior sequenciamento. No presente estudo 67% das amostras apresentaram positividade na RT-PCR e 40% apresentaram sequências viáveis. O padrão de agregação obtido na árvore filogenética resultou na formação dos principais grupos esperados de amostras do vírus da raiva, ou seja, variante antigênica 2, 3 e variante de morcego insetívoro e amostra fixa (CVS). O estudo e a monitoração constante dessas variantes são de extrema importância, pois alterações genéticas podem levar a modificações protéicas, e com isso ineficiência vacinal.

Palavras-Chave: Raiva, epidemiologia, variantes, nordeste do Brasil.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RABIES VIRUS ISOLATES TAKEN FROM RN, PB AND PE STATES

MENEZES, Wanessa Basílio de. **Molecular characterization of rabies virus isolates taken from RN, PB and PE states.** 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Produção e sanidade animal). Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

ABSTRACT: Rabies is a viral disease that affects the central nervous system, causing encephalitis and almost 100% lethality once the signs and symptoms start. This study describes the genetic characterization of rabies virus strains isolated in samples from domestic and wild animals acquired in the states of Rio Grande do Norte, Paraíba and Pernambuco in the period of 2001 to 2012, aiming to contribute to the understanding of the molecular epidemiology of rabies. Eighty five samples positive through direct immunofluorescence and biological test, provided by the Central Laboratory of Public Health of Rio Grande do Norte (LACEN-RN) and the Rabies Laboratory of the Federal University of Campina Grande (UFCG-Campos Patos) were analyzed, and underwent RT-PCR directed to the nucleoprotein gene and subsequently sequencing was performed. In this study 67% of samples were positive in RT-PCR and 40% presented viable sequences. The aggregation pattern obtained in the phylogenetic tree resulted in the formation of the main expected groups of rabies virus samples, i.e., antigenic variants 2, 3; insectivorous bat variant; and fixed sample (CVS). The study and constant monitoring of these variants are extremely important, since genetic changes can lead to protein modifications, and with it vaccine inefficiency.

Key words: Rabies, epidemiology, viral variants, northeastern Brazil.

SUMARIO

1.INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA	18
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES	20
3.3 GENOMA DO VÍRUS	21
3.4 SENSIBILIDADE DO VÍRUS DA RAIVA	23
3.5 ASPECTOS EPIDEMIOLOGIOLÓGICOS.....	23
3.6 TRANSMISSÃO	28
3.7 PATOGENIA.....	29
3.8 SINAIS CLÍNICOS	30
3.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	31
3.10 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 AMOSTRAS.....	34
4.2. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO PELO MÉTODO DO REAGENTE	36
4.3. REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA O GENE N	37
4.4. VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DA RT-PCR	38
4.5. SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA	38
5. RESULTADOS	43
5.1 RT-PCR PARA O GENE CODIFICADOR DA NUCLEOPROTEÍNA (N).....	43
5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE N	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rhabdovirus e organização do genoma. O genoma tem uma sequência líder e os genes para as cinco proteínas estruturais. Os genes são separados por curtas sequências intergênicas.....	22
Figura 2. Raiva humana por espécie agressora, Brasil, 2006 a 2012	24
Figura 3. Notificação de raiva animal no Brasil, 1986 a 2012.	25
Figura 4. Raiva humana no Brasil de acordo com o ciclo de transmissão, 1986 a 2012.	26
Figura 5. Mapa do Brasil e da região nordeste e em destaque os Estados do RN, PB e PE. ...	34
Figura 6. Árvore filogenética construída com o método de <i>neighbor-joining</i> através do modelo de substituição <i>maximum composite likelihood</i> (<i>Software Mega v. 5</i>) para a região parcial (249 nucleotídeos) do gene codificador da proteína N do vírus da raiva. As amostras apresentam a identificação <i>accession number</i> / ano /amostra-hospedeiro. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de “ <i>bootstrap</i> ”, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras deste estudo estão precedidas por um triângulo preto.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-Taxonomia, distribuição geográfica e potenciais vetores e reservatórios dos Lyssavirus.....	19
Quadro 2-Amostras do SNC utilizadas, com suas respectivas passagens em camundongos, animais hospedeiros, ano de coleta e origem geográfica.....	35
Quadro 3- Sequência dos Iniciadores (“primers”) utilizados no protocolo para obtenção de um amplificado de 249 pb do gene N do vírus da raiva.	38
Quadro 4 - Sequências do gene N de vírus da recuperadas do <i>Genbank</i> , utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo <i>acession number</i> , identificação da amostra, local de origem e espécie hospedeira São Paulo, 2013.....	40
Quadro 5 - Amostras do SNC utilizadas, com suas respectivas passagens em camundongos, animais hospedeiros dos quais foi realizado RT-PCR e sequenciamento para o gene N, ano de coleta e origem geográfica.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitro

aa- aminoácidos

Ac- anticorpos

AcMs- anticorpos monoclonais

a.C- antes de cristo

BLAST/n- Basic Local Alignment Search

cDNA- DNA complementar

ddATP- dideoxynucleotídeo adenosina trifosfato

ddCTP- dideoxynucleotídeo citosina trifosfato

ddGTP- dideoxynucleotídeo guanidina trifosfato

ddTTP- dideoxynucleotídeo timina trifosfato

DEPEC- Dietil-pirocarbonato

DNA- ácido desoxirribonucleico

dNTP- desoxynucleotídeo trifosfato

DTT-Dithiothreitol

IFD- imunofluorescência direta

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MMLV- transcriptase reversa

mL – mililitro

NJ- Neighbor- joining

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS- Organização Pan- americana de saúde

PB-Paraíba

PE-Pernambuco

RN- Rio Grande do Norte

r.p.m – rotações por minuto

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

INTRODUÇÃO

A raiva é uma das doenças mais antigas conhecida pelo homem, muitas vezes misturadas com o folclore e crenças religiosas (WASIK; MURPHY, 2012). Os primeiros registros encontrados datam do século XXIII a.C. na Mesopotâmia, citada no Código de Eshnunna. A palavra raiva deriva do latim *rabere* “fúria”, “delírio” e do sânscrito *rabhas* que significa “torna-se violento” e , da palavra grega *lyssa*, que deu origem ao nome do gênero *lyssavirus*, ao qual o vírus da raiva é pertencente (WUNNER, 2007).

A raiva é uma enfermidade de origem viral, que afeta o sistema nervoso central, ocasionando encefalite e praticamente 100% de letalidade uma vez iniciados os sinais e sintomas. É um grave problema de saúde pública, pois não é somente contagiosa de animal para animal, mas também de animal para o homem. Por isso é considerada uma das mais graves zoonoses (WHO, 2005). Estima-se que as perdas anuais de bovinos por raiva sejam de aproximadamente 40.000 a 50.000 cabeças, que equivalem aproximadamente a 37,5 milhões de dólares (KOTAIT et al. 2010). Está presente em todos os continentes, com exceção da Antártica e Oceania. No nordeste é a doença infecciosa mais importante, que afeta o sistema nervoso central de animais (RIET, 2003).

Os Lyssavirus são frágeis e não conseguem manter-se no ambiente. A ocorrência da doença num determinado local depende da existência de vetores na região (TAKAOKA *et al*, 2003),O vírus é transmitido através da saliva, principalmente, por mordidas, os hospedeiros mais importantes na transmissão da doença são os carnívoros e os quirópteros (MS, 2009) Apesar dos relatos de infecção humanos por aerossóis contaminados, em cavernas densamente povoadas por morcegos, esta via de transmissão nunca foi comprovada cientificamente até que DAVIS e colaboradores (2007), reproduziram a transmissão aerógena em laboratório. A transmissão inter humana é improvável, mas há casos recentes de manifestação da doença na Alemanha, Canadá e Estados Unidos após transplante de órgãos cujos doadores, ao que se descobriu depois, estavam infectados (VORA et. al, 2013; MAIER et al., 2010)

Considerava-se, há alguns anos, que a raiva possuía três ciclos: urbano, rural e silvestre. Atualmente inclui-se outro os morcegos, chamado de ciclo aéreo. Apesar de a raiva estar fortemente associada aos cães, tem ocorrido um crescente aumento do número de casos pelos morcegos. O grande número de bovinos, que servem de alimento para esses animais, a disponibilidades de abrigos, cavernas, água, tem contribuído para a dispersão do vírus (TAKAOKA *et al*, 2003).

A primeira observação vinculando a raiva a morcegos hematófagos no Brasil foi feita por Carini em 1911, ao observar mortes nas duas margens do rio Itajaí, não sendo possível o tráfego de cães, relacionou os morcegos com a transmissão do vírus, o que só foi confirmado posteriormente. A primeira morte humana ocasionada por morcegos foi relatada 20 anos depois em Trinidad. Os morcegos insetívoros foram tidos como reservatório do vírus da raiva somente em 1953 na Flórida. Após esse fato vários casos também foram relatados sendo ocasionados por morcegos insetívoros na literatura (COSTA *et al.*, 2000)

Nos países em desenvolvimento os cães são os principais reservatórios, porém na América do norte e Europa devido aos intensos programas de vacinação, o vírus mantém seu ciclo principalmente em animais silvestres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Na América do Sul a raiva ocorre em surtos cíclicos e é geralmente transmitida pelo morcego hematófago, *Desmodus rotundus*, considerado o de maior importância epidemiológica (ACHA; SZYFRES, 2003). Estudos mostram que os gêneros/espécies de morcegos não hematófagos com maior importância para transmissão da raiva são: *Tadarida brasiliensis*, *Myotis sp.*, *Lasiurus sp* e *Artibeus sp* (KOTAIT *et al*, 2007).

Até o presente momento não há nenhum tratamento eficaz de animais raivosos. Portanto qualquer animal que sabidamente apresente a doença deverá ser sacrificado. A única forma disponível de combate a esta doença é a preventiva, através de vacinações dos animais com vacinas anti-rábicas. No Brasil a campanha de vacinação em massa para cães e gatos foi iniciada em 1981 e desde então contribui para o controle da raiva no país. Estima-se que o Governo do Brasil gaste anualmente US\$ 28 milhões na profilaxia e controle da raiva, apenas com vacinas de uso humano e veterinário para cães e gatos, imunoglobulinas, diagnóstico laboratorial, treinamento de recursos humanos e campanhas de vacinação animal. Neste valor não estão incluídas as despesas relacionadas à prevenção da raiva transmitida pelos morcegos hematófagos, insetívoros e herbívoros (CHILDS, REAL, 2007).

O Brasil, assim como em outros países da América Latina, esforça-se para reduzir a raiva humana através das campanhas de vacinação, mas é provável que a raiva silvestre, por ser mantida por diversos hospedeiros, venha emergir como um problema cada vez mais significativo (WADA *et al*, 2011). As autoridades de saúde pública necessitam adequar os esforços da vigilância em resposta as mudanças na demografia da doença (BERNARDI *et al*, 2005). O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular aplicadas a vigilância epidemiológica permitem a associação das variantes circulantes de vírus da raiva com as espécies transmissoras. Dessa forma, diversas pesquisas estão sendo realizadas para a caracterização molecular e filogenética do vírus rábico, por meio do seqüenciamento total ou parcial do gene N e G. Assim sendo, faz-se necessário cada vez mais o estudo e caracterização das cepas circulantes na região para um maior entendimento da raiva, auxiliando na tomada de decisões em relação a sua prevenção e controle.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar geneticamente amostras de vírus rábico isoladas de animais domésticos e silvestres e contribuir para o entendimento da epidemiologia molecular da raiva nos Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco no período de 2001 a 2012.

2.2 ESPECÍFICOS

- Estudar a diversidade molecular das amostras de vírus da raiva provenientes de animais domésticos e silvestres no Estado do Rio Grande do Norte e Paraíba e Pernambuco.
- Comparar as seqüências nucleotídicas, com base no sequenciamento parcial do gene codificador da nucleoproteína, obtidas entre isolados analisados neste com outras amostras de vírus isoladas disponíveis no GenBank, utilizando métodos de análise filogenética.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA

O Vírus da raiva é pertencente à família Rhabdoviridae, gênero Lyssavirus e espécie *Rabies vírus* (RABV), junto com as famílias Paramyxoviridae, Filoviridae e Bornaviridae, constitui a ordem Monomegavirales. Possui como características, molécula única de RNA polaridade negativa, linear, não segmentado (WUNNER, 2002). A família Rhabdoviridae está subdividida em: dois sub-grupos de vírus de plantas, um grupo de vírus de peixe e três gêneros de vírus de mamíferos - Ephemerovirus, vírus da febre efêmera dos bovinos, vesiculovírus cujo protótipo é o vírus da estomatite vesicular e o Lyssavirus, representado pelo vírus da raiva e aparentados ao vírus da raiva (ICTV,2013).

O gênero *Lyssavirus* possui, atualmente, onze espécies distintas, e estas possuem a capacidades de produzir encefalites e sintomatologias semelhantes ao vírus da raiva. As quatro primeiras espécies coincidem com os sorotipos 1 a 4, anteriormente assim denominados. O RABV (genótipo 1), que é o vírus clássico da raiva, O *Lagos bat virus* (LBV/ genótipo 2), isolado de morcego frugívoro da região do Lagos na Nigéria, o *Mokola virus* (MOKV/genótipo 3), de mussaranhos (*Crocidura* sp) e humanos na Nigéria, assim como de felinos do Zimbabwe e Etiópia, até o presente momento, o único Lyssavirus não isolado de quirópteros. O *Duvenhage virus* (DUVV/genótipo 4), isolado de humano e morcegos insetívoros da África do Sul e Zimbabwe, *European bat lyssavirus 1* (EBLV1/genótipo5), de morcegos do gênero *Eptesicus*, *European bat lyssavirus 2* (EBLV2/genótipo 6), de morcegos do gênero *Myotis*, *Australian batlyssavirus* (ABLV/ genótipo 7), de morcegos frugívoros e insetívoros (*Megachiroptera/Microchiroptera*). A partir de 2009 foram definidas pelo comitê internacional de taxonomia viral mais cinco genótipos virais: *Aravan virus* (ARAV/genótipo 8), isolada da espécie *Myotis blythi* na região do Quirguistão na Ásia Central, *Khujand vírus* (KHUV/genótipo 9), isolada de morcego *Myotis mystacinus* no Tajiquistão, *Irkut vírus* (IRKV/genótipo 10), isolado do morcego *Murina leucogaster* na província de Irkutsk-Russia, *West caucasian bat virus* (VWCB/ genótipo 11), isolado de morcego *Miniopterus schreibersii* na região de Krasnodar na Rússia (CALISHER; ELLISON,2012; ICTV,2013)

Kuzmin et al (2005) e Freuling et al.(2011) propõem o Shimoni bat virus, proveniente de morcegos africanos *Hipposideros commersoni* do leste da África e o *Bokeloh bat lyssavirus*, proveniente do morcego *Myotis nattererii* da Europa como novas espécies virais, respectivamente .

Os Lyssavirus são divididos em filogrupos, baseado em técnicas modernas de caracterização dos genes da nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e glicoproteína (G), além dos 11 genótipos classificados. O filogrupo I, inclui os genótipos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e o filogrupo II, os genótipos 2, 3 e 11, como observado no quadro 1. O filogrupo I, quando inoculado em camundongo , provoca sinais característicos de raiva, enquanto isso não ocorre no filogrupo II. Estudos revelaram que existe uma variação nas propriedades biológicas como a indução de apoptose, reconhecimento celular, em relação à patogenicidade entre os filogrupos e com relação à imunidade, a neutralização cruzada ocorre somente dentro do filogrupo, mas não entre filogrupos (BADRANE et al., 2001).

Quadro 1-Taxonomia, distribuição geográfica e potenciais vetores e reservatórios dos Lyssavirus.

Espécies	Filogrupo	Nome	Abreviatura (ICTV)	Distribuição	Potencial vetor/Reservatório
1	I	Rabies vírus	RABV	Mundial (exceção de algumas ilhas)	Carnívoros (mundo) e morcegos (Américas)
2	II	Lagos bat vírus	LBV	África	Morcegos frugívoros (<i>Megachiroptera</i>)
3	II	Mokola vírus	MOKV	África	Desconhecido (isolado de musaranhos)
4	I	Duvenhage vírus	DUVV	África do Sul	Morcegos insetívoros
5	I	European bat lyssavirus 1	EBLV-1	Europa	Morcego insetívoro (<i>Eptesicus serotinus</i>)
6	I	European bat Lyssavirus 2	EBLV-2	Europa	Morcego insetívoro (<i>Myotis sp</i>)
7	I	Australian bat lyssavirus	ABLV	Austrália	Morcegos insetívoros e frugívoros (<i>Megachiroptera/Microchiroptera</i>)
8	I	Aravan vírus	ARAV	Ásia central	Morcego insetívoro (isolado de <i>Myotis blythi</i>)
9	I	Khujand vírus	KHUV	Ásia central	Morcego insetívoro (isolado de <i>Myotis mystacinus</i>)
10	I	Irkut vírus	IRKV	Leste da Sibéria	Morcego insetívoro isolado de <i>Murina leucogaster</i>)
11	II	West caucasian	WCBV	Região do Cáucaso	Morcego insetívoro (isoladode <i>Miniopterus schreibersi</i>)

		bat vírus			
Proposto	?	Shimoni bat vírus*	SHIBV	Kenya	Morcego insetívoro (isolado de <i>Hipposidero commersoni</i>)
Proposto	?	Bokeloh bat lyssavirus*	BBLV	Europa	<i>Myotis nattereri</i>

ICTV = Comitê internacional de taxonomia viral (www.ictvonline.org)

* espécie proposta (SHIBV: Kuzmin et al., 2005, BBLV: Freuling et al., 2011)

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES

A tipificação antigênica com anticorpos monoclonais, foi desenvolvida por Victor & Koprowski desde 1978 e, mais recentemente, é feita analisando-se a sequência nucleotídica do vírus através de técnica de biologia molecular. Esses dados cruzados com o da vigilância epidemiológica auxiliam na identificação do reservatório animal envolvido e contribuem na tomada de decisão para controle do foco (COSTA, 2000).

A caracterização antigênica de variantes é realizada por meio de testes de imunofluorescência indireta com a utilização de anticorpos monoclonais (AcMs) contra a nucleoproteína viral. A multiplicação do vírus é feita através no sistema nervoso dos camundongos ou em cultivos celulares, submetidos à reação frente a painéis de AcMs, fornecidos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Atlanta, EUA (DIAZ et al., 1994).

O painel estabelecido pelo CDC em conjunto com a Organização Pan-Americana de Saúde permitiu um maior conhecimento a respeito das variantes rábicas circulantes no Brasil. O painel é constituído de oito AcMs, define 12 perfis antigênicos e destes, 5 já identificados no país, duas relacionadas a cães e três a morcegos. São elas as variantes: 2, encontrada principalmente em cães, 3 de morcegos *Desmodus rotundus*, 4 de morcego insetívoro *Tadarida brasilienses*, 5 de cachorro do mato *Cerdocyon thous* e a 6 de morcego insetívoro *Lasiurus cinereus*. Algumas amostras não foram compatíveis com esse painel (FAVORETTO et al., 2002, SOUZA, 2009). No Estado do Ceará- Brasil, foi relatada uma nova variante, não compatível com os AcMs existentes, a fonte de exposição está associada ao *Callithrix jacchus*, vulgarmente conhecido como sagui do tufo branco (MORAIS et al., 2000; FAVORETTO et al., 2001).

Entretanto, além do fato de não reconhecer todas as variantes virais, a técnica de AcMs gera resultados difíceis de interpretar em amostras intimamente relacionadas antigenicamente. As técnicas de sequenciamento genético superam essas limitações.

3.3 GENOMA DO VÍRUS

Os lyssavirus, como outros rabdovirus, consistem essencialmente de RNA (2% a 3%), proteínas (65% a 75%), lipídios (15% a 25%) e carboidratos (3%). O vírus da raiva apresenta morfologia semelhante a uma projétil de arma de fogo, seu comprimento médio é de cerca de 130-180 nm e 70-80 nm de diâmetro. As espículas do envelope, glicoproteínas, possuem 9 nm. Conforme representado na Figura 1, o genoma do vírus da raiva possui tamanho aproximado de 12 Kb e massa molecular de $4,6 \times 10^6$ kDa, codifica cinco proteínas diferentes, na seguinte ordem: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P, NS ou M1), a proteína da matriz (M ou M2), a glicoproteína (G) e a proteína L (um RNA polimerase) (figura 1). O gene possui ainda duas regiões não codificantes, uma situada entre os genes que codificam M e G e outra entre os genes que codificam G e L, esta última chamada psi (ψ). Sugere-se que representa um pseudogene, já que apresenta os sinais de início e parada de transcrição viral, porém até o momento não foi realizado nenhum isolamento protéico proveniente dessa região (FAUQUET et al., 2004)

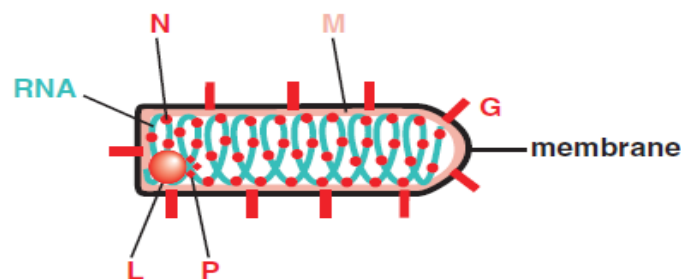
A partícula viral é composta por duas partes, o ribonucleocapsídeo e o envelope. O ribonucleocapsídeo um cilindro denso composto por uma fita simples de RNA genômico não segmentado senso negativo, associado a três proteínas: a nucleoproteína (N), associada ao RNA viral, é a mais conservada em termos de similaridade de sequências de aminoácidos dentro dos genótipos, uma importante razão para sua maior conservação está ligada a sua função chave para replicação viral, a proteína P (NS ou M1), é uma fosfoproteína, interage com as proteínas N e L participa do processo de encapsidação e transporte axonal e a proteína L, que é uma RNA polimerase, é a maior proteína do vírus, com 2.114 aminoácidos (aa) e peso molecular de 244,2 kDa, responsável pelas atividades enzimáticas necessárias a transcrição e replicação do RNA viral. (WUNNER, 2002, 2007).

O envelope é constituído por uma bicamada lipídica associada a duas proteínas: A proteínas de Matriz (M ou M2), importante no brotamento e na fase de maturação viral e a

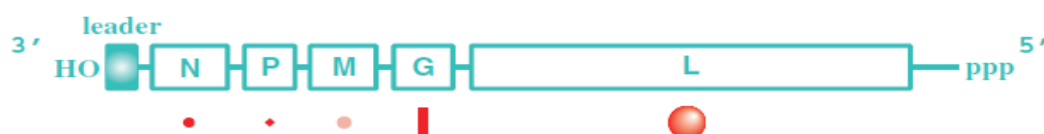
glicoproteína (G), uma proteína transmembrana que forma espículas que se projetam na superfície viral. É responsável pela indução dos anticorpos neutralizantes, sendo alvo destes e dos linfócitos T helper e citotóxicos, pela fixação da partícula viral nos receptores celulares, participando da endocitose do vírus e da fusão da membrana viral com a vesícula endossomal. (WUNNER, 2007).

A RNA polimerase viral não possui atividade corretiva de inserção dos nucleotídeos, o que promove certa heterogeneidade nas sequências do vírus da raiva, além disso, outros fatores estão envolvidos: a duração da infecção, a via de transporte, carga viral, a resposta imune do hospedeiro e a interação com proteínas virais. A heterogeneidade na estrutura populacional dentro de indivíduos isolados, muitas vezes é referida como quasiespécies. Os diferentes genomas ocasionados pela distribuição randômica das mutações aumentam rapidamente com os sucessivos ciclos de infecção em outros hospedeiros. Como resultado desta alta instabilidade genômica, populações de quasiespécies virais podem apresentar mutações específicas que podem caracterizá-los como fenótipos distintos com relações específicas como determinado hospedeiro (KISSI *et al.*, 1999).

Virion components



Genome organization and gene products



Fonte: CARTES; SAUNDERS (2007, p.177)

Figura 1. Rhabdovirus e organização do genoma. O genoma tem uma sequência líder e os genes para as cinco proteínas estruturais. Os genes G(glicoproteína), M (proteína da matriz), N (nucleoproteína), L (RNA polimerase), P (fosfoproteína) são separados por curtas sequências intergênicas.

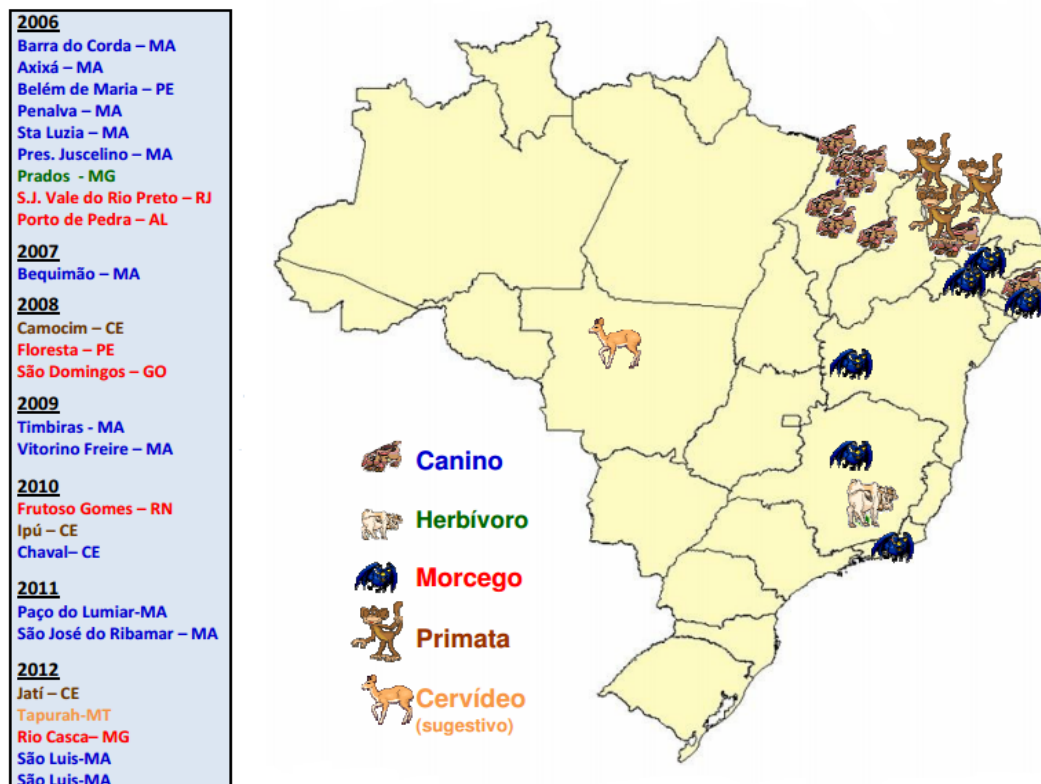
3.4 SENSIBILIDADE DO VÍRUS DA RAIVA

O vírus da raiva é sensível a radiação ultravioleta, aos solventes de lipídeos (sabão, detergente éter, clorofórmio e acetona), etanol a 45-70%, preparados iodados, formol, compostos de amônia quaternária, ácidos com $\text{pH} < 3$ e bases com $\text{pH} > 11$. São resistentes à dessecação, assim como a congelamentos e descongelamentos sucessivos, relativa estabilidade a um pH entre 5-10. O vírus é rapidamente inativado a temperaturas elevadas sendo inativado a 60 °C em 35 segundos; a 4 °C, se mantém infectivo por dias; a -70 °C ou liofilizado (4 °C), se mantém durante anos (COSTA, 2000.).

3.5 ASPECTOS EPIDEMIOLOGIOLÓGICOS

A raiva está presente em todos os continentes, a exceção Oceania e Antártica. Alguns países como: Japão, Taiwan e algumas ilhas do Pacífico, Hawaí, Reino Unido, algumas ilhas das Antilhas e do Atlântico obtiveram sucesso na erradicação da doença (TAKAOKA *et al*, 2003), a alta capacidade de adaptação do vírus, com o qual adota reservatórios de diferentes espécies, favorece essa ampla distribuição geográfica (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007). O vírus da raiva é mantido em ciclos epidemiológicos que são divididos didaticamente em urbano, rural e silvestre, atualmente inclui-se o chamado ciclo aéreo que diz respeito aos morcegos hematófagos ou não (TAKAOKA *et al*, 2003).

O ciclo urbano tem como principal hospedeiro o cão, sendo primariamente mantido na população canina, embora outros animais domésticos sejam infectados, como os gatos. . Com as intensas campanhas de vacinação anti-rábicas e socioeducativas para a posse responsável de animais de companhia, tem-se conseguido controlar e até mesmo erradicar a raiva urbana em algumas cidades (WUNNER; BRIGGS, 2010). Atualmente os casos de raiva ocasionada por cães estão concentrados principalmente nas Regiões Norte e Nordeste (figura 2). No Maranhão foram diagnosticados dois casos em cada ano respectivamente 2009, 2011 e 2012 (MS 2010; BRASIL, 2012), No Ceará foi notificado um caso em 2010 e outro em 2013 (AGUIAR, 2011; NUNES; ANSELMO; SILVA, 2012).

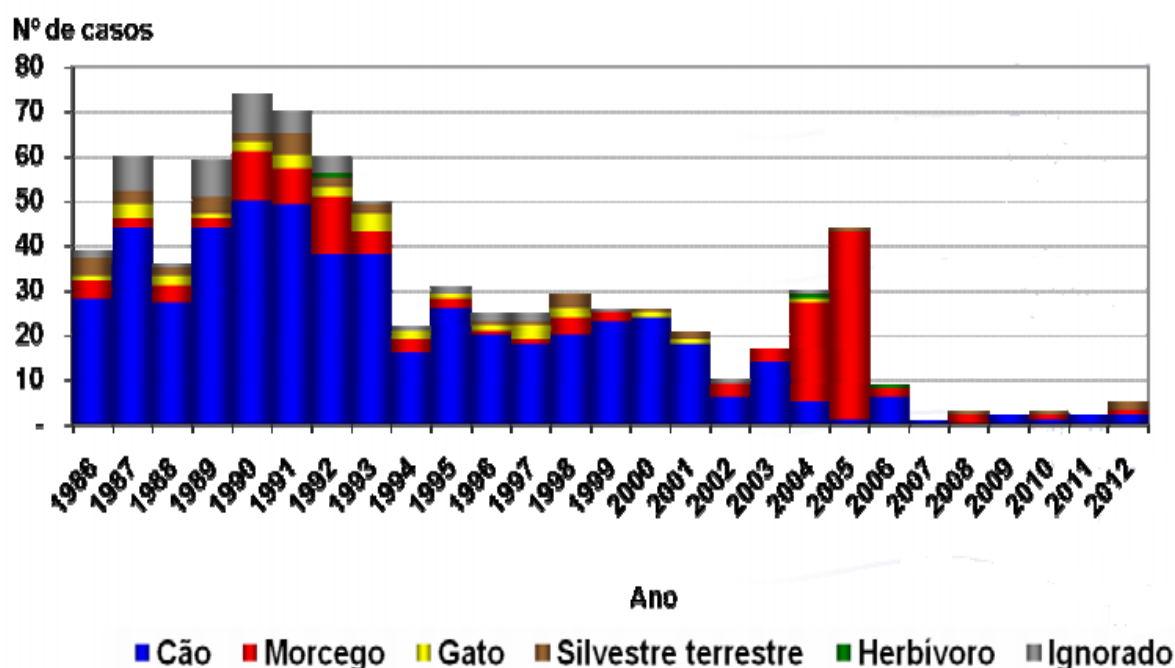


Fonte: SVS/MS, 2012

Figura 2: Raiva humana por espécie agressora, Brasil, 2006 a 2012

No Brasil a situação epidemiológica da raiva é heterogênea e, historicamente, as regiões Norte e Nordeste são responsáveis por cerca de 80% dos casos registrados no Brasil. De acordo com Miranda, Silva e Moreira (2003), as áreas de maior ocorrência de surto estão relacionadas com o menor desenvolvimento socioeconômico da região, sendo necessária a utilização de estratégias e elaboração de programas de erradicação da raiva de acordo com as peculiaridades regionais.

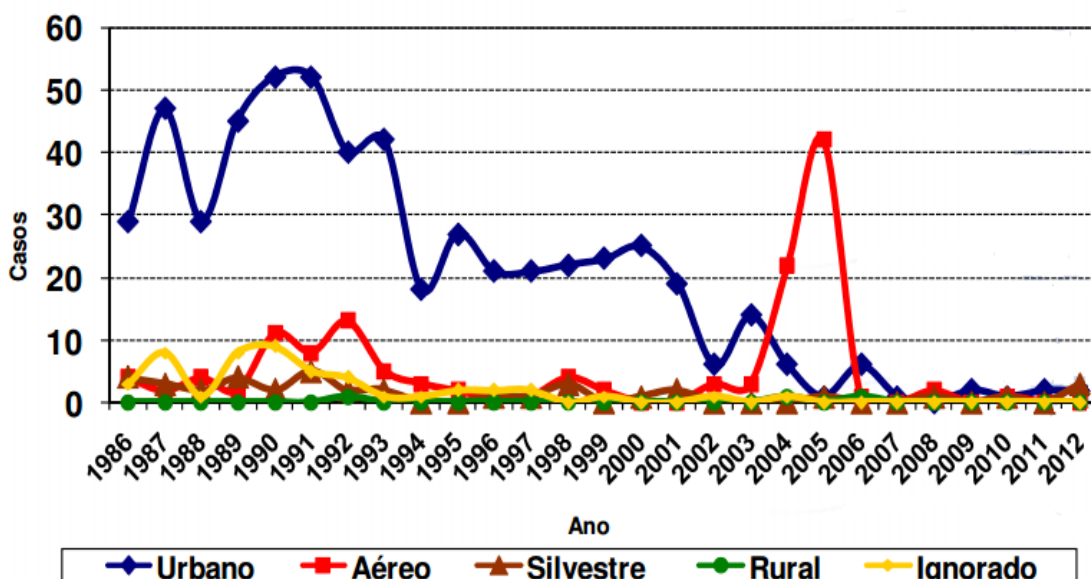
O ciclo rural tem como reservatório o morcego hematófago (*D. rotundus*), transmitindo-o para diferentes espécies de animais domésticos, como: bovídeos (bois e búfalos) equídeos (cavalos, mulas, asnos), caprinos, ovinos e suínos. (FERNANDES, 2001). A raiva nos herbívoros ocasiona diversos prejuízos econômicos, de forma direta estimam-se que cerca de US\$ 25 milhões de dólares sejam gastos a cada ano, com morte de 40.000 a 50.000 bovinos, as perdas indiretas como qualidade do couro reduzida, perda de peso, queda na produção de leite é estimada em US\$ 37,5 milhões de dólares (KOTAIT et al., 2010).



Fonte: SVS/ MS,2012

Figura 3. Notificação de raiva animal no Brasil, 1986 a 2012.

Apesar do aumento dos casos de raiva humana transmitida por quirópteros em países da América Latina, os carnívoros até 2004 foram os maiores transmissores da raiva no Brasil (figura 2) e no mundo. Na figura 3 tem-se a distribuição da raiva humana no Brasil de acordo com o ciclo da espécie agressora entre 1986 e 2012. De acordo com dados fornecidos pela Organização Mundial de saúde (OMS, 2012), estima-se que 55.000 a 70.000 óbitos humanos ocorram no mundo todo, principalmente em países da Ásia e África, onde se concentram 95% das mortes pela doença, e em menor escala, na América Latina. A cada 15 minutos uma pessoa é infectada pelo vírus da raiva, e cerca de 40% são crianças com idade inferior a 15 anos (RUPPRECHT *et al.*, 2002).



Fonte: SVS/MS, 2012

Figura 4. Raiva humana no Brasil de acordo com o ciclo de transmissão, 1986 a 2012.

O ciclo silvestre terrestre é o de maior prevalência nos países desenvolvidos, em especial nas regiões em que a raiva urbana está sob controle. O vírus pode utilizar como reservatórios naturais diferentes espécies, as quais podem variar em função da fauna da região geográfica. Assim na Europa é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*); na América do Norte, além da raposa, gambás (*Mephitis mephitis*) e guaxinins (*Procyon sp.*). O principal reservatório do ciclo silvestre da raiva no nordeste do Brasil é o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e a raposa do campo (*Pseudalopex vetulus*) (CARNIELI et al., 2006). No Brasil foi registrado no ano de 2000 cerca de 60 casos de raiva, dos quais 22 decorrentes de raposas (OPAS, 2001). Existem registros em todos os estados da região Nordeste como no Ceará (BARROS; FREITAS; SOUSA, 1989), Paraíba (OLIVEIRA et al, 2001), Pernambuco e Bahia (ARAÚJO, 2002).

Nos Estados do Ceará e Piauí já foram relatados alguns casos humanos ocasionados pelo sagui de tufo branco (*Callithrix jacchus*). No Ceará entre o período de 1990 a 2010 onze casos de raiva humana foram registrados. Ainda nesse período foram relatados 35 casos de raiva em saguis (*C. jacchus*) (AGUIAR, 2011). O caso mais recente ocorrido no Estado foi de

um garoto do município de Jati-Ce em 2012. No Piauí, no município de Teresina, um caso foi registrado em Abril de 2013 (IBAMA, 2013).

O ciclo silvestre aéreo da raiva ocorre entre as diferentes espécies de morcegos, hematófagos ou não, e apresenta grande importância na manutenção e circulação do vírus. Por serem os únicos mamíferos que voam, os morcegos têm a capacidade de transpor grandes barreiras geográficas (WADA *et al.*, 2004). No Brasil são encontrados 64 gêneros e 167 espécies dentre mais 1.100 conhecidas mundialmente, três apresentam o hábito alimentar hematófago e as demais frugívoro, nectarívoro, piscívoros e carnívoros, sendo as espécies insetívoras predominantes no nosso meio e responsáveis pela maioria dos casos de raiva encontrada em morcegos (REIS *et al.*, 2007).

O primeiro caso de raiva em morcegos não-hematófagos foi relatado na Flórida (EUA) em 1953, quando uma criança foi atacada. Inúmeros casos ocasionados por morcegos não hematófagos já foram descritos em todo o mundo, na América do Norte os principais gêneros/espécies envolvidos são: o *Lasionycteris noctivagans* e *Pipistrelus subflavus*. Na América do sul, em pesquisas realizadas no Chile, Argentina e Brasil os principais gêneros/espécies de importância epidemiológica são: *Tadarida brasilienses*, *Myotis sp.*, *Lasiurus sp.*, *Artibeus sp* e *Molossus sp.*(RUPPRECHT, 2002; KOTAIT,2007).

A maioria dos casos humanos de raiva transmitida por morcegos insetívoros não possuem histórico de agressão ou exposição. O risco em adquirir raiva a partir da mordedura desses animais é ignorado pela maior parte da população, pois os ferimentos causados são minúsculos e devido aos seus hábitos característicos, as circunstâncias de exposições são atípicas (KOTAIT, 2007). Em 2011, Silva e colaboradores realizaram o primeiro isolamento do vírus rábico em morcegos insetívoros no Estado de Pernambuco.

Em algumas regiões da América Latina é comum o ataque de morcegos hematófagos, porém a ocorrência de raiva humana transmitida por eles é baixa. No ano de 1986, na região nordeste, Estado de Alagoas, município de Boca da Mata foi relatado dois casos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos. Entre os anos 1990-1992, cinco óbitos foram registrados na Bahia nos municípios de Conde e Aporá. Nos anos de 2004 a 2005 foi relatada a ocorrência de três surtos na região norte, no Estado do Pará. No primeiro surto foram

relatados 15 óbitos com confirmação laboratorial de 10, no município de Portel, no segundo seis óbitos, com confirmação laboratorial de dois deles, pertencentes ao município de Viseu e o último no município de Augusto Corrêa onde ocorreram 15 óbitos e 10 com confirmação laboratorial. Em Pernambuco, no ano 2008 ocorreu um caso humano de cura. Foi o terceiro caso de cura da raiva no mundo (GONÇALVES *et al*, 2002, WADA *et al*, 2004; WADA *et al*, 2011).

Diversos fatores vêm contribuindo com o aumento dos casos de raiva silvestre no país tais como: implementação de vigilância passiva principalmente de morcegos em áreas urbanas, disponibilidade de abrigos, aumento na oferta de alimentos, representado pelo significativo crescimento dos rebanhos, mudanças climáticas e ambientais, o hábito de criar animais selvagens como estimação, prática que mesmo proibida por lei é observadas com frequência nos centros urbanos, dentre os mamíferos os sagüis e raposas são os exemplares mais cobiçados (FAVORETTO, 2001, MORAIS, 2003, GOMES *et al*. 2004).

3.6 TRANSMISSÃO

O vírus da raiva é mantido em populações de reservatório e transmitido a outras espécies, incluindo os seres humanos, em sua maioria através da penetração do vírus contido na saliva do animal infectado, principalmente por mordedura e, mais raramente arranhadura e lambedura de mucosas. A transmissão aerógena tem sido levantada como via alternativa para a exposição ao vírus da raiva, existem relatos desse tipo de transmissão em cavernas com grandes populações de morcegos bem como em acidentes laboratoriais de produção e vacina (DAVIS; RUDD; BOWEN, 2007).

A transmissão inter humana é rara, porém o contágio pelas vias transplacentárias, iatrogências e através de transplantes de órgãos e saliva já foram descritos. Na literatura há o relato de oito casos de transmissão da raiva através de transplante de córnea. Nos Estados Unidos, em 2004 foram registrados quatro casos de raiva humana decorrentes de transplantes de órgãos (fígado, rins e artéria ilíaca). Em 2005 na Alemanha foram relatados três indivíduos submetido a transplantes de pulmão, rim e pâncreas (MS, 2009; RUPPRECHT *et al*, 2002, COSTA *et al*, 2000).

A transmissão da raiva por via oral têm sido objeto de estudo. De acordo Shirakawa (2003), os gatos domésticos (*Felis catus*) são resistentes a essa forma de transmissão. No experimento realizado, ofertaram-se a gatos domésticos cérebros de camundongos previamente inoculados, e ao submeter o material as técnicas de IFD e inoculação de camundongos os resultados obtidos foram negativos, porém apresentaram positividade na técnica de RT-PCR. Em experimento conduzido por Acha e Szyfres (2003) foi observada a infecção de animais por via digestiva, ao alimentar ratas com lactentes inoculados com o vírus.

No Brasil existem dois relatos de raiva ocasionados por zoofilia, onde ocorre a penetração do vírus pela pele e mucosa da região genital, um no Estado do Espírito Santo e outro no município de São Paulo (KOTAIT, 2009).

3.7 PATOGENIA

O mecanismo de patogenicidade do vírus rábico é semelhante em todas as espécies mamíferas. A maioria das infecções é ocasionada por ferimentos como mordedura e arranhadura e a deposição de saliva infectada com o vírus rábico é a principal porta de entrada do vírus no organismo hospedeiro (WUNNER, 2007).

Após a inoculação do vírus é provável que ocorra uma primeira replicação nas células musculares ou nas células do tecido subendotelial (em algumas variantes de morcegos), este período de replicação extra neural é responsável pelo período de incubação relativamente longo e variável da raiva, no homem, normalmente dura entre 20 e 90 dias, em alguns casos, podem durar mais 360 dias. A infecção das fibras musculares é uma fase patogênica crítica para o acesso do vírus ao sistema nervoso periférico (JACKSON, 2009). Contudo, ocasionalmente pode ocorrer a entrada direta do vírus no SNC, sem replicação prévia no músculo (SHANKAR *et al.*, 1991).

O vírus da raiva se liga a receptores nicotínicos de acetilcolina na junção neuromuscular, através da glicoproteína. É conduzido via terminações nervosas motoras, aos nervos periféricos. O vírus se desloca seguindo um trajeto centrípeto para o sistema nervoso central (SNC), por meio do transporte axonal retrógrado rápido a uma taxa de 12 -100 mm por dia, na dependência da concentração de vírus e cepa viral. Após a introdução do vírus ocorre o desencadeamento de eventos ao nível celular tais como: adsorção, penetração,

desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem e brotamento virais (RUPPRECHT, 2002).

Uma vez alcançado o SNC, o vírus atinge diferentes porções do cérebro, os sinais clínicos tais como ataxia e depressão, são consequências do efeito direto do vírus na função das células neurais, a infecção do sistema límbico, promove alterações no comportamento. O vírus dissemina-se, e segue em direção centrífuga, para todos os tecidos não neuronais do hospedeiro. Antígenos virais já foram detectados em células da epiderme, folículos pilosos, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosa gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais, bexiga, uretra. Nas glândulas salivares, o vírus pode se replicar nos ácinos e ser eliminado junto com a saliva pelos ductos. A eliminação do vírus pela saliva juntamente com a infecção do sistema límbico, são fatores fundamentais para a transmissão da raiva na natureza (GERMANO, 1994).

3.8 SINAIS CLÍNICOS

A apresentação clínica da raiva é bastante diversa e varia conforme as espécies animais acometidas. Podendo se apresentar como raiva furiosa ou parálitica de acordo com as lesões no SNC (BATISTA, FRANCO e ROEHE, 2007).

Em eqüinos a clínica é muito variável, tanto a forma parálitica quanto a furiosa. Os sinais clínicos podem incluir posturas anormais, relinchos frequentes, agressividade, mordidas, cólicas, claudicação de membros, seguindo por decúbito, ataxia, cegueira aparente, fraqueza (RADOSTITS, 2002, PIMENTEL *et al.* 2009).

Nos cães observa-se agressividade, presença de latido bitonal, hidrofobia e sialorréia, devido à paralisia do nervo faríngeo-recorrente, deambulação, sensibilidade a estímulos luminosos, sonoros e aéreos, paralisia, febre, constipação, tenesmo, parafimose em machos. A morte ocorre por paralisia respiratória e do diafragma (BATISTA, FRANCO e ROEHE, 2007).

Nos bovinos os sinais mais comuns são: isolamento do rebanho, apatia, anorexia, decúbito esternal, paralisia dos membros pélvicos evoluindo para os torácicos, salivação, paralisia de cauda, movimentos de pedalagem, aumento da sensibilidade, ataxia,

hiperexcitabilidade (ACHA; SZYFRES, 2003, GALIZA *et al.* 2010). Em caprinos os sinais clínicos são variados, mas o animal pode apresentar paralisia, andar cambaleante e sialorréia(GUEDES *et al.*2007).

A raiva em suínos é pouco diagnosticada no Brasil, entre os anos de 1991 e 2005 apenas duas amostras foram confirmadas no Estado de São Paulo (COSTA *et al.* 2006). Pessoa *et al* (2010) relatou a ocorrência de dois casos de raiva no município de Patos-PB em 2009. Dentre os sinais mais observados falta de coordenação motora seguida de decúbito lateral e paralisia total, contrações involuntárias das narinas, movimentos mandibulares rápidos, salivação profusa, convulsões clônicas (RADOSTITS, 2000).

A sintomatologia da raiva em morcegos hematófagos caracteriza-se principalmente por atividade alimentar diurna, hiperexcitabilidade a luz, agressividade, falta de coordenação dos movimentos, paralisia, tremores. De acordo com Kimura (2006) deve-se suspeitar de raiva sempre que são encontrados morcegos com comportamento anômalo e fora de seu ambiente, independente de serem hematófagos.

Ações do sistema de vigilância da raiva incluem: i) monitoramento da ocorrência de raiva nos animais domésticos e silvestres; ii) análise, em laboratórios de referência, de amostras de encéfalo de cães mortos ou eutanasiados (0,2% da população canina) com sintomatologia neurológica. Quanto ao controle, as metas são: i) vacinação em massa de pelo menos 80% da população de cães e gatos; ii) nas agressões a humanos, exige-se observação clínica de cães e gatos até 10 dias após o ataque; iii) profilaxia humana pós-exposição ao ataque; iv) em caso de suspeita de caso de raiva em cão ou gato, realizar vacinação de emergência de todos os cães e gatos não vacinados dentro de uma área de bloqueio de 5 km (MS, 2009).

3.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da raiva é de fundamental importância para a adoção de medidas profiláticas e para o controle da doença nas populações de animais domésticos das áreas com circulação viral (MS, 2009).

Para a realização do diagnóstico específico para a raiva, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a técnica de imunofluorescência direta (IFD) descrita por Dean *et*

al.,(1996) e a prova biológica (PB) por Koprowsky (1996) que devem ser utilizadas simultaneamente para detecção de antígenos virais e isolamento viral. Os materiais de eleição são fragmentos do córtex, hipocampo, cerebelo e tronco cerebral e medula em equídeos (WHO, 1996).

Em 1958, a técnica de imunofluorescência começou a ser utilizada para diagnóstico de raiva. É amplamente utilizada devido a sua alta sensibilidade e especificidade, é uma técnica rápida e de custo baixo. O teste de IFD apresenta resultados confiáveis em poucas horas, quando realizados em amostras frescas, em 95-99% dos casos. Consiste em uma reação imunológica, que detecta o vírus em esfregaços do tecido com anticorpos específicos conjugado a uma substância fluorescente. Os antígenos que reagirem com os anticorpos marcados emitem coloração esverdeada brilhante que é visualizada com a utilização de um microscópio de campo escuro e luz ultravioleta (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

A prova biológica detecta a infecciosidade da amostra, por meio da inoculação da suspensão de material suspeito via intracerebral de camundongos albinos suíços recém-nascido 2 a 5 dias ou camundongos adultos de 3 a 4 semanas, numa tentativa de reprodução da doença. Os animais devem ser observados diariamente por pelo menos 21 dias na busca de sinais clínicos da raiva, todo camundongo morto é examinado por meio de IFD. Este teste representa a técnica “Padrão ouro” para a raiva e confirma os resultados da IFD (PEIXOTO *et al.*,2000; KOPROWSKY,1996).

Outras técnicas de diagnóstico são: técnicas histológicas para pesquisa de corpúsculos de Negri; detecção de genoma viral através da transcrição reversa, seguida de amplificação pela reação de cadeia da polimerase (PCR) ou suas variações. A técnica de RT-PCR apesar de não ser recomendada pela organização mundial de Saúde como técnica de diagnóstico, nos últimos anos tem sido bastante utilizada em pesquisas para identificar a fonte de infecção e estudos genéticos (ITO *et al.*2001,2003a). Diversos pesquisadores têm sugerido a RT-PCR como técnica complementar as outras técnicas utilizadas devido a sua alta sensibilidade (ROMIJN *et al.*, 2003; DANTA JUNIOR *et al.*, 2004 ; KIMURA *et al.*,2006). Por exemplo, ela foi aplicada para confirmar o diagnóstico a partir de uma amostra colhida na exumação do cadáver um mês após a morte da paciente. (OLIVEIRA *et al.*, 2006)

3.10 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Diversos estudos estão sendo realizados para a caracterização molecular e filogenética do vírus rábico, através do seqüenciamento total ou parcial dos genes que codificam a nucleoproteína (N) e a glicoproteína (G) (FAHL *et al*, 2009; GARCIA *et al*, 2009) e um número limitado utilizando a fosfoproteína (M₁ ou NS) e a proteína matriz (M ou M₂). A proteína N tem sido adotada com maior frequência, por ser o mesmo marcador utilizado na caracterização antigênica, o que permite a comparação de resultados entre as duas estratégias de tipificação viral. Além disso, é um gene conservado, mas que apresenta polimorfismo suficiente para predizer relações evolutivas entre isolados (WUNNER, 2007).

Estudos de epidemiologia molecular demonstram que linhagens genéticas derivadas da mesma espécie de hospedeiro apresentam dispersão espacial e são encontradas principalmente em uma área geográfica específica (KISSI *et al.*, 1999), embora barreiras geográficas possam não atuar de maneira absoluta no caso de vírus originários de morcegos (VIEIRA *et al.*, 2013). Assim, o estabelecimento de linhagens genéticas do vírus da raiva e o estudo das relações espacial e temporal entre elas ajudam a compreender a dinâmica de uma epidemia (REAL *et al.*, 2005).

Em 2006 no Piauí confirmou-se a variante viral 3 (*D. rotundus*) num cão. Demonstrando a importância no monitoramento dos ciclos epidemiológicos (CARVALHO, 2006). Analisando-se isolados de diferentes espécies animais no sudeste do Brasil, de 1993 a 2007, foi observada uma alteração no perfil epidemiológico por demonstrar dois ciclos epidemiológicos distintos, originados por variantes originárias de cão e de morcegos, mantidos por diferentes espécies animais na região (QUEIROZ, *et al.*, 2012). Estudos realizados no nordeste para caracterização das variantes rábicas de canídeos selvagens confirmaram diferenças regionais (CARNIELI *et al.*, 2006). De acordo com Gomes *et al.* (2004), no Estado da Paraíba foram encontradas variantes relacionada a raposa, morcegos insetívoros e hematófagos distintas de amostras do Brasil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Para a execução deste trabalho, 85 amostras positivas para raiva foram submetidas a RT-PCR direcionadas ao gene N para posterior sequenciamento do DNA, originárias do Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Norte (LACEN-RN) e do Laboratório de Raiva da Universidade Federal de Campina Grande- UFCG- campus Patos no período de 2001 a 2012.

As amostras isoladas foram provenientes de diferentes espécies animais, sendo que os bovinos constituíram maior grupo e com menores frequência quiróptera, ovina, equina, canina, raposa, descritas no Quadro 2. Para o exame foram utilizados os isolados do sistema nervoso central de camundongos que apresentaram diagnóstico confirmado para raiva pelas técnicas de IFD (DEAN *et al.*, 1996) e a Prova biológica que seguiu a metodologia descrita por Koprowski (1996), sendo provenientes de mesorregiões dos Estados do RN, PB e PE, de acordo com os mapas a seguir (figura 5).



Fonte: Menezes, 2013

Figura 5. Mapa do Brasil e da região nordeste e em destaque os Estados do RN, PB e PE.

Quadro 2. Amostras do SNC utilizadas, com suas respectivas passagens em camundongos, animais hospedeiros, ano de coleta e origem geográfica.

Nº de registro	Hospedeiro de origem	Passagem original	Ano	Origem geográfica
PN 266-09	Bovino	2º	2009	São José de campestre-RN
752.10	Mnh	1º	2010	Pau dos Ferros-RN
754.10	Mnh	2º	2010	Pau dos Ferros-RN
058.11	Raposa	2º	2011	Cruzeta-RN
064.11	Bovino	2º	2011	Felipe Guerra-RN
081.11	Mnh	2º	2011	Caicó-RN
147.11	Bovino	2º	2011	Mossoró-RN
166.11	Mnh	2º	2011	Caicó-RN
187.11	Bovino	2º	2011	Mossoró-RN
219.11	Bovina	1º	2011	Mossoró-RN
268.11	Mnh	1º	2011	Mossoró-RN
381.11	Mnh	2º	2011	Pau dos Ferros-RN
052.12	Mnh	2º	2012	Mossoró-RN
063.12	Mnh	2º	2012	Caicó-RN
072.12	Bovino	1º	2012	Sítio Novo-RN
095.12	mnh	1º	2012	Caicó-RN
B33G	Bovino	1º	2010	Belo Jardim-PE
PN 83-01	Cão	1º	2001	Bananeiras-PB
PN148-02	Bovino	1º	2002	Patos-PB
PN 150-02	Bovino	1º	2002	São José do Bonfim-PB
PN 228-02	Bovino	1º	2002	Santa Luzia-PB
PN 263-02	Bovino	1º	2002	Pombal-PB
PN 03-03	Equino	Original	2003	Patos-PB
PN 38-03	Bovino	1º	2003	Patos-PB
PN44-03	Ovino	1º	2003	São Mamede-PB
PN 73.03	Bovino	1º	2003	São Mamede-PB
95-03-A	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB
95-03-B	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB
PN 103-03	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB
PN 109-03	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB
PN 131-03	Bovino	1º	2003	Várzea-PB
PN 135-03	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB
PN 146-03	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB
PN 156-03	Bovino	1º	2003	João Pessoa-PB
PN 166-03	Bovino	1º	2003	Patos-PB
PN 173-03	Caprino	1º	2003	Curral Velho-PB
PN 33-07	Asinino	1º	2007	Patos-PB
PN 126-07	Bovino	1º	2007	Patos-PB
PN 137-07	Bovino	1º	2007	Patos-PB
PN 147-07	Bovino	1º	2007	Patos-PB
PN 230-07	Bovino	1º	2007	São José do Bonfim-PB
PN 237-07	Bovino	1º	2007	São José do Bonfim-PB
PN 338-07	Caprino	1º	2007	Água Branca-PB
PN 145-08	Bovino	1º	2008	Patos-PB
PN 269-08	Bovino	1º	2008	Patos-PB
PN 118-09	Bovino	1º	2009	Patos-PB
PN 266-09	Bovino	1º	2009	São José de campestre-RN

PN 293-10	Bovino	1°	2010	Olivedos-PB
PN 16-11	Ovino	1°	2011	Prata-PB
PN 17-11	Caprino	1°	2001	Prata-PB
PN 390-11	Equino	original	2011	Patos-PB
PN 401-11	Bovino	1°	2011	Patos-PB
G 324-08	Bovino	1°	2008	Venturosa –PE
G 469-08	Bovino	1°	2008	Pedra-PE
G 523-08	Bovino	1°	2008	Venturosa –PE
G 542-08	Bovino	1°	2008	Garanhuns-PE
G 553-08	Bovino	1°	2008	Venturosa –PE
G 575-08	Bovino	1°	2008	Paranatama –PE
G 624-08	Bovino	1°	2008	Venturosa –PE
G 698-08	Bovino	1°	2008	Belo Jardim –PE
G 58-09	Equino	1°	2009	São João – PE
G 75-09	Bovino	1°	2009	Belo Jardim PE
G 209-09	Bovino	1°	2009	Lajedo –PE
G 282-09	Bovino	1°	2009	Garanhuns-PE
G 607-09	Bovino	1°	2009	Canhotinho – PE
G 617-09	Bovino	1°	2009	Canhotinho – PE
G 670-09	Bovino	1°	2009	Correntes –PE
G 13-10	Bovino	1°	2010	Palmeirina –PE
G 14-10	Bovino	1°	2010	Palmeirinha –PE
G 83-10	Bovino	1°	2010	Canhotinho –PE
G 107-10	Bovino	1°	2010	Capoeiras –PE
G 204-10	Bovino	1°	2010	São João –PE
G 224-10	Bovino	1°	2010	Correntes –PE
G 307-10	Bovino	1°	2010	Canhotinho –PE
G 324-10	Bovino	1°	2010	Canhotinho – PE
G 26-11	Bovino	1°	2011	Pedra-PE
G 39-11	Bovino	1°	2011	São Bento do Una-PE
G 59-11	Bovino	1°	2011	Garanhuns-PE
G65-11	Bovino	1°	2011	Garanhuns-PE
G 587-11	Bovino	1°	2011	Lajedo-PE
G 612-11	Bovino	1°	2011	Capoeiras-PE
G 637-11	Bovino	1°	2011	Ibirajuba-PE
G 34-12	Bovino	1°	2012	São João-PE

mnh: morcego não hematófago

4.2. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEÍCO PELO MÉTODO DO REAGENTE TRIZOL LS

Etapa realizada no Laboratório de Biologia Molecular aplicada e sorologia (LABMAS) do departamento de Medicina veterinária preventiva e Saúde animal (VPS) da Universidade de São Paulo- USP.

O RNA foi extraído diretamente do sistema nervoso central do camundongo. Em um microtubo de 1,5 mL foi adicionado um macerado de cerca de 0,5 gramas de tecido cerebral

misturado a 1 mL de TRIZOL[®] (InvitrogenTM). Um tubo contendo água DEPEC foi adicionado a cada cinco amostras na extração do RNA para o monitoramento de possíveis contaminações. Os tubos foram agitados por 20 segundos em vórtex e deixados a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, e brevemente agitados, permanecendo em repouso durante 3 min. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000 rpm, durante 15 min. a 4°C. Após a centrifugação ocorre a formação de três fases: uma fase mais densa de coloração rosada constituída do trizol, uma intermediária correspondente aos detritos celulares e uma aquosa na qual se encontrava o ácido nucléico. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, na qual foram adicionado propanol na mesma proporção (1:1), agitados e deixados a temperatura ambiente por 10 min., seguido de centrifugação a 12.000 rpm, durante 10 min. a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado invertendo manualmente os tubos, sendo então adicionados 1 mL de etanol a 75%. Seguiu-se uma rápida agitação e de centrifugação a 12.000 rpm por 5 min. na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi invertido cuidadosamente e o sedimento foi seco no concentrador a vácuo a 60° C por 10 min. A ressuspensão do RNA foi feita em 25 µL de água livre de DNA/RNase, em seguida foi deixado no termomixer por 10 min. a 56° C, sendo imediatamente utilizado para a detecção do genoma viral ou -80 °C até o momento do uso.

4.3. REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA O GENE N

A transcrição reversa foi realizada com a enzima M-MLV (InvitrogenTM) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, com algumas modificações. Para cada amostra analisada foram utilizados 3,5 µL de cada RNA, adicionados ao mix de transcrição reversa (síntese de cDNA) contendo 5 x First Strand Buffer (InvitrogenTM), 10mM de cada dNTP, 10mM DTT, 10pmol/µL de cada primer (504 e 304), descritos por Orciari et al,2001 (Quadro 3) e 100U MMLV Reverse Transcriptase (InvitrogenTM) para uma reação final de 10µL, realizada a 42°C/60 min.

Cinco microlitros de cada respectivo cDNA foram adicionados ao mix de PCR contendo 10 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 1,25mM de cada dNTP, 10 pmol/µL de cada primer (504 e 304), 1,5mM MgCl₂, 27,25 µL água ultrapura tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (água DEPEC) e 1,25U Taq DNA polymerase (InvitrogenTM) para uma reação

final de 50µL e submetidos a uma desnaturação inicial de 94 °C/5 s., seguidos de 35 ciclos de 94 °C /45 seg, 55 °C /45 s. e 72 °C /2 min, finalizando com uma extensão final de 72°C/10 min. Como controle positivo foi utilizado CVS e como negativo, cérebro normal de camundongo (CN).

Quadro 3. Sequência dos Iniciadores (“primers”) utilizados no protocolo para obtenção de um amplificado de 249 pb do gene N do vírus da raiva.

Primer	Sequência	Posição no genoma do Pasteur Vírus (PV)	Sentido de Orientação
504	5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3'	1287-1317	Senso (Orciari <i>et al.</i> , 2001)
304	5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3'	1514-1533	anti-senso (Orciari <i>et al.</i> , 2001)

4.4. VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DA RT-PCR

Os produtos da PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (0,1M de Tris, 0,09 M de ácido bórico e 0,001M de EDTA) corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL, mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

Os produtos amplificados foram migrados juntamente com um marcador indicativo do número de pares de base (Low DNA Mass - 100 bp ladder, Invitrogen), e controles negativo (CCN) e positivo (CVS) de extração durante aproximadamente 30 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 90V e 7mA, respectivamente. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram bandas de 249 pb.

4.5. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

A reação de sequenciamento de DNA foi composta de 4 µl de *BigDye 3.1*® (Applied Biosystems®), 4 µl de *5x Sequencing buffer* (Applied Biosystems®), 4 pmol de cada *primer*

senso e antisenso (Quadro 3) referente a cada *amplicon* em reações separadas e 20 ng de DNA alvo para uma reação final de 20 µL, seguindo para o termociclador PTC-200 (MJ Research TM) para 35 ciclos de 96° C/30 seg., 50°C/15 seg. e 60°C/4 min., com rampa de 0,7°C/seg entre cada temperatura.

A precipitação foi realizada a temperatura ambiente com 80 µL de propanol a 75%, incubando-se durante 30 min., seguido de centrifugação a 20.000 x rpm por 25 min., removeu-se o sobrenadante e foram adicionados 300 µl de etanol a 70%, centrifugou-se a 20.000 x g por 15 min. e o precipitado foi seco a 95° C por 5 min., as amostras foram levadas ao sequenciador ABI-377® (Applied Biosystems).

O sequenciamento ocorreu através da eletroforese por capilaridade no sequenciador automático. Os fragmentos de DNA marcados foram separados de acordo com seus tamanhos e detectados por emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda. A interpretação foi feita pelo sistema computacional do equipamento segundo códigos de cores (azul, vermelho, verde e amarelo) ao terem passado pela região de leitura ótica do sequenciador.

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo *Phred* online (EMBRAPA, 2006) para avaliação da qualidade, sendo utilizadas as posições que apresentaram nt com índice *Phred* maior que 20. Os Cromatogramas foram conferidos manualmente com o programa Finch TV © (Geospiza) (ROBY, 2008) para a busca de erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas.

A sequência consenso final de cada amostra foi obtida a partir das sequências senso e o reverso-complemento da antisenso de cada amostra alinhadas pelo método CLUSTAL/W com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), submetida ao BLASTn em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> para confirmação do sequenciamento juntamente com as sequências homólogas referentes ao gene N do vírus da raiva relacionados a morcegos hematófagos, morcegos insetívoros, carnívoros domésticos e silvestres e amostras fixas obtidas no GenBank (Quadro 4) . A árvore filogenética foi obtida utilizando o critério de otimização de distâncias, com o algoritmo Neighbor-Joining com modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood 1000 repetições de bootstrap com o programa MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007). A árvore filogenética foi representada de maneira não enraizada, pois não é foco deste estudo fazer análise evolutiva, mas apenas classificar as amostras estudadas. Os números de acesso ao Genbank encontram-se na figura da árvore filogenética (Quadro 4).

Quadro 4. Sequências do gene N de vírus da recuperadas do *Genbank*, utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo *acession number*, identificação da amostra, local de origem e espécie hospedeira São Paulo, 2013

GENBANK	AMOSTRA	PAÍS	HOSPEDEIRO
HQ666871.1	bref299-10	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
HQ666866.1	bref76-10	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
HQ666864.1	bred43-10	Brasil	<i>Epitesicus diminutus</i>
HQ666860.1	bref589-09	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
HQ666855.1	bref224-09	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
HQ666854.1	bref199-09	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
HQ666851.1	bred84-09	Brasil	<i>Epitesicus diminutus</i>
HQ666837.1	bref1141-02	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
HQ666832.1	bref62-02	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
HQ666831.1	bref1070-01	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
HQ666830.1	bresp1019-01	Brasil	<i>Epitesicus</i> sp
HQ666828.1	bref636-01	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
DQ631839.1	bref8397/05	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
GU646861.1	bref341-02	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
GU646796.1	bref213-00	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
GU646790.1	bref126-01	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
GU646781.1	bref431-04	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
JF916678.1	brefusp008-09	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
JF916671.1	brefusp064-07	Brasil	<i>Epitesicus furinalis</i>
GU552792.2	IP3321/05	Belo Horizonte/MG	<i>Histiotus velatus</i>
GU552791.2	IP6883/06	Campo Lindo Paulista/SP	<i>Histiotus velatus</i>
EF152266.1	10565dgPB/2003	Paraíba/PB	Cão
EF152261.1	9370dgPE/2005	Pernambuco	Cão
GU646840.1	brdg57-92	Andradina-SP	Cão
HQ666867.1	brmm169-10	Brasil	<i>Molossus molossus</i>
HQ666841.1	brmm1539-02	Brasil	<i>Molossus molossus</i>
HQ666833.1	brmm109-02	Brasil	<i>Molossus molossus</i>
HM854031.1	brmr178-05	Andradina-SP	<i>Molossus rufus</i>
HQ666872.1	brmr300-10	Brasil	<i>Molossus rufus</i>
HQ666862.1	brmr17-10	Brasil	<i>Molossus rufus</i>
HQ666858.1	brmr389-09	Brasil	<i>Molossus rufus</i>

GU646777.1	brmm95-03	Brasil	<i>Molossus molossus</i>
HQ666870.1	brlbl198-10	Brasil	<i>Lasiurus blossevillii</i>
HQ666842.1	brle1782-02	Brasil	<i>Lasiurus ega</i>
JX217783.1	brlcSP4133-1997	São Paulo	<i>Lasiurus cinereus</i>
GU646782.1	brlb46-04	Brasil	<i>Lasiurus blossevillii</i>
JF916654.1	brlbusp036-07	Brasil	<i>Lasiurus blossevillii</i>
JF916647.1	brlbSP4096-1995	Brasil	<i>Lasiurus blossevillii</i>
GU646775.1	brmn131-03	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
GU646776.1	brmn45-03	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
GU646778.1	brmn38-03	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
GU646785.1	brmn150-03	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
GU646786.1	brmn234-02	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
GU646788.1	brmn610-01	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
HM854032.1	brmn391-05	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
HQ666834.1	brmn835-02	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
HQ666846.1	brmn168-04	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
HQ666852.1	brmn149-09	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
HQ666859.1	brmn433-09	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
JF916650.1	brmyaSP4115-1998	Brasil	<i>Myotis albescens</i>
JF916667.1	brmnusp058-07	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
JF916668.1	brmnusp061-07	Brasil	<i>Myotis nigricans</i>
EF194165.1	6335CthPI/2005	Piauí	<i>Cerdocyon thous</i>
EF194162.1	6976CthPE/2005	Brasil	<i>Cerdocyon thous</i>
EF194159.1	4372CthPI	Brasil	<i>Cerdocyon thous</i>
EF152271.1	6368CthPI	Brasil	<i>Cerdocyon thous</i>
EF152259.1	1406CthPE	Pernambuco	<i>Cerdocyon thous</i>
EF152257.1	6977CthPE	Pernambuco	<i>Cerdocyon thous</i>
EF152256.1	6973CthPE	Pernambuco	<i>Cerdocyon thous</i>
EF152255.1	6970CthPE	Pernambuco	<i>Cerdocyon thous</i>
EF152266.1	10565dgPB	Paraíba	Cão
EF152265.1	10562ctPB	Paraíba	Gato
EF152264.1	10561dgPB	Paraíba	Cão
EF152239.1	10564ctPB	Paraíba	Gato
EF152237.1	10566ctPB	Paraíba	Gato
EF152238.1	10568ctPB	Paraíba	Gato
AB619642	BR DR1	Brasil	<i>Desmodus rotundus</i>
AF0704491	D. rotundus	Brasil	<i>Desmodus rotundus</i>
AB117972	BRAP1	Brasil	<i>Artibeus planirostris</i>
AB117970	BRAL2	Brasil	<i>Artibeus lituratus</i>

AB117971	BRAL1	Brasil	<i>Artibeus lituratus</i>
AB117969	BRAL1	Brasil	<i>Artibeus lituratus</i>
AB519641	BRAL3	Brasil	<i>Artibeus lituratus</i>
GQ918139.1	CVS-11	Institute Pasteur, France	CVS

Fonte: Genbank

5. RESULTADOS

5.1 RT-PCR PARA O GENE CODIFICADOR DA NUCLEOPROTEÍNA (N)

Dos 85 isolados submetidos a RT-PCR direcionada ao gene codificador de nucleoproteína (N), 57 apresentaram positividade, correspondendo a 67% do total de amostras. No presente estudo dos 57 isolados submetidos ao sequenciamento, apenas 38 apresentaram sequências viáveis, totalizando 40%. (Quadro 5).

Quadro 5 - Amostras do SNC utilizadas, com suas respectivas passagens em camundongos, animais hospedeiros dos quais foi realizado RT-PCR e sequenciamento para o gene N, ano de coleta e origem geográfica.

Nº de registro	Hospedeiro de origem	Passagem original	Ano	Origem geográfica	RT-PCR gene N	Sequenciadas
PN 266-09	bovino	2º	2009	São José de campestre-RN	P	P
752.10	Mnh	1º	2010	Pau dos Ferros-RN	P	N
754.10	Mnh	2º	2010	Pau dos Ferros-RN	P	P
058.11	Raposa	2º	2011	Cruzeta-RN	P	P
064.11	Bovino	2º	2011	Felipe Guerra-RN	P	P
081.11	Mnh	2º	2011	Caicó-RN	P	P
147.11	Bovino	2º	2011	Mossoró-RN	P	P
166.11	Mnh	2º	2011	Caicó-RN	P	P
187.11	Bovino	2º	2011	Mossoró-RN	P	P
219.11	Bovina	1º	2011	Mossoró-RN	N	NR
268.11	Mnh	1º	2011	Mossoró-RN	P	N
381.11	Mnh	2º	2011	Pau dos Ferros-RN	P	P
052.12	Mnh	2º	2012	Mossoró-RN	P	P
063.12	Mnh	2º	2012	Caicó-RN	P	P
072.12	Bovino	1º	2012	Sítio Novo-RN	P	P
095.12	Mnh	1º	2012	Caicó-RN	P	N
B33G	Bovino	1º	-	Belo Jardim-PE	P	N
PN 83-01	Cão	1º	2001	Bananeiras-PB	P	P
PN148-02	Bovino	1º	2002	Patos-PB	N	NR
PN 150-02	Bovino	1º	2002	São José do Bonfim-PB	P	N
PN 228-02	Bovino	1º	2002	Santa Luzia-PB	N	NR
PN 263-02	Bovino	1º	2002	Pombal-PB	N	NR
PN 03-03	Eqüino	original	2003	Patos-PB	N	NR
PN 38-03	Bovino	1º	2003	Patos-PB	N	NR
PN44-03	Ovino	1º	2003	São Mamede-PB	P	P
PN 73.03	Bovino	1º	2003	São Mamede-PB	P	P
95-03-A	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB	N	NR
95-03-B	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB	N	NR
PN 103-03	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB	P	P
PN 109-03	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB	P	P
PN 131-03	Bovino	1º	2003	Várzea-PB	P	P
PN 135-03	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB	N	NR
PN 146-03	Bovino	1º	2003	Santa Luzia-PB	N	NR

PN 156-03	Bovino	1°	2003	João Pessoa-PB	P	P
PN 166-03	Bovino	1°	2003	Patos-PB	P	N
PN 173-03	Caprino	1°	2003	Curral Velho-PB	N	NR
PN 33-07	Asinino	1°	2007	Patos-PB	N	NR
PN 126-07	Bovino	1°	2007	Patos-PB	P	P
PN 137-07	Bovino	1°	2007	Patos-PB	P	N
PN 147-07	Bovino	1°	2007	Patos-PB	P	N
PN 230-07	Bovino	1°	2007	São José do Bonfim-PB	P	N
PN 237-07	Bovino	1°	2007	São José do Bonfim-PB	N	NR
PN 338-07	Caprino	1°	2007	Água Branca-PB	P	N
PN 145-08	Bovino	1°	2008	Patos-PB	N	NR
PN 269-08	Bovino	1°	2008	Patos-PB	P	N
PN 118-09	Bovino	1°	2009	Patos-PB	P	P
PN 266-09	Bovino	1°	2009	São José de campestre-RN	N	NR
PN 293-10	Bovino	1°	2010	Olivedos-PB	P	P
PN 16-11	Ovino	1°	2011	Prata-PB	P	P
PN 17-11	Caprino	1°	2001	Prata-PB	N	NR
PN 390-11	Equino	original	2011	Patos-PB	P	P
PN 401-11	Bovino	1°	2011	Patos-PB	P	P
G 324-08	Bovino	1°	2008	Venturosa –PE	P	P
G 469-08	Bovino	1°	2008	Pedra-PE	N	NR
G 523-08	Bovino	1°	2008	Venturosa –PE	P	N
G 542-08	Bovino	1°	2008	Garanhuns-PE	P	P
G 553-08	Bovino	1°	2008	Venturosa –PE	P	P
G 575-08	Bovino	1°	2008	Paranatama –PE	N	NR
G 624-08	Bovino	1°	2008	Venturosa –PE	P	N
G 698-08	Bovino	1°	2008	Belo Jardim –PE	P	N
G 58-09	Equino	1°	2009	São João – PE	N	NR
G 75-09	Bovino	1°	2009	Belo Jardim PE	P	P
G 209-09	Bovino	1°	2009	Lajedo –PE	N	NR
G 282-09	Bovino	1°	2009	Garanhuns-PE	N	NR
G 607-09	Bovino	1°	2009	Canhotinho – PE	P	N
G 617-09	Bovino	1°	2009	Canhotinho – PE	P	P
G 670-09	Bovino	1°	2009	Correntes –PE	N	NR
G 13-10	Bovino	1°	2010	Palmeirina –PE	P	P
G 14-10	Bovino	1°	2010	Palmeirinha –PE	P	P
G 83-10	Bovino	1°	2010	Canhotinho –PE	P	P
G 107-10	Bovino	1°	2010	Capoeiras –PE	P	N
G 204-10	Bovino	1°	2010	São João –PE	N	NR
G 224-10	Bovino	1°	2010	Correntes –PE	P	P
G 307-10	Bovino	1°	2010	Canhotinho –PE	P	P
G 324-10	Bovino	1°	2010	Canhotinho – PE	P	N
G 26-11	Bovino	1°	2011	Pedra-PE	P	P
G 39-11	Bovino	1°	2011	São Bento do Una-PE	P	P
G 59-11	Bovino	1°	2011	Garanhuns-PE	P	P
G65-11	Bovino	1°	2011	Garanhuns-PE	P	P
G 587-11	Bovino	1°	2011	Lajedo-PE	P	N
G 612-11	Bovino	1°	2011	Capoeiras-PE	N	NR
G 637-11	Bovino	1°	2011	Ibirajuba-PE	N	NR
G 34-12	Bovino	1°	2012	São João-PE	N	NR

Mnh: morcego não hematófago; P: positivo; N: negativo; NR: não realizado

5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE N

O sequenciamento do fragmento do gene N de 249 pares de bases resultou em sequências de 164 a 165 nucleotídeos. Quando submetidas ao BLASTn, apenas sequências referentes ao vírus da raiva foram obtidas.

A árvore filogenética gerada no estudo direcionada ao gene N, juntamente com as obtidas pelo Genbank está representada na figura 6. Os números próximos a cada nó representam os valores de “bootstrap” (1000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio.

O padrão de agregação obtido na árvore filogenética (figura 6), no presente estudo, resultou na formação dos principais grupos esperados de amostras do vírus da raiva, ou seja, variante antigênica 2, 3 e variante de morcego insetívoro, amostra fixa (CVS).

A análise resolveu as amostras em:

- Um filogrupo padrão canídeos, dividido em dois subrupos de canídeos (*Cerodonyon* segregando separadamente de cão doméstico);
- Um filogrupo padrão *Desmodus rotundus* com três subgrupos: um com todos os herbívoros do estudo, os demais com amostras do Genbank, sendo um com sequencias originárias de morcegos frugívoros gênero *Artibeus* (SHOJI et al., 2004) e outro representador por amostras de *Desmodus* e insetívoros que foram publicados como padrão *Desmodus* na publicação original (QUEIROZ et al., 2012); houve, ainda, a segregação da amostra 754-10, isolada de MNH proveniente de Felipe Guerra-RN.
- Um filogrupo de morcegos insetívoros, dividido em: um grupo grande, mais próximo filogeneticamente dos *Desmodus*, com amostras da família Vespertilionidae; um grupo composto por molossídeos, onde se agruparam amostras deste estudo (duas delas identificadas como *M. molossus* e três sem a identificação da espécie e denominadas genericamente como MNH); por último mais um subgrupo Molossidae e outro Vespertilionidae.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observada uma discrepância em relação às amostras sabidamente positiva para raiva (IFD e prova biológica) em relação aos resultados obtidos pela RT-PCR.

Das 85 amostras positivas isoladas a partir do sistema nervoso central de camundongos, submetidas a RT-PCR para o gene N do vírus rábico, somente 57 resultaram em positividade e 38 apresentaram-se viáveis para o sequenciamento. O gene da nucleoproteína (N) é um alvo adequado para a comparação por períodos de evolução relativamente longos, devido ao seu baixo polimorfismo.

De acordo com Oliveira (2009), a negatividade das amostras sabidamente positivas pode ser atribuída ao título viral fora do limiar de detecção das técnicas de RT-PCR, isto é, baixos títulos, acarretam baixo número de cópias exigidas para o sinal da PCR e altos títulos virais podem causar inibição da PCR e dificuldade na amplificação pela DNA polimerase. Tendo em vista que a maioria das amostras são provenientes de isolamentos de 1º e 2º passagem em camundongos e que o vírus fixo CVS utilizado como controle positivo na reação manteve-se positivo durante a realização da técnica, esse fator não parece ter sido relevante.

A presença de inibidores nas amostras de sistema nervoso Central como RNAses, também pode ocasionar falsos negativos. As amostras utilizadas procedem de diferentes laboratórios e foram enviadas para a realização de RT-PCR após o isolamento viral em camundongos. Os erros na realização da técnica parecem pouco prováveis, tendo em vista que após o isolamento todas as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento e repetidas ao menos duas vezes.

Além disso, as amostras foram enviadas em diferentes períodos e condições de armazenamento, muitas em estado de putrefação. De acordo com Araújo (2008) a temperatura ótima de conservação do RNA é de -80°C e variações ocasionam interferência nos resultados. Algumas amostras foram submetidas a uma segunda passagem no laboratório de Raiva na USP na tentativa de recuperação das amostras. De fato esses conjuntos de fatores parecem os mais plausíveis na justificativa da menor de positividade observada nas amostras submetidas a

RT-PCR. Por fim, deve-se considerar que os primers utilizados neste estudo não foram os mesmos aplicados na rotina de diagnóstico para a raiva (OLIVEIRA *et al*, 2006), situação que visa amplificar fragmentos menores para aumentar a sensibilidade, mesmo em tecidos em mau estado de conservação.

Embora diversos estudos já tenham sido feitos sobre a epidemiologia da raiva utilizando técnicas moleculares em diferentes localidades do Brasil, a região nordeste ainda apresenta uma grande defasagem. Apesar de que historicamente em conjunto com a região norte, ser responsável por cerca de 80% dos casos de raiva registrados no Brasil (MIRANDA, SILVA, MOREIRA, 2003).

Análise filogenética dos 38 isolamentos sequenciados identificou linhagens distintas entre as variantes circulantes nos Estados do RN, PB e PE. Estudos realizados por ITO *et al* (2003b) com amostras brasileiras mostram que o ciclo da raiva no Brasil é extremamente complexo e apresenta sobreposição do ciclo urbano e silvestre em diversas localidades, provavelmente devido aos diferentes ecossistemas existentes na região.

O filogruppo formado pelo 31 isolados relacionados a morcego hematófago *Desmodus rotundus* deste estudo e nove provenientes do Genbank fora obtidos de 27 bovinos, um equino, dois ovino e, destaque-se um morcego não hematófago (754-10) encontrado no interior de uma residência no município de Pau dos Ferros-RN. Além deste, os isolados deste grupo foram provenientes dos municípios de São José de Campestre-RN (PN 266-09), Felipe Guerra - RN, Caicó-RN, Mossoró-RN (147.11, 187.11), Município de Sitio Novo/RN (072.12), Várzea-PB (PN 131-03), São Mamede-PB (PN 44.03, PN 73.03), Santa Luzia-PB (PN 103-03, PN 109-03), João Pessoa-PB (PN 156-03), Patos-PB (PN 390-11, PN 401-11), Prata-PB (PN 16-11), Venturosa -PE (G 324-08, G 553-08), Belo Jardim -PE (G 75-09), Palmeirina -PE (G 13.10, G 14.10), Correntes -PE (G 224.10), Canhotinho -PE (G 617.09, G 83-10), Pedra-PE (G 26-11), São Bento do Una-PE (G 39-11), Garanhuns-PE (G 65-11, G 542.08, G 59-11). Dados a serem publicados em outro trabalho apontam a tendência dos casos de raiva transmitida por *D. rotundus* se agruparem ao longo de bacias hidrográficas.

Dois subgrupos de canídeos, com a amostra 058-11, *Cerdocyon thous* de Cruzeta-RN, segregando separadamente da amostra PN 83-01, cão doméstico de Bananeiras-PB, sugerem que há, na região estudada, ciclo ativo de transmissão entre raposa independente do ciclo que circulava entre cães e gatos. A sequência de DNA da amostra -58-11 apresentou identidade com isolados de raposa já descritos em outros trabalhos (GOMES, 2004; BERNARDI *et al.*,

2005; CARNIELI *et al.*, 2006; KOBAYASHI *et al.*, 2007). Este trabalho complementa os dados de Carnieli Jr e colaboradores (2006) que analisaram amostras provenientes de raposas de todos os estados do Nordeste, exceto o Rio Grande do Norte.

O relato de raiva associada a morcegos insetívoros do presente trabalho corrobora com outros casos já descritos na literatura por Uieda *et al.*, 1996, Martorelli *et al.* 1996; Passos *et al.*, 1998, Silva, 2007, Oliveira, 2009. No Rio Grande do Norte foi encontrado um padrão regional de distribuição de vírus rábico associado a morcego insetívoro. Em 2009, o Lacen-RN notificou no município de Caicó um surto de Raiva proveniente de morcegos não hematófagos. Foram analisadas 248 amostras e 50 apresentaram positividade, porém não foram divulgadas a espécie nem a variante viral (BATISTA; ASSIS, 2012).

De acordo com a análise filogenética deste trabalho, algumas amostras provenientes de morcegos não identificados poderiam ser classificadas como *M. molossus* por terem segregado juntamente com três amostras cujos hospedeiros foram identificados como tal (052-2012 Mossoró-RN, 063 2012 Caicó-RN, 381-11 Pau dos Ferros-RN). Entretanto, devido à dinâmica das populações de quirópteros e das interações entre elas, diversas linhagens virais “típicas” para determinada espécie de morcego são detectadas em outras espécies. Este fenômeno é chamado de *spillover* e exemplo disto foi encontrado neste próprio trabalho (amostra 754-10 já citada), bem como algumas das sequências da linhagem *Desmodus* resgatadas do Genbank para a análise, a saber: HQ666855 (*Epitesicus furinalis*), JF916654 (*Lasiurus bonevilli*), AB117972 (*Artibeus planirostris*), AB117970, AB117971, AB519641 (*Artibeus lituratus*).

Na região Nordeste do Brasil é comum encontrar animais silvestres mantidos como bichos de estimação, apesar de lei proibitiva. Os relatos de agressões envolvendo raposas e as grandes quantidades de morcegos insetívoros e abrigos presentes no meio urbano e rural, também favorecem a transmissão como descrito por Gomes *et al.*, 2004 e Silva *et al.* 2008. Em relação as raposa, existem relatos de transmissão humana nos Estados do Ceará (BARROS *et al.*, 1989), Paraíba (GOMES *et al.*, 2004), Pernambuco e Bahia (ARAÚJO, 2002). Os casos de raiva humana ocasionados por morcegos não hematófagos são pouco documentados e têm como fator comum a incerteza sobre a exposição, pois na maioria das vezes, não existem relatos de exposição ou agressão a esses animais e quando elas ocorrem são geralmente negligenciadas devido os ferimentos serem pequenos, esse tipo de transmissão sem explicação plausível é denominado pela literatura de “Raiva criptogênica”.

Morcegos têm demonstrado serem menos vulneráveis à fragmentação de florestas do que outros mamíferos devido à habilidade de se dispersarem para fragmentos peri-urbanos e mesmo urbanos (De LUCCA *et al.*, 2013). Embora, seja assumido que os ataques a seres humanos sejam raros, um caso recente de raiva felina em Curitiba (MORIKAWA *et al.*, 2012) por vírus da variante 4, *Tadarida brasiliensis*, reafirma a necessidade de reforço no monitoramento de atividade viral nas populações de quirópteros nos meios urbanos e rural e coloca em cheque os movimentos contrários à vacinação em massa de cães e gatos (De LUCCA *et al.*, 2013).

No Nordeste do Brasil, durante a estação seca, é comum o transporte de gado para outras regiões, a fim de salvá-los da seca e da fome. Este fato provavelmente favorece a dispersão da raiva através dos herbívoros, que no estudo apresentaram a mesma variante viral circulante (VAg 3- *Desmodus rotundus*). Além disso, essas mudanças obrigam os morcegos a procurarem outras fontes de alimentação, incluindo os seres humanos como descritos no Estado da Bahia por Gonçalves, 2002 e Carneiro, 2005.

Curiosamente, na análise filogenética deste trabalho, sequências de amostras provenientes de espécies de morcego da família Vespertilionidae formaram um agregado entre o filogruppo de amostras provenientes de molossídeos e de herbívoros (linhagem *Desmodus*). Ao contrário dos molossídeos, as espécies classificadas na família Vespertilionidae são vistas raramente em meio urbano. Poderia se especular que esses hospedeiros fariam uma transição entre as linhagens de vírus encontradas no meio rural e silvestre e as encontradas no meio rural. Infelizmente o fragmento de DNA analisado neste estudo é pequeno demais para permitir tal afirmação.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- No Rio Grande do Norte encontra-se em circulação entre a população de *Cerdocyon thous*, linhagem de vírus já descrita nesta espécie em outros estados do Nordeste;
- Há transmissão ativa de vírus rábico entre populações de morcegos insetívoros no Rio Grande do Norte.
- Encontrou-se um *spillover* de linhagem circulante em *Desmodus rotundus* e herbívoros em morcego não hematófago.
- No Estado de Pernambuco a circulação das variantes antigênicas VAg-2 e VAg-3 e na Paraíba foi observada a circulação da VAg-3.

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N; SZYFRES, B. Rabia. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed.Washington(DC):OPS;2003. p. 364-368. (OPS-Publicación Científica y técnica, 580).

AGUIAR, Tereza D'ávila F. et al. Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo de sagui (*Callithrix jacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Fortaleza, v.44, p.356-363, 2011.

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

ARAÚJO, D.B.; LANGONI, H.; ALMEIDA, M.F.; MEGID, J. Heminested reverse transcriptase polymerase as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. **BMC Research Notes**, v.1, n.17, p.1-6. 2008.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, O.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v.75, p.3268-3276, 2001.

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

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, V. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.

BASTISTA, M.G.N, ASSIS, D.S.M. Ocorrência de casos de raiva em morcegos não hematófagos no município de Caicó-RN. **Revista Centauro**, v.3, n.1, p01 - 06, 2012.

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

BRASIL.Secretaria de Estado e saúde do Maranhão. Situação epidemiológica da raiva. Maranhão,2012.

CALISHER, C.H;ELLISON,J.A.The other rabies viruses: The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. **Travel Med Infect Dis.**,v.10, p 69-79. 2012

CARNEIRO, R.L, et al Análise das agressões em humanos por morcegos hematófagos ocorridos em três municípios baianos no período de 1986 a 1995. **Revista Brasileira Saúde e produção animal**, v,6,n.1,p1-7,2005.

CARNIELI,P;BRANDÃO, P.E;CARRIEIRI, M.L.; CASTILHO J.G.; MACEDO C.I;LINDENBERG. M.M.;RANGEL N.;CARVALHO R.C.;CARVALHO V.A,MONTEBELO L.; WADA, M .; KOTAIT I.Molecular epidemiology of rabies vírus strains isolated from wild in Northeast Brasil. **Virus Research**.v.120,p.113-120,2006.

CARTER,John;SAUNDERS,Venetia. Rhabdoviruses (and other minus-strand RNA viruses) In:**Virology Principles and Applications** .West sussex: Wiley,2007.p. 173-184.

CARVALHO, M.; SPÍNDOLA, R.; CARVALHO, R. et al. Dog rabies transmitted by a bat in urban area os Teresina municipality- Piauí state-Brazil-2006- Reposted case. RITA XVII- Rabie in the Americas. In: REUNIÓN INTERNACIONAL DE RAIVA NAS AMÉRICAS. Brasilia-DF: Ministry of Health-Brasil. Secretariat for Health Department of Epidemiological Surveillance, 2006, 202p.

COSTA,W.A et al. Profilaxia da raiva humana. Manual técnico do Intituto Pasteur. São Paulo,2 ed, v.4,p33, 2000.

COSTA, V.M.; SHIMABUKURO, F.H.; SILVA, R.C.; LANGONI, H. Contribuição do serviço de diagnóstico de zoonoses, FMVZ/UNESP-Botucatu-SP, Brasil, ao diagnóstico de raiva no período de 1991 a 2005.Suplemento. Trabalho apresentado na reunião anual do instituto. *Biológico*, São Paulo, v.68, p.174-176, 2006.

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

DANTAS JUNIOR, J. V. et al. Protocolo de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa para a detecção do vírus da raiva. **Arq. Bras. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p.398-400 ,2004.

DAVIS, A.D.; RUDD, R.J.; BOWEN, R.A. Effects of aerosolized rabies virus exposure on bats and mice. **The journal of Infection diseases**. v.195, p.1144-1150, 2007.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneva: WHO. p.35-82. 1996

DE LUCCA, T.; RODRIGUES, R. C. A.; CASTAGNA, C.; PRESOTTO, D.; NADAI, D. V.; FAGRE, A.; BRAGA, G. B.; GUILLOUX, A. AG. A.; SILVA E ALVES, A. J.; MARTINS, C. M.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A. Assessing the rabies control and surveillance systems in Brazil: An experience of measures toward bats after the AHIT of massive vaccination of dogs and cats in Campinas, São Paulo. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 111, n. 1, p. 126-133, 2013.

DIAZ, A. M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic Analysis of Rabies-virus Isolates from Latin America and the Caribbean. **Journal of Veterinary Medical Biological**, **41**: 153-160, 1994.

EMBRAPA. Eletropherogram quality analysis. Brasília: EMBRAPA, 2006. Disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Acesso em: 15 nov. 2012 a 20 fev. 2013.

FAHL, W.O. **Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos insetívoros *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G**. 2009. 94f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, SP, 2009.

FAVORETTO, S.R., Mattos, C.C., Moraes NB, Araújo FAA, Mattos CA. Rabies in marmosets, Ceara, Brazil -*Callithrix jacchus* -Dispatches. *Emerg Infect Dis*. 7:1062-1065. 2001.

FAVORETTO, S.R. et al. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91-95. 2002.

FAUQUET, C..M. et al. *Virus Taxonomy: The eighth report of the international Committee on Taxonomy of viruses*. Academic Press. San Diego-California (USA); p.1162, 2004.

FERNANDES, C. G. Raiva. In: **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. RIETCORREA,F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. (eds). São Paulo:Varela Editora e Livraria, p.149-162, 2001.

FREULING C. et al. Novel lyssavirus in Natterer's bat, Germany. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1708.110201> Acesso em agosto de 2011.

GALIZA, Glauco J.N. et al.Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. 2010, vol.30, n.3, pp. 267-276. ISSN 0100-736X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000300014>.

GARCIA,A.I.E. **Perfil patogênico de um isolado do vírus da raiva procedente de morcego insetívoro *Lassius ega* e do vírus fixo Challenge Vírus Standard (CVS) no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) e camundongo (*Mus musculus*).**2009.72f.Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, SP,2009.

GERMANO, P.M.L.Avanços na pesquisa da raiva. *Rev. Saúde Pública* [online]. 1994, vol.28, n.1, pp. 86-91. ISSN 0034-8910. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101994000100011>.

GOMES, A. A. B. **Epidemiologia da Raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de patos, Nordeste do Brasil.** 2004.109f.Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, SP, 2004.

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

GUEDES, Karla M.R. et al.Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. 2007, vol.27, n.1, pp. 29-38. ISSN 0100-736X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007000100006>.

HALL, T.A. Bioedit 7.0.9.0: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41.p.95-98.1999.

IBAMA-2013 <http://www.ibama.gov.br/publicadas/caso-de-raiva-humana-no-piaui-alerta-para-o-risco-da-criacao-de-animais-silvestres-em-cativeiro>. Acessado em 27 de maio de 2013.

International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV. Available from: <http://www.ictvonline.org>. Acesso em 2 fev 2013.

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

ITO, M., ITOU, T., SHOJI, Y., SAKAI, T., ITO, H.F., ARAI, T.Y., TAKASAKI, T., KURANE, I., Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase–polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **J. Clin. Virol.** 26, 317–330. 2003a.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAKAI, T.; ITO, F.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain specific reverse transcriptase polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v.26, n.3, p.317-330, 2003b.

JACKSON, A.C. Update on rabies diagnosis and treatment. **Current Infectious Diseases Reports**, v.11(4).p.296-301. 2009.

KIMURA, L.M.S.; DANTAS JUNIOR, J.V.; MOURA, W.C.; KOTAIT, I.; MARIN, V.A.; BRANDÃO, P.E. Reação em cadeia da polimerase como recurso ao diagnóstico da raiva. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.28, p.104-109, 2006.

KISSI, B.; BADRANE, H.; LAVENU, A.; TORDO, N.; BRAHIMI, M.; BOURHY, H. Dynamics of virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2041-2050, 1999.

KOBAYASHI, Y.; INOUE, N.; SATO, G.; ITOU, T.; SANTO, H. P.; BRITO, C. J. C.; GOMES, A. A. B.; SANTOS, M. F. C.; SILVA, M. V.; MOTA, C. M.; ITO, F. H.; SAKAI T. Phylogenetic characterization of rabies virus isolated from carnivora in Brazil. **J. Vet. Med. Sci.** 69, 691-696.2007.

KOPROWSKY, H. The mouse inoculation test. In: **Laboratories Techniques in Rabies**. MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (eds).Geneva, World Health Organization, p. 80-87.1996.

KOTAIT, I et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública.**Boletim epidemiológico paulista(Bepa)**.n.40,v.4,2007.

KOTAIT, I. et al. Raiva aspectos gerais e clínica.**Manual técnico Pasteur**. São Paulo, Instituto Pasteur, ed, 8,p.49,2009.

KOTAIT, I.; NOGUEIRA – FILHO, V, S.; SOUZA, M. C. A. M.; CARRIERI, M. L.; GOMES, M. N.; PERES, N. F. Controle da raiva dos herbívoros. Manual Técnico do Instituto Pasteur, n. 9, p. 8-9, 2010.

KUZMIN, I. V.; HUGHES, G. J.; BOTVINKIN, A. D.; ORCIARI, L. A.;RUPPRECHT, C. E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the *Lyssavirus* genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. **Virus Research**, v.111,p. 28-43, 2005.

MAIER T, SCHWARTING A, MAUER D, ROSS RS, MARTENS A, KLIEM V, WAHL J, PANNING M, BAUMGARTE S, MÜLLER T, PFEFFERLE S, EBEL H, SCHMIDT J, TENNER-RACZ K, RACZ P, SCHMID M, STRÜBER M, WOLTERS B, GOTTHARDT D, BITZ F, FRISCH L, PFEIFFER N, FICKENSCHER H, SAUER P, RUPPRECHT CE, ROGGENDORF M, HAVERICH A, GALLE P, HOYER J, DROSTEN C. Management and outcomes after multiple corneal and solid organ transplantations from a donor infected with rabies virus. *Clinical Infectious Diseases*, v.50, n.8, p.1112-9, 2010.

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

Ministério da Saúde(MS), Secretaria de Vigilância em Saúde(SVS). **Relatório da Reunião para Coordenadores Estaduais do Programa da Raiva**, 2009. Realizada em Brasília-DF no período de 11 a 15 de maio de 2009, 6 p.

Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Boletim eletrônico epidemiológico.ano10,v.2.2010.Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10_n02_sit_epidemiol_zoonoses_br.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2013.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2010**. Brasília:Mapa/ACS, 2010.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Caderno 13 raiva.Brasília..2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_raiva.pdf . acessado em 07 de agosto de 2013.

Ministério da Saúde(MS). Secretaria de Vigilância em Saúde(SVS). Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Casos de raiva humana por espécie agressora, Brasil, 1986-2012**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs/>>. Acesso em: 5 agosto. 2013.

MIRANDA, C.F.J.; SILVA, J.A; MOREIRA, É.C. Human rabies transmitted by dogs: risk areas in Minas Gerais, Brazil, 1991-1999. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, 2003.

MORAIS,N.B.; ROLIM,B.N.; CHAVES,H.H.M.; NETO,J.B.; SILVA,L.M. Rabies in Tamarins (*Callithrix jacchus*) in the State of Ceará, Brazil, a Distinct Viral Variante.**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95(5): 609-610, 2000.

MORAIS, N. B. Proteção oferecida por vacina antirábica humana contra uma cepa dos vírus da Raiva isolado de primatas calitriquídeos no estado do Ceará –Brasil. 2003. 99p.

(Dissertação) - Mestrado em Saúde Pública com Área de Concentração em Epidemiologia – Medicina, Universidade Estadual do Ceará –UECE, Fortaleza, 2003.

MORIKAWA, V. M; RIBEIRO, J.; BIONDO, A. W.; FELLINI, A.; BIER, D.; MOLENTO, M. B. Cat infected by a variant of bat rabies virus in a 29-year disease-free urban area of southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45 n.2, p.255-256, 2012.

NUNES, W.A; ANSELMO, J.L.T; SILVA, C.G.L. Raiva Humana por Mordedura de Sagui: Relato de Caso. IV Encontro Universitário da UFC no Cariri. Juazeiro do Norte, dez.2012. Disponível em: <<http://encontros.cariri.ufc.br/index.php/eu/eu2012/paper/viewFile/1183/944>>. Acesso em 04 agosto 2013.

OLIVEIRA, A.G.F.; CLEMENTINO, I.J.; FREITAS, T.D.; ALVES, C.J.; GOMES, A.A.B. **Comportamento biológico de amostras de vírus rábico isoladas de raposas (*Dusicyon vetulus*), da região do semi-árido do Brasil.** 2001. Trabalho apresentado ao 28º Congresso brasileiro de medicina veterinária, Salvador-Bahia, 2001.

OLIVEIRA, R. N.; TAKAOKA, N.; BRANDÃO, P. E.; CARNIELI Jr, P.; MACEDO, C.; CASTILHO, J.; CARRIEIRI, M. L.; KOTAIT, I. Postmortem Confirmation of Human Rabies Source. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, n.. 5, 2006.

OLIVEIRA, R.N. **Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína.** 2009.81f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, SP, 2009.

ORCIARI, L.A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C.A.; SHADDOCK, J.H.; SANDERLIN, J.H.; YAGER, P.A.; RUPPRECHT, C.E. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v.19, n.31, p.4511-4518, 2001.

ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD (OPAS) Boletín: Vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas. Rio de Janeiro. v.33, 40p, 2001.

PASSOS, E.C.; CARRIEEI, M.L.; DAINOVSKAS, E.; CAMARA, M.; SILVA, M.M.S; Isolamento do vírus rábico em morcego insetívoro *Nyctinomops macrotis*, no município de Diadema, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública** 3: 74-76, 1998.

PESSOA, C.R,M et al. Paralytic rabies in swine. *Braz. J. Microbiol.*[online]. 2011, vol.42, n.1, pp. 298-302. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000100038>.

PEIXOTO, Z. M. P. Rabies Laboratory Diagnosis: Peculiar Features of Samples from Equine Origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31: 01-07, 2000.

PIMENTEL, Luciano A. et al.Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. 2009, vol.29, n.7, pp. 589-597. ISSN 0100-736X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700015>.

QUEIROZ, L. H.; FAVORETTO, S. R.; CUNHA, E. M. S.; CAMPOS, A. C. A.; LOPES, M. C.; CARVALHO, C.; IAMAMOTO, K.; ARAUJO, D. B.; VENDITTI, L. L. R.; RIBEIRO, E. S.; WAGNER, A. P.; DURIGON, E. L. Rabies in southeast Brazil: a change in the epidemiological pattern. *Arch Virol* (2012) 157:93–105.

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

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária**: 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.35, p.1633-1638, 2002.

REIS N.R.;SHIBATTA O.A.;PERACCHIHI,A.L.;PEDRO,W.A.;LIMA,A.L.Sobre os morcegos brasileiros.In: REIS,N.R.;PERACCHIHI,A.L.;PEDRO,W.A.;LIMA,A.L.**Morcegos do Brasil**,Londrina, ,p.18-26,2007.

REAL LA, HENDERSON JC, BIEK R, SNAMAN J, JACK TL, CHILDS JE, STAHL E, WALLER L, TINLINE R, NADIN-DAVIS S Unifying the spatial population dynamics and molecular evolution of epidemic rabies virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.102, n.34, p.12107–12111, 2005.

RIET-CORREA,F., TABOSA I.M., AZEVEDO E.O., MEDEIROS R.M.T., SIMÕES, S.V.D., DANTAS, A.A., ALVES, C.J., NOBRE, V.M.T., ATHAYDE, A.C. & LIMA, E.F. Doenças dos ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba. *Semi-Árido em Foco*, Patos, 1:2-86.2003.

ROBY,R.K.;**High throughput mitochondrial DNA analysis:** optimization of sequence chemistry, characterization of local dye terminator sequencing frames, and tool for the development of an expert system.2008.225p.Tese (Doutorado),Universidade de Granada, Granada ,2008.

ROMIJN, P. C. et al. Study of Lyssavirus of bat origin as a source of Rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro – Brazil. **Am. J. Tropical Med. Hyg.**, Baltimore, v. 69, p. 81-86, 2003.

RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; HEMACHUDHA, T.Rabies re-examined.The Lancet infection diseases, v.2, p.327-343, 2002.

SILVA, M. V. et al. Vírus rábico em morcego *Nyctinomops laticaudatus* na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: isolamento, titulação e epidemiologia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 479-481, 2007.

SILVA,M.L.C.R,LIMA,F.S,GUEDES,K.M.R,GOMES,A.A.B. **Raiva experimental em cães inoculados com uma amostra isolada de raposa(*Pseudalopex vetulus*)** *Agropecuária científica no semi-árido*. ISSN 1868-4586,v.04,32-36,2008.

SILVA, Luiz Augustinho Menezes da et al. Rabies virus in *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae) in the State of Pernambuco, Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2011, vol.44, n.4 ISSN 0037-8682.

SOUZA,Fernando José Pires.**Eficácia de uma vacina comercial contra a raiva frente a desafios com amostras de vírus de campo comparados ao desafio padrão no teste NIH** Jaboticabal:UNESP, 2009.70p.Tese (doutorado)- Programa de pós graduação em medicina veterinária preventiva-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP,Jaboticabal,2009.

SHANKAR V., DIETZCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Direct entry of rabies virus into central nervous system without prior local replication. **Journal Virology**.65:2736-2738,1991.

SHIRAKAWA,R.K.**Ensaio sobre inoculação intramuscular e alimentação de gatos domésticos (*Felis catus*) com cérebro de camundongos previamente inoculados com vírus da raiva**.2003.56f.Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.2003

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; CUNHA, E. M.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A.; NOCITTI, D. P.; ITO, F. H.; KURANE, I.; SAKAI, T. Genetic characterization of rabies viroses isolated from frugivorous bat (*Artibeus* spp.) in Brazil. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 66, n. 10, p. 1271-1273, 2004.

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

TAMURA,K.;DUDLEY,J.;NEI,M;KUMAR,S. Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**,v.24,n.8,p1596-1599,2007.

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

VIEIRA, L. F. P.; FERREIRA, S. R.; PEREIRA, G.; CARNIELI JR, P.; TAVARES, L. C. B.; KOTAIT, I. Phylogeography of rabies virus isolated from herbivores and bats in the Espírito Santo State, Brazil. *Virus Genes* (2013) 46:330–336

VORA NM, BASAVARAJU SV, FELDMAN KA, PADDOCK CD, ORCIARI L, GITTERMAN S, GRIESE S, WALLACE RM, SAID M, BLAU DM, SELVAGGI G, VELASCO-VILLA A, RITTER J, YAGER P, KRESCH A, NIEZGODA M, BLANTON J, STOSOR V, FALTA EM, LYON GM 3RD, ZEMBOWER T, KUZMINA N, ROHATGI PK, RECUENCO S, ZAKI S, DAMON I, FRANKA R, KUEHNERT MJ; Transplant-Associated Rabies Virus Transmission Investigation Team. Raccoon rabies virus variant transmission through solid organ transplantation. *Journal of American Medical Association*, v. 24;310(4), p.398-407, 2013

WADA, M. Y. et al. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no Município de Portel-Pará, março/abril de 2004. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*. v. 4, n. 6, p. 1 - 5, 2004.

WADA, Marcelo Yoshito; ROCHA, Silene Manrique; MAIA-ELKHOURY, Ana Nilce Silveira. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v.20, n.4, dez. 2011 Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/ess/v20n4/v20n4a10.pdf> acessado em 19 fev. 2013

WASIK, Bill; MURPHY, Monica. **Rabid: A cultural history of the world's most diabolical virus**. New York, Viking Penguin, 1 ed. 2012.

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

WUNNER, W.H. Rabies Virus. In Jacteson, A. C.; Wunner, W.H. Immunology. Eds Rabies – Academic Press, London, p. 23-76, 2002.

WUNNER,H.W.Rabies virus. In: JACKSON, A.C.;WUNNER,H.W.(Ed.) **Rabies**. San Diego: Academic press, 2 ed. p.93-111.2007

WUNNER, William.H; BRIGGS, Deborah.J. Rabies in the 21st Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**,EUA, v.4, p.1-2, 2010.

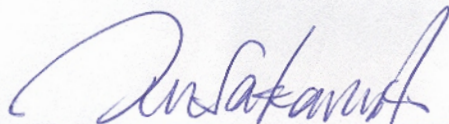
WHO-word survey of rabies, 32-For the year, 1996-Disease surveillance and control.WHO/EMC/ZDI/98.4,1996.

WHO Expert Consultation on Rabies.,2004 ,Geneva, Switzerland **Expert Consultation on Rabies: First Report::WHO,2005.87p** (Technical report series,931).

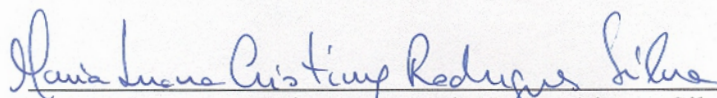
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 92/2013

Das **16:00** às **18:00** horas do dia **29** de Agosto do ano de dois mil e **treze**, na sala de Pós-Graduação CI-UFERSA da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, sob a presidência do Prof Doutor **Sidnei Miyoshi Sakamoto**, reuniu-se a Banca Examinadora de Defesa de Dissertação de Mestrado, de autoria de **Wanessa Basílio de Menezes**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal desta Universidade com o título: **Caracterização molecular de isolados do vírus rábico dos estados do RN, PB e PE**. A Banca Examinadora ficou assim constituída: Prof Dr **Sidnei Miyoshi Sakamoto**, Presidente da Banca e Orientador, Prof Dr **Albério Antonio de Barros Gomes** e Profa Dra **Maria Luama Cristiny Rodrigues Silva**, como examinadores. Não foram registradas ocorrências. Concluída a defesa, foram realizadas as arguições e algumas sugestões feitas e acatadas. Em seguida procedeu-se o julgamento pelos membros da Banca Examinadora, tendo a dissertação sido **APROVADA**. E, para constar, eu, **Sidnei Miyoshi Sakamoto**, Presidente da Banca Examinadora, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme, foi assinada por mim e demais membros da Banca Examinadora.

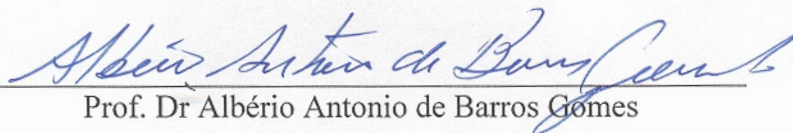
Mossoró, 29 de Agosto de 2013.



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto



Profa. Dra Maria Luama Cristiny Rodrigues Silva



Prof. Dr. Albério Antonio de Barros Gomes