KEILA IAMAMOTO

Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo

São Paulo
2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

KEILA IAMAMOTO

Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz da Silva

São Paulo
2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T. 1492
FMVZ

Iamamoto, Keila
Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo / Keila Iamamoto. – São Paulo : K. Iamamoto, 2005.
76 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

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

Orientador: Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz da Silva.

1. Raiva. 2. Animais silvestres. 3. Diagnóstico. 4. Chiroptera. 5. Rodentia. 6. Marsupialia. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo", Protocolo nº291/2003, utilizando 2000 (estimativa) comundongos, sob a responsabilidade da Profª Drª Luzia Helena Queiroz da Silva (UNESP/Araçatuba), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/10/03.

(We certify that the Research "Research of rabies virus in wild mammals from a private animal reserve in Ribeirão Grande, São Paulo, Brasil" protocol number 291/2003, utilizing 2000 mice, under the responsibility of Prof. Dr. Luzia Helena Queiroz da Silva (UNESP/Araçatuva), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 10/29/2003, meeting.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-000 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fones: (011) 3091-7671/3091-7676 Fax: (011) 3032-2224

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome da autora: IAMAMOTO, Keila

Título: Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Às pessoas que mais amo em minha vida:
Deus, o meu criador;
Timóteo e Irene, meus pais;
Heber e Tércio, meus irmãos;
Teru Tamai, meu grande amor.

À minha orientadora e amiga,
Luzia Helena Queiroz da Silva.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz da Silva, minha orientadora, pelos ensinamentos, pela amizade, compreensão, confiança e pelo apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Fumio Honma Ito, por sua prontidão em nos ajudar, por sua amizade e seus ensinamentos.

À Juliana Quadros e sua equipe, por terem aceitado nossa parceria, possibilitando a realização desta pesquisa . Agradeço também pelas fotos gentilmente cedidas.

À Profa. Cáris Maroni, por nos auxiliar nos cálculos de amostragem e por sua contribuição na elaboração da dissertação.

Ao Prof. Sílvio Arruda Vasconcellos, pelo incentivo, apoio, e pela maneira como coordena o curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Ao “Tião”, taxidermista do Museu de História Natural Capão de Imbuia, que realizou a coleta de todas as amostras.

Ao João Linhares, coordenador do Projeto Fernandes da Companhia Brasileira de Equipamentos, e ao Manoel Domingues, da Juris Ambientis Consultores Ltda., que permitiram a inclusão do meu projeto.

À Dra. Tereza Mitiko Omoto, médica sanitarista do Instituto Pasteur, por ter disponibilizado os dados da Coordenação do Programa de Controle de Raiva do Estado de São Paulo.

Ao Cristiano de Carvalho, técnico do laboratório de diagnóstico de raiva da UNESP de Araçatuba, por ter me ensinado todos os procedimentos do laboratório e pelo auxílio prestado.

À Devani Mariano Pinheiro, por ter me ensinado e me ajudado com a rotina do infectório, mesmo nos momentos de dores.

Ao Biotério Central da UNESP de Botucatu e ao Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba, por fornecerem os camundongos necessários para a realização deste projeto.

Ao Sr. Jorge Watanabe, por ter fornecido a maravalha durante todo o período em que realizamos a pesquisa.

À bibliotecária, Elza Faquim, sempre atenciosa e paciente.

Aos colegas da Pós-graduação, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos meus familiares e amigos, que sempre torceram por mim.

Aos meus pais e aos meus irmãos pelo apoio, pela paciência e compreensão.

Ao Teru Tamai, pela confiança e compreensão, mesmo estando tão longe.

Ao Dr. Antônio Messias da Costa, grande amigo e incentivador para o meu ingresso neste curso de mestrado.

À Capes pela concessão de uma bolsa e à Fundunesp (00806/03) pelo auxílio financeiro oferecido ao projeto.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu:
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar
e tempo de arrancar o que se plantou;
tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derribar, e tempo de edificar;
tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de saltar de alegria;
tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar as pedras; tempo de abraçar,
e tempo de afastar-se de abraçar;
tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de deitar fora;
tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar;
tempo de amar, e tempo de aborrecer; tempo de guerra, e tempo de paz.

Eclesiastes 3:1-8

RESUMO

IAMAMOTO, K. **Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo**. [Rabies virus search in wild mammals from a private natural reserve from Ribeirão Grande, São Paulo]. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

No Brasil e em alguns países da América Latina, a incidência de raiva transmitida por animais domésticos tem diminuído enquanto tem aumentado em animais silvestres. Durante os últimos anos, no Brasil, a raiva tem sido diagnosticada em morcegos hematófagos ou não, primatas não-humanos, cachorros-do-mato, quatis, guaxinins, capivaras, cervos, gambás e outras espécies silvestres. O presente estudo foi realizado em parceria com biólogos, pesquisadores na área de monitoramento de fauna silvestre, e o objetivo foi pesquisar a presença do vírus rábico em mamíferos silvestres de vida livre, provenientes de uma reserva natural particular, localizado no município de Ribeirão Grande, São Paulo, região que já foi alvo de raiva nos últimos anos. Durante o período de 2002 a 2004, 104 amostras de cérebro de animais capturados foram enviadas para diagnóstico no Laboratório de Raiva da UNESP de Araçatuba, SP, acondicionadas em pipetas plásticas do tipo Pasteur individuais. Os animais pertenciam a três ordens, Chiroptera (47,1%), Rodentia (46,2%) e Marsupialia (6,7%), sendo de diferentes idades e sexos. As amostras foram submetidas ao teste de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos e todas apresentaram resultado negativo para a raiva. Segundo dados da Coordenação do Programa de Controle da Raiva do Estado de São Paulo a raiva é endêmica na região estudada e a porcentagem de positividade em morcegos nos últimos dez anos é de 1,8%. Embora dos

diagnósticos tenham sido negativos neste estudo, não é possível afirmar que o vírus rábico não circula naquela propriedade.

Palavras-chave: Raiva. Animais Silvestres. Diagnóstico. Chiroptera. Rodentia. Marsupialia.

ABSTRACT

IAMAMOTO, K. **Rabies virus search in wild mammals from a private natural reserve from Ribeirão Grande, São Paulo**. [Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo]. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

In Brazil and some Latin American countries, the incidence of rabies transmitted by domestic animals has decreased while it has been increasing in wild animals. During the last few years rabies has been diagnosed in hematophagous or nonhematophagous bats, nonhuman primates, crab-eating foxes, coatis, raccoons, capybaras, deers, skunks and some other species. The present study was carried out with biologists, researchers in wild fauna monitoring and the objective was to search the presence of the rabies virus in wildlife mammals from a private natural reserve, in Ribeirão Grande city, SP, region that was target of rabies in the last few years. During 2002 to 2004, 104 brain samples of captured animals were sent for diagnosis to UNESP Rabies Laboratory from Araçatuba, SP, conditioned in individuals Pasteur plastic pipettes. The animals belonged to three different orders, Chiroptera (47,1%), Rodentia (46,2%) and Marsupialia (6,7%), and to different ages and sex. The samples were submitted to direct fluorescent antibody test and mouse inoculation test and all samples resulted negative for rabies. According to data of the Rabies Control Program Coordination from São Paulo State, rabies is endemic in the studied region and the percentage of positive cases in bats during the last 10 years was 1,8%. Although all diagnosis were negative in this study, it is not possible to affirm that the rabies virus do not circulate in that property.

Key words: Rabies. Wild animals. Diagnosis. Chiroptera. Rodentia. Marsupialia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área da propriedade pertencente à Companhia Brasileira de Equipamentos, em Ribeirão Grande, SP. Ao fundo, mata onde foram realizadas as capturas e à frente, área de aterramento 53

Figura 2 - Mapa do Estado de São Paulo, destacando Ribeirão Grande e municípios considerados 53

Figura 3 - Armadilha metálica do tipo Sherman montada em solo 54

Figura 4 - Armadilha metálica de grade montada sobre o galho de uma árvore 54

Figura 5 - Armadilha-de-queda com baldes enterrados (“pitfall”) 55

Figura 6 - Canaleta artificial com obstáculo de tela metálica 55

Figura 7 - Pipeta plática do tipo Pasteur introduzida através do forame magno, preservando-se a integridade craniana 56

Figura 8 - Pipeta plática do tipo Pasteur com amostra de cérebro após a aspiração 56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diagnóstico de raiva segundo o ano e a espécie animal avaliada durante o período de 1994 a 2003, em diferentes municípios[1] próximos à Ribeirão Grande-SP 48

Quadro 2 – Animais enviados aos laboratório de diagnóstico de Raiva da Unesp de Araçatuba segundo Ordem, Família, Gênero, Espécie, Sexo e Idade, 2002-2004 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
CBE	Companhia Brasileira de Equipamentos
DFA	anticorpo fluorescente direto
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAVN	teste fluorescente de vírus neutralização
GABA	ácido gama-amino-butírico
GT	genotipo
ha	hectare
ICC	inoculação intracerebral em camundongos
IFD	imunofluorescência direta
Km^2	quilômetro quadrado
nm	nanômetro
OPAS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	solução salina fosfatada
RFFIT	teste de inibição rápida de focos fluorescentes
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação em cadeia pela polimerase - transcriptase reversa
SNC	sistema nervoso central
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
USA	Estados Unidos da América
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 18
2 **REVISÃO DE LITERATURA** 21
2.1 HISTÓRICO 21
2.2 ETIOLOGIA 24
2.3 EPIDEMIOLOGIA 26
2.4 PATAGENIA 37
2.5 DIAGNÓSTICO 40
2.6 PREVENÇÃO E CONTROLE 42
3 **MATERIAIS E MÉTODOS** 46
3.1 ÁREA DE ESTUDO 46
3.2 OS ANIMAIS 49
3.3 CAPTURA 49
3.4 COLETA DO ENCÉFALO 50
3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL 51
3.5.1 **Imunofluorescência direta** 51
3.5.2 **Inoculação intracerebral em camundongos** 52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
5 CONCLUSÕES 65
REFERÊNCIAS 66
APÊNDICE 76

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade caracterizada por uma encefalite viral aguda geralmente fatal tanto para animais quanto para os seres humanos. Os agentes etiológicos envolvidos são vírus RNA, neurotrópicos, pertences ao gênero *Lyssavirus*, família Rhabdoviridae (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001).

Devido a sua evolução letal, ao elevado número de casos em humanos, bem como de pessoas submetidas anualmente ao tratamento anti-rábico pós-exposição, a raiva continua sendo um problema de saúde publica em todo o mundo. Porém, a falta de sistemas adequados de informação e vigilância epidemiológica na maioria dos países, não permite o conhecimento da real magnitude do problema (BELOTTO, 2000). No mundo, estima-se que 10 milhões de pessoas submetam-se anualmente ao tratamento anti-rábico após exposição a algum animal suspeito de raiva e que o número de mortes anuais causadas por esta doença esteja entre 40.000 a 70.000 casos, lembrando-se que estimativas mais elevadas são usadas para países com altas densidades populacionais da África e Ásia, lugares onde a raiva é endêmica (WHO, 2001). No entanto, é importante salientar que em muitos países africanos e asiáticos o diagnóstico da raiva, na maioria dos casos, é realizado apenas clinicamente, ou seja, não adotam-se os testes laboratoriais como ferramentas auxiliares na rotina (WHO, 1999).

A principal fonte de infecção do vírus rábico em vários países europeus e no Canadá são os animais silvestres. Nos Estados Unidos, após um programa de prevenção à raiva que consistia na vacinação de humanos e de cães, que iniciou-se na década de 1920, observou-se que o índice de sua ocorrência em animais

domésticos começou a decrescer, aumentando porém o número de casos em animais silvestres, principalmente em guaxinins, gambás, raposas e morcegos (RUPPRECHT et al., 1995). Desde 1990, as espécies silvestres representam mais de 90% dos casos notificados (KING, 1998).

Um quadro semelhante ao ocorrido nos Estados Unidos e na Europa pode vir a ocorrer no Brasil e em outros países da América pois tem se observado a diminuição de casos em animais domésticos e o aumento da incidência em animais silvestres nos últimos anos. Desde 1988, os morcegos tornaram-se a segunda fonte de infecção mais importante da raiva para humanos no Brasil, sendo esta classificação antes pertencente aos gatos domésticos (ALMEIDA et al., 2001). No entanto, em 2004, observou-se pela primeira vez um número maior de casos de raiva em humanos transmitida por morcegos hematófagos (22 casos) em relação aos casos transmitidos por cães (5 casos) (OPAS, 2004). Além do mais, durante os últimos anos, o vírus rábico tem sido diagnosticado em outras espécies silvestres como raposas, primatas não-humanos, cangambás, quatis e outras espécies não identificadas (CORRÊA; PASSOS, 2001).

No Estado de São Paulo uma alteração no perfil epidemiológico da raiva também tem sido observada nos últimos anos, com considerável diminuição progressiva nos casos de cães e gatos, resultante das campanhas de vacinação e com um aumento crescente da doença em herbívoros e morcegos hematófagos ou não (TAKAOKA, 2000).

A chave para um programa bem sucedido de controle e prevenção da raiva é um sistema de vigilância efetivo, baseado preferencialmente em diagnóstico laboratorial (RUPPRECHT, 2003). A obtenção das amostras se faz geralmente pela busca passiva, ou seja, o material de um animal suspeito é enviado ao laboratório,

sendo este procedimento adotado tanto para animais domésticos quanto silvestres. A busca ativa é um procedimento extremamente trabalhoso além de oneroso, justificando-se somente em casos especiais, em se tratando da raiva (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001).

O presente estudo realizou-se em parceria com um grupo de pesquisadores que desenvolvem um "Programa Básico Ambiental de Monitoramento da Fauna – área específica Mastofauna" da Companhia Brasileira de Equipamentos (CBE), em Ribeirão Grande, São Paulo, cujo principal objetivo é avaliar as interferências das atividades de aterramento sobre a mastofauna que vive ao redor da obra, em uma área de reserva natural particular, por meio do monitoramento de certas espécies, sendo as espécies escolhidas pertencentes às ordens Chiroptera, Rodentia e Marsupialia. Na primeira fase do programa, foi necessária a identificação das espécies que viviam naquela área e para tanto, a captura e a eutanásia de alguns animais foram imprescindíveis para posterior taxidermia e identificação. O encéfalo da maioria dos animais eutanasiados foi cuidadosamente retirado, preservando-se a integridade craniana, sendo encaminhados posteriormente para o diagnóstico de raiva.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi de pesquisar a presença do vírus rábico em mamíferos silvestres de vida livre, provenientes de uma reserva natural particular, localizado no município de Ribeirão Grande, Estado de São Paulo, região que já foi alvo de surtos de raiva nos últimos anos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura procurou-se abordar os principais aspectos sobre o histórico da doença, epidemiologia (com ênfase nos principais reservatórios no Brasil e no mundo), patogenia, diagnóstico, prevenção e controle.

2.1 HISTÓRICO

A palavra "raiva" provém do latim, *rabere*, que significa delirar, desvairar, que por sua vez tem sua origem no sânscrito antigo, *rabhas*, cuja tradução é "fazer violência" (BERAN,1994; STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Descrita pelo menos há 4 milênios, a raiva é uma das doenças infecciosas mais antigas que se tem conhecimento (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). O primeiro registro da doença, segundo Albright[1] (1952 apud BERAN, 1994, p.307), encontra-se no Código Sumariano da cidade de Eshnunna, datando 1885 a.C., contendo a seguinte lei:

> [...] se um cão está louco e as autoridades informaram o proprietário e o mesmo não prender o cão, se este então morder um homem e causar a sua morte, o proprietário do cão deverá pagar dois terços de uma mina (40 shekels) de prata.

Na Grécia, as primeiras descrições da doença em cães realizaram-se por Demócritos, 500 a. C., e Aristóteles, no século IV a. C., mas não reconheciam o

[1]ALBRIGHT, W. F. The old testament world. In: BUTTRICK, G. H.; BOWIE, W. R.; SCHERER, P.; KNOX, J.; TERRIEN, S.; HARMON, N. B. **The interpreter's Bible**. New York: Abingdon Press, 1952. v. 6, p. 233.

acometimento de humanos. Em humanos o responsável pela primeira descrição foi Hipócrates (BERAN, 1994; STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Cardanus, um escritor romano, descreveu a infectividade da saliva dos cães raivosos como um “material venenoso”, cuja palavra latina era “vírus”. Outra possível causa, segundo Pliny e Ovid, seria a presença de um “verme da língua de cão” (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Celsus, físico do século I, foi enfático ao dizer que todos os animais que continham o “veneno”, eram perigosos para o homem e para outros animais. Afirmava ainda que a hidrofobia, como chamavam os gregos, caracterizava-se por uma pessoa atormentada, com sede e com medo de água concomitantemente. Foi o primeiro a recomendar o tratamento da ferida com substâncias cáusticas, fogo, aplicação de sal, sangria por meio de ventosas ou sugadura, cada método com sua indicação (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Foi a partir do século XIX que a ciência deu um grande salto no conhecimento da raiva e descobertas muito importantes ocorreram. Em 1804, Zinke demonstrou pela primeira vez que a raiva poderia ser transmitida pela saliva, contaminando incisões superficiais na pele do animal sadio com a saliva do animal doente. Escreveu um livro sobre a fonte, a patogênese e o tratamento da doença, em que ainda observava-se traços de superstição mas já com algumas idéias modernas, como por exemplo, a lavagem da ferida por horas (KAPLAN, 1985; STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Em 1879, Galtier demonstrou a transmissão da doença em coelhos e de coelhos para coelhos, observando-se um período de incubação de 18 dias, paralisia e convulsões. Não expôs, porém, com muitos detalhes o método da transmissão (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

O trabalho definitivo sobre a transmissão da raiva foi realizado por Louis Pasteur. Em 1881, concluiu que o sistema nervoso central (SNC) estava envolvido no desenvolvimento da doença, provando que o vírus não estava presente somente na saliva. Posteriormente, descobriu que, injetando-se o material de SNC de um animal raivoso diretamente no cérebro de outro animal, o período médio de incubação era de duas semanas. Em 1884, por meio de experimentos, concluiu que todo o SNC era suscetível à raiva, levantando ainda a suspeita de que o microorganismo envolvido seria extremamente pequeno. Além disso, em colaboração de Chamberland e Roux, estudou a atenuação do vírus (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Neste mesmo ano, demonstrou com sucesso a primeira imunização em cães e no ano seguinte, em um garoto de nove anos, Joseph Meister. Em ambos os casos, o tratamento realizou-se pós-exposição, utilizando-se suspensão da medula espinal de coelhos infectados e obtendo sucesso nos resultados (BERAN,1994; STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Em 1903, Paul Remlinger conseguiu demonstrar a filtrabilidade do agente etiológico da raiva. No mesmo ano, Aldechi Negri observou a presença de corpúsculos de inclusão em tecido nervoso, apontando-os como o agente da doença (BERAN, 1994; WILKINSON, 1988). Os corpúsculos de Negri tornaram-se achados patognômonicos para a raiva.

O diagnóstico da raiva deu um grande salto com o desenvolvimento do teste de inoculação intracerebral em camundongos (ICC), por Webster e Dawson, em 1935. Descobriram que o camundongo era suscetível a viroses neurotrópicas e observaram que a raiva era reproduzida por inoculação intracerebral de amostra de cérebro de cão que continha o corpúsculo de Negri. Com o teste em camundongos constatou-se que em apenas 85 a 95% dos casos positivos de raiva eram

encontrados os corpúsculos de Negri ao exame microscópico (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Goldwasser e Kissiling, em 1958, reportaram a aplicação do teste de imunofluorescência direta (IFD) para demonstrar o antígeno da raiva no tecido do SNC. O teste também tem sido utilizado para vários outros tecidos como células da córnea, da mucosa oro-nasal e bulbo capilar porém, seu uso mais freqüente é em tecido cerebral *post mortem* (BERAN, 1994). Ainda hoje, o teste de imunofluorescência direta e o teste de inoculação intracerebral em camundongos são considerados os testes de eleição para o diagnóstico da raiva (MESLIN; KAPLAN, 1996)

2.2 ETIOLOGIA

Os agentes etiológicos envolvidos pertencem à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae e ao gênero *Lyssavirus* (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001). Neste gênero estão agrupados o vírus da raiva e os vírus relacionados genética e antigênicamente, sendo todos adaptados à replicação no sistema nervoso central (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

Os vírions possuem um formato peculiar semelhante a uma bala de revólver, com aproximadamente 180nm de comprimento e 75nm de diâmetro. São compostos por uma ribonucleoproteína interna, que contém o RNA genômico associado a 3 proteínas internas: a transcriptase, a nucleoproteína e a fosfoproteína. Juntas formam o complexo RNA ativo, o qual é funcional no processo de transcrição e replicação. Externamente, existe um envelope de bicamada lipídica, sendo que no interior desta bicamada, encontra-se a proteína da matriz. Ainda no envelope, na

sua superfície externa, existe a presença da glicoproteína (BERAN, 1994; KING, 1998; RUPPRECHT et al., 1991).

Antigamente acreditava-se que apenas uma espécie de vírus causava a doença, até que por meio de métodos sorológicos, antigênicos e genéticos, baseados principalmente em estudos da glicoproteína e da nucleoproteína, comprovou-se a existência de pelo menos 7 genotipos (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

O genotipo 1 (GT1), representado pelo vírus rábico, é o membro mais significativo do gênero, apresentando uma ampla distribuição mundial, além de uma importância na saúde pública e veterinária. Anteriormente eram denominados vírus fixo ou de vacina (vírus adaptado por passagens em animais ou culturas de células) e vírus de rua ou silvestre (vírus não adaptado), porém com o uso da técnica de anticorpos monoclonais e com o avanço das técnicas moleculares, identificaram-se e diferenciaram-se diversas variantes originadas de diferentes reservatórios, tanto domésticos quanto silvestres, principalmente carnívoros e quirópteros. Os vírus Lagos Bat (GT2), Mokola (GT3) e Duvenhage (GT4) foram isolados no continente Africano e a epidemiologia destes ainda é pouco conhecida. Os dois primeiros foram isolados primeiramente em animais silvestres e posteriormente em animais domésticos. No continente Europeu foram isolados os vírus European Bat I (GT5) e European Bat II (GT6) em morcegos insetívoros. Na Austrália identificou-se o GT7, o vírus Australian Bat, isolado de morcegos frugívoros e insetívoros (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). Dois novos lyssavírus foram isolados de morcegos no continente asiático: o vírus Aravan , no Quirguistão, e o vírus Khujand, no Tadjiquistão, em 1991 e 2001, respectivamente, sugerindo novos genotipos (ARAI et al., 2003; KUZMIN et al., 2003).

Por meio de técnicas moleculares, tem se desenvolvido o estudo filogenético destes vírus, sendo que os 7 genotipos foram divididos em 2 filogrupos: o filogrupo 1, composto pelos GT1, GT4, GT5, GT6 e GT7, e o filogrupo 2,composto pelo GT2 e GT3. Estudos revelaram ainda que existe uma variação de patogenicidade entre os dois filogrupos e com relação à imunidade, a neutralização cruzada ocorre somente dentro do filogrupo, mas não entre os filogrupos (BADRANE et al., 2001; TORDO et al., 2003).

2.3 EPIDEMILOGIA

Embora todos os animais vertebrados de sangue quente sejam suscetíveis à infecção experimental, apenas os mamíferos são importantes na epidemiologia da raiva. Existem mais de 4.000 espécies na classe Mammalia, todos teoricamente suscetíveis e capazes de infectar outros mamíferos (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001), observando-se dentro deste grupo alguns mais aptos que outros na dispersão do vírus rábico e uma variação de suscetibilidade entre as espécies (KAPLAN, 1985). O vírus já foi isolado de quase todas as ordens de mamíferos, porém os que são considerados reservatórios pertencem principalmente às ordens Carnivora e Chiroptera (ACHA; SZYFRES, 2003; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

A epidemiologia dos Lyssavírus é influenciada, em parte, pela distribuição, abundância, demografia, ecologia comportamental, dispersão das espécies de reservatórios, assim como pelas suas interações com seres humanos (RUPPRECHT et al., 1995).

No mundo, o cão doméstico ainda é o principal reservatório da doença para humanos (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001). Os morcegos são reservatórios extremamente importantes em todos os continentes habitados e seis dos sete genotipos descritos, são encontrados nesta ordem de mamíferos (BADRANE et al., 2001). Quanto aos felinos, tanto os domésticos quanto os silvestres, apesar de serem altamente suscetíveis e capazes de transmitir a doença, ainda não foi possível a identificação de uma variante específica desta espécie e a transmissão entre felinos parece ser limitada (BERAN, 1994). Os animais pertencentes às ordens Rodentia e Lagomorpha, embora usados amplamente como modelos laboratoriais, raramente são diagnosticados como positivos para a raiva, porém apresentam relevância na saúde pública dedicada à rotina de consulta ou profilaxia após contato com estes pequenos mamíferos ubíquos. (BERAN, 1994; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002). Na literatura existem alguns trabalhos em que foram capturados um grande número de roedores, obtendo-se somente resultados negativos para a raiva (BROWN; TINGPALAPONG; ANDREWS, 1979; CELER; MATOUCH; JUNIOR CELER, 1994; KANTAKAMALAKUL et al., 2003; KULONEM; BOLDINA, 1996), porém existem outros que comprovam a detecção de antígeno e isolamento viral (CHILDS et al., 1997; FISHBEIN et al., 1986; SODJA; LIM; MATOUCH, 1971; SVRCEK et al., 1984). Com relação aos marsupiais, poucos dados existem na literatura disponível, considerando-se raros os casos de raiva nas espécies desta ordem. Os gambás[2] (animais pertencentes às famílias Didelphidae),

[2]Em inglês, existem dois nomes populares de mamíferos, “skunk” e “opossum”, que na língua portuguesa podem possuir a mesma tradução, “gambá”. Apesar de receberem o mesmo nome, são mamíferos pertencentes a ordens, famílias e espécies diferentes. O “skunk”, cujo nome científico é *Mephitis mephitis,* pertence à ordem Carnivora e à família Mustelidae. Já o “opossum”, *Didelphis sp.,* pertence à ordem Didelphimorphia e à família Didelphidae. Dentro desta mesma ordem e família, temos ainda, por exemplo, o “short-tailed opossum”, *Monodelphis sp.* No texto, para “skunk”, traduziu-se como cangambá, enquanto “opossum”, como gambá. Existe apenas uma exceção, que é com relação aos dados da OPAS, em que a tradução encontrada para “zorrillo” foi cangambá, porém não se tem acesso aos nomes científicos dos animais em questão para certificar-se da espécie.

são considerados menos suscetíveis à raiva que outras espécies de mamíferos (WHO[3], 1973 apud ALMEIDA et al., 2001, p. 397), embora possam se infectar.

Na Ásia, os registros da doença são predominantemente em canídeos, tendo o cão como principal reservatório e principal causador de fatalidades para o homem (WHO, 1998). Porém, a dificuldade na obtenção de dados sobre casos de raiva ainda é uma realidade em muitos países deste continente (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). A ocorrência da raiva varia entre os países, sendo que alguns são considerados "livres", como por exemplo, o Japão, Coréia, Catar, Singapura e Bahrain (BERAN, 1994; WHO, 1999). Raposas (*Vulpes vulpes*, *Vulpes rueppelli*), lobos (*Canis lupus arabs*), hienas (*Hyaena hyaena*), chacais (*Canis aureus*) e mangustos (*Ichneumia albicauda*) são importantes reservatórios silvestres na Ásia (BERAN, 1994; KAPLAN, 1985; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). A raiva em morcegos é raramente reportada, lembrando-se que geralmente os morcegos são capturados para exame somente após uma exposição humana (KING, 1998).

No continente africano são poucos registros da doença, sendo que não existem documentações científicas disponíveis antes de 1928. Existem evidências de que os lyssavírus tenham sua origem neste continente por ser este o único lugar, dentre outros continentes, onde observa-se a presença de quatro genotipos. O papel dos animais silvestres na manutenção da doença na África, é obscurecida pela presença do cão doméstico. A falta de equipes experientes, de equipamentos e sistemas de comunicações adequados, levam a um sistema de vigilância também inadequado. Em toda a África, a raiva tem sido diagnosticada em muitas espécies de animais silvestres: chacais (*Canis mesomelas, Canis adustus, Canis simensis*),

[3]WHO. Rabies. Informe técnico n. 523, sixth report, WHO, Geneva, Switzerland, 1973. 49 p.

raposas (*Otocyon megalotis, Vulpes,* sp.), mangustos (*Ichneumia albicauda, Cynictis penicillata*), gerbils (*Gerbillus gerbillus, Tatera leucogaster*), “civets” (*Civettictis civetta*), texugos (*Mellivora capensis*), hienas (*Crocuta crocuta*), entre outros (KAPLAN, 1985; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001).

No continente europeu, as epidemias de raiva envolvendo animais e pessoas começaram a ser descritas no século XIII (BAER, 1994). Durante muitos séculos na Europa Ocidental e Central a doença foi prevalente tanto em animais domésticos quanto em animais selvagens, especialmente raposas e lobos (*Canis lupus*) (WILKINSON, 1988), existindo também relatos em texugo (*Meles meles*) e urso (*Ursus arctos*) (STEELE; FERNANDEZ, 1991). A raiva em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), que era comum nos países da Europa no século XIX, diminuiu em grande escala por motivos desconhecido, porém, após a II Guerra Mundial, a doença reemergiu na mesma população espalhando-se pela Europa, da Polônia para a região leste da Alemanha (BERAN, 1994; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). Além das raposas vermelhas, existem as raposas do Ártico, que encontram-se em uma extensão menor em áreas do círculo polar (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). No ano de 1999, 839 casos de raiva foram diagnosticados em cães domésticos, enquanto que em raposas, observou-se um total de 3.273 casos (WHO, 1999). Outro importante reservatório na Europa é o “racoon dog” (*Nyctereutes procyonoides*) que parece ser capaz de coexistir nos mesmos habitats que as raposas vermelhas (KAPLAN, 1985). A raiva em morcegos da Europa foi reconhecida pela primeira vez no início da década de 50 e um aumento de casos inesperado ocorreu em 1985, com um pico em 1987. Uma explicação para este aumento seria a maior atenção que foi dada aos morcegos como um reservatório em potencial da raiva. As duas espécies mais freqüentemente acometidas são o

Epitesicus serotinus e o *Myotis* spp. (KING,1998; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001).

Na América do Norte, a epidemiologia da raiva tem sofrido mudanças nos últimos 100 anos (RUPPRECHT et al., 1995). Atualmente, mais de 90% dos casos ocorrem em animais silvestres (KREBS et al., 1998). Entre as espécies mais importantes estão os guaxinins (*Procyon lotor*), cangambás (*Mephitis mephitis*, *Spilogale putoris*), raposas (*Alopex lagopus*, *Vulpes vulpes* e *Urocyon cinereoargenteus*), coiotes (*Canis latrans*) e morcegos insetívoros (KAPLAN, 1985; KING, 1998).

Na América Central e na América do Sul, a raiva continua causando sérios problemas econômicos e de saúde pública (KING, 1998). A raiva canina é enzoótica na maioria dos países da América Latina (SMITH; BAER, 1988), sendo o cão a principal fonte de infecção para o homem (KAPLAN,1985). A raiva paralítica bovina tem grande importância econômica e o reservatório responsável é o morcego hematófago ou vampiro (KING, 1998). Os morcegos vampiros encontram-se na América Central e na América do Sul, existindo três espécies: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diemus youngi*. A primeira citada é a mais prevalente das espécies e a mais freqüentemente infectada pelo vírus da raiva (BERAN, 1994). Além dos morcegos hematófagos, em 2002, foram notificados casos de raiva nas seguintes espécies silvestres: guaxinins, mangustos, morcegos não-hematófagos, primatas, cangambás e raposas (OPAS, 2002). No Caribe, os mangustos foram importados da Ásia durante o século XIX com o objetivo de controlar cobras e roedores em plantações de cana-de-açúcar, mas hoje são importantes reservatórios da raiva (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

No Brasil, tem-se observado um aumento na incidência de casos de raiva em animais silvestres. No ano de 1999, registrou-se 37 casos em silvestres, sendo 04 em morcegos hematófagos, 06 em não-hematófagos, 15 em raposas, 03 em cangambás, 01 em macaco e 08 em espécies não identificadas (OPAS, 1999). No ano de 2002, o número de casos elevou-se para 89, sendo 12 morcegos hematófagos, 2 não-hematófagos e 55 não identificados, 5 cangambás, 13 raposas, 2 animais de outras espécies (OPAS, 2002). Em 2003, somente em morcegos, foram registrados 113 casos (OPAS, 2003).

A maior parte dos relatos existentes na literatura sobre a raiva em silvestres, restringe-se aos morcegos, sendo a espécie mais comumente relatada como positiva, o *Desmodus rotundus*. Dentre os vários relatos, destacam-se o de Nilson e Nagata que em 1975 descreveram o isolamento do vírus rábico em um exemplar encontrado caído e paralítico em uma residência em Barueri, São Paulo. Também, no município de Rio Preto, Minas Gerais, foram capturados 59 morcegos desta mesma espécie, oriundos de uma mesma colônia localizada em uma gruta natural, isolando-se o vírus de 32 animais (PICCININI et al., 1996).

Os morcegos insetívoros, por sua vez, apresentam ampla distribuição mundial, tendo sido relatados vários casos de isolamento do vírus rábico nestas espécies, inclusive no Brasil. A preocupação com os insetívoros é bastante relevante já que esses animais parecem ser cada vez mais freqüentes em áreas urbanas (ALMEIDA et al., 1994). Em 1975, descreveu-se um caso de isolamento em um morcego insetívoro *Molossus obscurus*, capturado em condição de semi-paralisia em Campinas, São Paulo (RODRIGUES et al., 1975). Em 1988 e 1990, foram diagnosticados positivos dois morcegos da espécie *Nyctinomops macrotis*, ambos de

bairros residenciais do município de São Paulo (ALMEIDA et al., 1994). Quase neste mesmo período (1988 - 1991), no Estado de São Paulo, 4 morcegos capturados em áreas residenciais pertencentes às espécies *Molossus molossus*, *Nyctinomops laticuadatus* e *N. macrotis*, foram positivos para a raiva (UIEDA; HARMANI; SILVA,1995). Em 1994, encontrou-se um morcego insetívoro *Myotis nygricans* em área peri-urbana no município de Ribeirão Pires, São Paulo, do qual se isolou o vírus rábico (MARTORELLI et al., 1995). No ano de 1995, diagnosticou-se também positivo, um morcego da espécie *Lasyurus borealis* em área residencial no município de Jundiaí, São Paulo (MARTORELLI et al., 1996) e em 1997, um exemplar de *Nyctinomops macrotis*, no município de Diadema, São Paulo (PASSOS et al., 1998). Na região noroeste do Estado de São Paulo, nos municípios de Araçatuba, Penápolis e São José do Rio Preto, foram registrados 4 casos de raiva em *Molossus ater* capturados em áreas urbanas (QUEIROZ DA SILVA et al., 1999).

A raiva ocorre também em morcegos frugívoros, como por exemplo o *Artibeus lituratus*, que foi a espécie com maior número de exemplares positivos na região Noroeste do Estado de São Paulo (CUNHA et al., 2001; QUEIROZ DA SILVA et al., 2001).

Outras espécies silvestres, além do morcego, tem sido diagnosticadas como positivas no Brasil. Segundo Corrêa e Passos (2001), durante o período de 1965 a 1974, a raiva foi diagnosticada no estado do Rio de Janeiro em 07 sagüis, 05 macacos, 04 cervos, 02 ratos e 01 esquilo mantidos em cativeiro ou criados como animais de estimação. Cita-se também o relato da ocorrência de 06 sagüis de vida livre, 08 macacos, 01 jaguatirica, 01 raposinha (*Cedocyon thous*), 01 gato-do- mato (*Leopardus tigrinus*) e 01 cervo em São Paulo, no período de 1971 a 1978. Ainda, em 1979 a 1982 ocorreram casos de raiva em 15 macacos, 01 guaxinim (*Procyon*

carnivorus), 01 capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), 01 onça pintada (*Panthera onca*), 07 raposinhas (*Cerdocyon thous*), 01 quati (*Nasua nasua*), 01 cervo (*Mazama americana*) e 01 lontra (*Lontra longicaudis*)[4].

No município de Matão, Estado de São Paulo, capturou-se em uma área selvática , uma cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) que veio à óbito após 48 horas. Após o resultado positivo, a variante do vírus rábico identificada nesta amostra foi comparada com outras isoladas no Brasil e mostrou-se antigenicamente homóloga a uma variante de morcego hematófago, a qual já havia sido encontrada anteriormente no Brasil, em um morcego e um gato (FAVORETTO et al., 2002). Este trabalho foi o primeiro a isolar esta variante de um animal silvestre terrestre em nosso país e sugere que no ambiente silvestre há uma interação entre as espécies, permitindo a circulação do vírus rábico entre mamíferos aéreos e terrestres.

Gomes (2004), analisou animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, localizado no Nordeste do Brasil e de um total de 581 amostras, 50 (8,6%) foram positivas à IFD, sendo que destas, 47 (8,09%) se confirmaram à ICC. Isolou-se vírus de raposas (*Dusicyon vetulus*), morcegos não hematófagos, bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e cães. Realizou-se tipificação antigência e genética das amostras concluindo-se que a epidemiologia da raiva nesta região é complexa, visto que existem variantes distintas mantidas por cães domésticos, raposas, morcegos insetívoros e morcegos hematófagos.

No município de São Paulo, no período de 1994 a1997, realizou-se um estudo da prevalência de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva em soro de animais silvestres de diferentes espécies. Um total de 547 soros foram examinados, sendo que marsupiais representaram 45% das amostras, primatas não-humanos

[4] No texto original não constavam todos os nomes científicos dos animais citados.

37%, carnívoros 6%, roedores 6%, cervos 3% e edentados 2%. Todas as espécimes foram entregues ao Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, devido à invasão domiciliar, histórico de agressão a humanos ou após captura por autoridades policiais por conta do comércio ilegal. A prevalência de anticorpos neutralizantes foi maior nos primatas capturados em residências, sugerindo vacinação. A maior prevalência nos marsupiais ocorreu entre os nativos, sugerindo uma infecção natural. O pequeno número de edentados, roedores, cervos e carnívoros neste estudo não permitiu nenhuma inferência sobre os resultados, porém, segundo os autores, sugeriu-se que o vírus rábico esteja circulando entre estas espécies (ALMEIDA et al., 2001).

Entre o período de 1981 e 1998, 28 casos de raiva humana transmitidos por animais silvestres foram reportados no Brasil, sendo que 2,5% dos casos foram transmitidos por primatas, guaxinins e raposas (MORAIS et al., 2000).

O Estado do Ceará apresenta o maior percentual de casos de raiva humana originados de silvestres. A principal espécie transmissora é o sagüi (*Callithrix jacchus*), muito bem adaptado à vegetação da costa. Em 1998, ocorreram dois casos de raiva em humanos causados por esta espécie (MORAIS et al., 2000). A variante do vírus rábico isolada destes animais mostrou-se diferente de todas as variantes já identificadas anteriormente (FAVORETTO et al., 2002). Além dos sagüis, foram isolados casos de raiva em raposas na região da Serra de Ibiapaba (CORRÊA; PASSOS, 2001).

Apesar do morcego hematófago ser um reservatório para a raiva na América do Sul, poucos casos de raiva humana transmitida por morcegos tem sido reportados nesta região. No ano de 2004, entre os meses de março e maio, o laboratório de raiva do Instituto Evandro Chagas confirmou a ocorrência de duas

epidemias de raiva humana causada por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) no estado do Pará, sendo uma na cidade de Portel, ilha de Marajó, com 16 mortes, e outra na cidade de Viseu, localizada na região nordeste do estado, com 6 mortes (TRAVASSOS DA ROSA, 2004). Devido a estas epidemias, o morcego, em 2004, foi o principal transmissor da raiva para humanos, como mencionado anteriormente (OPAS, 2004).

O modo mais comum de transmissão é a mordedura (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002), tendo como veículo a saliva. Como a infecção por um lyssavírus geralmente leva o hospedeiro à morte, a propagação a um outro suscetível ocorre efetivamente durante um curto período de excreção do vírus (3 a 10 dias) durante o estágio final da doença. A excreção do vírus por várias semanas antes do aparecimento de sinais clínicos não é usual (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). Segundo Gardner e King (1991), o vírus garante sua própria sobrevivência causando aflição no hospedeiro quando este apresenta-se próximo da morte, para que o mesmo encontre outro hospedeiro e vítima.

Existem relatos na literatura sobre transmissões por via aerógena. Em uma caverna no Texas (Frio Cave), habitada por milhões de morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis*, dois cientistas foram infectados pelo vírus da raiva, sem receberem mordidas. Nesta mesma caverna coiotes e lobos foram colocados em jaulas a prova de morcegos ou artrópodes, comprovando-se a transmissão por via aerógena, provavelmente em conseqüência de aerossóis formados pela saliva e urina daqueles morcegos insetívoros. Outro caso ocorreu em um laboratório onde a vítima preparava vacinas concentradas (ACHA; SZYFRES, 2003).

A transmissão entre humanos não tem sido relatada atualmente, exceto os casos de transplante de córnea ocorridos nos Estados Unidos e na França (ACHA; SZYFRES, 2003; KING, 1998). Recentemente, nos Estados Unidos, o diagnóstico de raiva foi confirmado em três pacientes que haviam recebido os órgãos (fígado e rins) de um doador com raiva (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2004). Em todos os casos não houve suspeita da doença no doador.

De acordo com Acha e Szyfres (2003), experimentalmente têm sido possível a infecção de animais por via digestiva e se comprovou a infecção por canibalismo de ratas que se alimentaram de lactentes inoculados com o vírus. Shirakawa (2003) realizou um estudo experimental com gatos (*Felis catus*), alimentando-os oralmente com cérebros de camundongos previamente inoculados. Após o período de observação, os animais foram submetidos à eutanásia, coletando-se o cérebro, coração, pulmões e rins. Nas provas de IFD e inoculação em camundongos, todos os animais foram negativos. À prova de RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase – trancriptase reversa), houve positividade principalmente nos rins, seguido de pulmões, coração e cérebro. Concluiu-se que os gatos são resistentes à raiva pela via oral e que, apesar de não se saber o real significado dos achados na prova de RT-PCR, talvez os animais tenham sido sacrificados antes da manifestação do pródromo da doença.

Tradicionalmente, o ciclo de transmissão da raiva pode ser dividido em dois: urbano e silvestre (ACHA; SZYFRES, 2003). Entretanto, segundo Rupprecht, Stöhr e Meredith (2001), essa descrição muito simplificada do ciclo silvestre e urbano não permite comunicar a real dinâmica da doença.

2.4 PATOGENIA

Como mencionado anteriormente, o principal modo de transmissão é a mordedura, na qual o vírus presente na saliva do animal, é inoculado, através da pele, no músculo e em tecidos subcutâneos (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004). Existe uma grande variação no período de incubação da doença tanto em humanos quanto em animais, geralmente variando entre 20 a 90 dias (JACKSON, 2003a), existindo relatos de períodos maiores que um ano. Smith et al. (1991), por exemplo, investigaram três pacientes, imigrantes nos Estados Unidos, que morreram de raiva sem histórico de exposição a qualquer fonte de infecção. Concluiu-se que a infecção não poderia ter ocorrido naquele país, mas sim nos países de origem de cada um dos imigrantes, sugerindo então que tratavam-se longos períodos de incubação (11 meses, 4 anos e 6 anos). Esta variabilidade pode ser justificada pela proximidade da mordida em relação ao SNC, variação da inervação do local, pela severidade da lesão, pela quantidade de vírus inoculado e por fatores do próprio hospedeiro (JACKSON, 2003b).

Charlton et al. (1997), realizaram uma pesquisa utilizando gambás (*Mephitis mephitis*), que foram inoculados com vírus rábico isolado de glândulas salivares de um outro um gambá proveniente do Canadá, por via intramuscular em uma dosagem baixa. Após dois meses da inoculação, os animais foram sacrificados e os tecidos coletados foram examinados pelo método de RT-PCR e pela imunohistoquímica. O método de RT-PCR mostrou que o RNA genômico viral estava frequentemente presente nos músculos onde ocorreu a inoculação, mas não foi encontrado nem na gânglio espinal nem na medula espinal, que seriam tecidos utilizados na rota do vírus. Com relação à imunohistoquímica, mostraram evidência de uma infecção das

fibras musculares extrafusais e fibrócitos ocasionais no local da inoculação. Este estudo demonstra o retardamento do movimento do vírus que parece ocorrer no local da inoculação nos períodos longos de incubação e embora ainda não esteja esclarecida, a infecção das fibras musculares pode ser um passo importante na patogenia da raiva.

Em um estudo realizado por Shankar, Dietzschold e Koprowski (1991), demonstrou-se também, sob condições experimentais, a possibilidade do vírus entrar no sistema nervoso periférico sem que ocorra uma replicação em células extraneurais do local da inoculação. Segundo Jackson (2003a), este mecanismo deve raramente ocorrer em condições naturais.

O vírus pode invadir nervos periféricos provavelmente ligando-se a receptores da acetilcholina nicotínica da junção neuromuscular (LENTZ et al., 1981). Lewis, Fu e Lentz (2000) pesquisaram a entrada do vírus nos neurônios, concluindo que a junção neuromuscular é o principal local de entrada. Existem ainda dois receptores na membrana neuronal em que o vírus pode se ligar: a molécula de adesão da célula neuronal (THOULOUZE et al., 1998) e o receptor de neurotropina p75 (TUFFEREAU et al., 1998). Além disso, os receptores de N-metil-D-aspartato subtipo R1 e do GABA, que são neurotransmissores do sistema nervoso central, são também possíveis receptores do vírus da raiva (GOSZTONYI; LUDWIG, 2001).

O vírus, após ganhar o acesso aos nervos periféricos, caminha na direção retrógrada dentro do axoplasma (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004) e devido a este movimento ser estritamente retrógrado, o vírus têm sido utilizado em alguns experimentos para traçar o caminho dos neurônios (TANG et al., 1999). Quando o atinge o SNC, uma replicação intensa acontece nas membranas dentro dos neurônios e a transmissão ocorre de célula para célula atravessando as junções

sinápticas (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004). A glicoproteína, presente na superfície externa do envelope viral, tem uma participação muito importante na dispersão trans-sináptica do vírus entre os neurônios (ETESSAMI et al., 2000).

Os sintomas de encefalite e mesmo a morte podem ocorrer com poucas alterações histopatológicas, suportando a idéia que a difunção neuronal, mais do que a morte celular, deve desempenhar um importante papel na produção da doença (JACKSON, 2003a ; WARRELL, M.; WARRELL D., 2004). A dispersão centrífuga do vírus, do SNC aos nervos somáticos e autonômicos, leva ao depósito do vírus em muitos tecidos, incluíndo músculos esqueléticos e cardíacos, glândulas adrenais, pulmões, retina, córnea, ovário, útero, fígado, baço, pâncreas e nervos ao redor de folículos caplilares e em morcegos, na gordura marrom interescapular (SCHNEIDER, 1991; WARRELL, M.; WARREL D., 2004).

A raiva é uma doença geralmente considerada fatal, porém reconhece-se a possibilidade de animais eventualmente se recuperarem. A questão é se existem animais que sejam “portadores sãos”: eliminam o vírus pela saliva mas permanecem saudáveis. Em um estudo recente, hienas (*Crocuta crocuta*) foram monitoradas durante 9 a 13 anos e com base nos títulos de anticorpos neutralizantes, 37% dos animais estudados foram soropositivos e avaliações posteriores revelaram que alguns se tornaram soronegativos. Destes os soropositivos, embora não tenha sido isolado vírus da saliva de nenhum animal, foi possível demonstrar a presença de RNA viral na saliva pelo método de RT-PCR em 45,5%. Contudo, durante este período de estudo, sinais clínicos da raiva nunca foram observados (EAST et al., 2001). Estes achados, segundo Jackson (2003a), indicam uma exceção a um antigo dogma e no futuro talvez possamos aprender que sob algumas circunstâncias, a situação seja semelhante em morcegos e outras espécies.

2.5 DIAGNÓSTICO

Sempre que possível, uma suspeita clínica de raiva deve ser confirmada por testes laboratoriais (KING, 1998). Os resultados laboratoriais influenciam tanto na decisão de se proceder ou não com um tratamento, como na decisão de se instituir medidas para o controle de uma epizootia em uma comunidade. Além disso, permitem assegurar a eficácia e a segurança de produtos biológicos usados nos tratamentos de prevenção em humanos e animais (MESLIN; KAPLAN, 1996).

O teste de imunofluorescência direta, descrita por Goldwasser e Kissling (1958) e modificado por Dean, Albelseth e Atanasiu (1996), ainda permanece como o padrão ouro para o diagnóstico de raiva e consiste no exame microscópico, sob luz ultravioleta, de impressões de tecidos em lâminas após tratamento com de anticorpos anti-rábicos conjugados com isotiocianato de fluoresceína. É uma prova rápida, muito sensível e específica. Outra vantagem é que pode se aplicar em pacientes ainda com vida, utilizando-se de impressões das córneas, rapados da mucosa lingual, biópsia de pele, incluindo folículos capilares da nuca e do local da ferida. No diagnóstico *post mortem*, o principal tecido analisado é o cérebro, sendo que quando o resultado desta prova é positiva, confirma-se o diagnóstico, porém, quando negativa, não se pode excluir a possibilidade da infecção (ACHA; SZYFRES, 2003; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002). Recomenda-se que a IFD seja realizada paralelamente com a prova de inoculação intracerebral em camundongos, método descrito por Koprowisk (1996) pelo qual o vírus é isolado e os sintomas da doença são reproduzidos nestes animais. Por outro lado, alguns laboratórios utilizam-se do cultivo de células, ao invés de animais, para se fazer o isolamento (BERAN, 1994). Os métodos de isolamento podem ser úteis também no

diagnóstico *ante mortem* em humanos, utilizando-se saliva ou *swabs* de garganta e olhos (KING, 1998; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

A pesquisa microscópica dos corpúsculos de Negri por exame histopatológico com coloração direta, como no método de Sellers, é um procedimento simples, rápido e econômico, porém é um método menos sensível (ACHA; SZYFRES, 2003). A freqüência da ocorrência destes corpúsculos, tamanho e formato podem ser influenciados pela espécie do hospedeiro, pela cepa do vírus e pela fase clínica da doença (KING, 1988). Este exame, quando utilizado isoladamente, pode produzir resultados falsos-negativos, pois nem todos os casos apresentam desenvolvimento de inclusões, ou resultados falsos-positivos devido a corpúsculos de inclusões não específicos (NIETFELD et al., 1989).

Os anticorpos monoclonais contra o vírus rábico foram produzidos pela primeira vez por Wiktor e Koprowisk (1978) e atuam na glicoproteína ou no nucleocapsídeo viral. Com esta técnica foi possível caracterizar e classificar o vírus rábico e os vírus relacionados, além de permitir a diferenciação de vírus isolados de hospedeiros terrestres e de morcegos nos Estado Unidos, na Europa, África, Ásia e na América Latina. Embora ela seja usada principalmente em investigações epidemiológicas, tem se mostrado útil no diagnóstico em certas circunstâncias, como nos casos de raiva humana “importada” e de casos sem histórico de exposição (MESLIN; KAPLAN, 1996; SMITH et al., 1991)

As provas sorológicas são aplicadas para se conhecer a resposta imunológica de pessoas ou animais vacinados, as evidências de infecções não fatais e também em experimentos que envolvem a patogenia. Utilizam-se freqüentemente os ensaios enzimáticos (ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (BERAN, 1994) e os testes de soro-neutralização em cultivos celulares como o teste de

inibição rápida de focos fluorescentes (RFFIT – “Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test”) (SMITH; PAMELA; GEORGE, 1973) e o teste fluorescente de vírus neutralização (FAVN – “Fluorescent Antibody Virus Neutralisation Test”)(CLIQUET; AUBERT; SAGNÈ, 1998).

As técnicas moleculares modernas, como o RT-PCR, podem detectar o ácido nucléico dos lyssavírus. A alta sensibilidade da técnica aumenta também o risco de falsos-positivos devido a contaminação laboratorial ou erro técnico, e de falsos-negativos, caso os primers não possuam homologia suficiente para todas as variantes presentes na região. Além do mais, ela é mais demorada quando comparada a outros testes, o custo do equipamento é alto e há necessidade de manutenção da técnica. Recomenda-se, portanto, que não se utilize estas técnicas para diagnóstico de rotina, podendo ser usado como um teste confirmatório (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002; WHO, 1995).

2.6 PREVENÇÃO E CONTROLE

A prevenção da raiva humana é um grande desafio na saúde pública em muitos países do mundo (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001) e devido a sua fatalidade, a profilaxia pós-exposição é extremamente importante (WHO, 1992). Nos países menos desenvolvidos, onde a maior parte dos casos de raiva humana acontece devido à raiva canina, as mortes ocorrem principalmente pela falta de acesso a agentes biológicos adequados e necessários para um tratamento profilático conveniente. Em países mais desenvolvidos, ainda que muitos já tenham controlado a raiva em animais domésticos, a doença continua sendo um risco para a população. Os imunobilógicos são acessíveis e as poucas mortes humanas

ocorrem principalmente pela ignorância ou pelo não reconhecimento da exposição, sendo de grande importância tanto a educação do público quanto dos profissionais da área de saúde (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH,2001).

Em qualquer tipo de lesão conseqüente de uma exposição, é importante que se faça uma lavagem imediata e vigorosa com água e sabão no local da ferida, associando-se o álcool iodado, por exemplo, com o objetivo de diminuir a carga viral local (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004; WHO, 1992). Deve-se evitar a sutura, mas se for necessária, recomenda-se a infiltração de imunoglobulina ao redor da ferida, além da administração da vacina anti-rábica (WHO, 1992). O sucesso do tratamento pós-exposição depende ainda da resposta imune do indivíduo e da suscetibilidade do vírus à imunidade induzida pela vacina (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004).

O tratamento pré-exposição é uma medida apropriada para grupos de alto risco de contato com o vírus rábico, como biólogos, veterinários, pesquisadores, técnicos em laboratórios de diagnóstico, produção de vacina, espeleólogos, entre outros (WHO, 1992).

Alguns países declarados livres da raiva, mantém um controle na importação de animais, incluindo a quarentena, que tem como objetivo prevenir a introdução da doença, resguardando um animal por um período de tempo suficiente para que, caso esteja incubando o vírus, venha a desenvolver sinais clínicos evidentes (KING, 1998).

Devido à diversidade de reservatórios para este vírus, que acomete tanto animais domésticos quanto silvestres, o controle da raiva animal também é um grande desafio (ZHEN FANG FU, 1997) e a sua erradicação, questionável

(MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001). Com relação à raiva urbana, o principal reservatório é o cão e o controle consiste basicamente em vacinação anual dos animais de estimação, medidas de controle de animais errantes e eliminação de cães e gatos que tenham sido agredidos por animais raivosos (ACHA; SZYFRES, 2003). Já em relação à raiva silvestre, no passado, houveram várias tentativas de controle, incluindo destruição do habitat, caçadas com armas, armadilhas, distribuição de veneno, entre outros métodos. Porém, todos este métodos levantaram sérias discussões econômicas, éticas, ecológicas e questões sobre a eficácia dos mesmos. Nos últimos anos, tem-se administrado vacinas orais em iscas e até o momento, a Europa e a América do Norte mostraram resultados positivos no controle da raiva em carnívoros terrestres de vida livre, como coiotes e o guaxinins (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

O controle da raiva transmitida por morcegos hematófagos é de especial interesse na América Latina e na América Central, onde estas espécies ocorrem. Deve-se ressaltar que em algumas áreas, além de se adotar medidas de redução da população de morcegos hematófagos, os herbívoros devem ser compulsoriamente vacinados. O controle populacional dos hematófagos baseia-se principalmente na utilização de uma pasta contendo anticoagulante na sua formulação. Passa-se a pasta no dorso dos quirópteros, cujo hábito de se lamberem, tem como conseqüência muitas mortes na colônia. Recomenda-se que se retorne ao abrigo para a retirada dos morcegos mortos pois existe a possibilidade de que estes constituam um perigo para animais de outras espécies, caso venham a ingeri-los (ACHA; SZYFRES, 2003; KING, 1998). Os morcegos não-hematófagos, dos quais algumas espécies apresentam-se em perigo de extinção, possuem importantes funções de polinização, dispersão de sementes e predação de insetos,

principalmente em regiões tropicais. Deve-se evitar a presença destes animais nas habitações de humanos (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descrições da área de estudo, dos animais utilizados, dos métodos de captura, dos procedimentos para coleta dos encéfalos e do diagnóstico laboratorial que baseou-se em dois métodos: o teste de imunofluorescência direta e o teste de inculação intracerebral em camundongos.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado em parceria com um grupo de pesquisadores pertencentes a uma organização não-governamental (ONG), Sociedade Fritz Müller de Ciências Naturais, Curitiba, Paraná, contratados pela Juris Ambientis Consultores Ltda., para realizar um "Programa básico ambiental de monitoramento de fauna", cujo objetivo era pesquisar o impacto ambiental, causado por uma obra de aterramento de um vale para construção de uma fábrica, em uma reserva natural particular na propriedade pertencente à Companhia Brasileira de Equipamentos, localizado na Rodovia João Ferreira dos Santos Filho, no município de Ribeirão Grande, São Paulo. A parceria se deu especificamente com o grupo responsável pela pesquisa de mamíferos[1], coordenado pela bióloga Juliana Quadros. Na figura 1, observa-se a reserva natural particular de 150,7 ha, constituída por mata secundária, e à frente, a área de aterro. A reserva é cortada por três córregos (Fernandes, Barracão e Água Limpa), os quais foram utilizados como

[1] Neste "Programa básico ambiental de monitoramento de fauna", além do grupo responsável pela pesquisa em mamíferos, existem os grupos de répteis, anfíbios e aves.

referência para a colocação das armadilhas, desaguando no Rio das Almas, agora, por meio de uma canaleta artificial.

Ribeirão Grande é um município da região de Itapetininga que possui uma população de 7.828 habitantes e uma área total de 332 km² e localiza-se em uma região considerada endêmica para a raiva bovina (CEDESA; CDA, 2000). Segundo dados da Coordenação do Programa de Raiva do Estado de São Paulo fornecidos pelo Instituto Pasteur, Ribeirão Grande e municípios da região indicados na figura 2 (Apiaí, Buri, Capão Bonito, Eldorado, Guarapiara, Iporanga, Itapetininga, Itapeva, Ribeirão Branco, São Miguel Arcanjo, Sete Barras, Taquarivaí), tiveram vários casos de raiva notificados principalmente nos anos de 1994 e 1995 e especialmente em bovinos (Quadro 1). Em 1994, de 41 casos positivos para a raiva bovina, 34 ocorreram em Capão Bonito, município vizinho de Ribeirão Grande, onde apenas um caso foi registrado. Foi também em Capão Bonito que, neste mesmo ano, isolou-se o vírus rábico de um quiróptero. Em 1995, somente neste município, ocorreram 22 casos e em Eldorado, também adjacente a Ribeirão Grande, 9 casos. Nos anos seguintes a raiva foi controlada e o número de casos positivos sofreu uma redução significante (Quadro 1), sendo que em 1998 e 1999, não houve notificação em espécie alguma. No ano de 2000 houve um recrudecimento do número de casos, sendo que em 2003 mais espécies foram diagnosticadas positivas além da bovina, incluindo um quiróptero no município de Apiaí e um eqüino, em Itapeva. Durante estes 10 anos considerados (1994-2003), não houve notificação nas espécies canina e felina nos municípios da região.

Ano	ESPÉCIE ANIMAL								
	Bovinos			Quirópteros			Outras		
	P [2]	T[3]	%	P	T	%	P	T	%
1994	41	70	58,6	1	11	9,1	5	18	27,8
1995	39	65	60,0	0	2	0,0	6	16	37,5
1996	8	26	30,8	0	1	0,0	2	8	25,0
1997	1	7	14,3	0	1	0,0	0	1	0,0
1998	0	5	0,0	0	5	0,0	0	1	0,0
1999	0	7	0,0	0	19	0,0	0	3	0,0
2000	1	8	12,5	0	15	0,0	0	4	0,0
2001	4	17	23,5	0	10	0,0	0	3	0,0
2002	7	16	43,8	0	40	0,0	0	1	0,0
2003	2	11	18,2	1	4	25	1	7	14,3
Total	103	232	44,4	2	108	1,9	14	62	22,6

[1]Municípios considerados: Ribeirão Grande, Apiaí, Buri, Capão Bonito, Eldorado, Guapiara, Iporanga, Itapetininga, Itapeva, Ribeirão Branco, São Miguel Arcanjo, Sete Barras, Taquarivaí
[2]P: amostras positivas
[3]T: total de amostras analisadas.
Fonte: Instituto Pasteur, São Paulo, 2004. Dados sujeitos a alteração posteriori.

Quadro 1 – Diagnóstico de raiva segundo o ano e a espécie animal avaliada durante o período de 1994 a 2003, em diferentes municípios[1] próximos à Ribeirão Grande-SP

3.2 OS ANIMAIS

Os animais escolhidos para o estudo pertenciam às ordens Chiroptera, Rodentia e Marsupialia, sendo de diferentes idades e sexos. Os principais motivos que levaram os pesquisadores a optarem por estes espécimes, em particular, foram a maior facilidade de captura e o custo, visto que este monitoramento durará sete anos. Na primeira fase do projeto realizado na CBE, os animais capturados deveriam ser eutanasiados para posterior procedimento de identificação com o objetivo de se obter o conhecimento das espécies que ali habitam (número do processo no IBAMA 02001.002555/02-38). Na fase seguinte do projeto, a maioria dos animais recebeu uma marcação com anilhas e brincos metálicos numerados, sendo posteriormente soltos.

3.3 CAPTURA

Para a captura de marsupiais e roedores, foram montadas armadilhas no solo e sobre as árvores (Figuras 3 e 4), utilizando-se mortadela, bacon, farinha de milho ou de fubá e banana como iscas, sendo espalhadas pela mata usando os córregos como referencial. As armadilhas de queda com baldes de 20 litros enterrados no chão ("pitfall" – Figura 5), utilizadas especialmente pelas equipes da herpetofauna e da anurofauna, também serviram para a captura de alguns pequenos mamíferos. Todas as armadilhas eram revisadas matinalmente.

Os pesquisadores observaram que após a construção da canaleta artificial, devido ao aterramento, muitos animais caíam e não conseguiam voltar à terra, vindo à obito por afogamento. Desta forma, construíram obstáculos com grades metálicas

(Figura 6) para resgatarem os animais e assim, obterem uma estimativa dos animais que morrem desta forma. Alguns mamíferos utilizados em nosso estudo, foram coletados neste local.

Para a captura de morcegos foram utilizadas redes de neblina que eram armadas em corredores de estrada, sendo mantidas abertas durante 3 horas após o crepúsculo.

Após a captura, os animais eram levados a um laboratório improvisado, onde eram eutanasiados com éter sulfúrico e em seguida, submetidos à sexagem, biometria, coleta de fezes e conteúdo gastrointestinal e coleta de ectoparasitos. Posteriormente, eram devidamente identificados e levados ao freezer (-20%) para congelamento.

3.4 COLETA DO ENCÉFALO

Todos os animais foram transportados congelados e levados ao Museu de História Natural Capão de Imbuia, localizado no município de Curitiba, Paraná, onde realizou-se a coleta dos encéfalos durante o processo de taxidermização. O encéfalo de cada animal foi retirado cuidadosamente com uma pipeta plástica descartável do tipo Pasteur através do forame magno, preservando-se a integridade do osso craniano (Figuras 7 e 8). Esse procedimento foi de extrema importância uma vez que as medidas cranianas são úteis para a identificação da espécie de alguns animais.

As pipetas eram identificadas, embrulhadas em papel alumínio também identificado, mantidas em freezer (-20°C) e transportadas para o laboratório de diagnóstico de raiva da UNESP de Araçatuba, em isopor com gelo seco para evitar o

descongelamento das amostras. No laboratório foram conservadas em freezer comum até a realização do diagnóstico. O período de captura e envio das amostras do presente estudo foi de outubro de 2002 a outubro de 2004, tendo sido submetidos ao diagnóstico de raiva um total de 104 amostras.

3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Utilizaram-se dois testes para realizar o diagnóstico laboratorial: o teste de imunofluorescência direta e o teste de inoculação intracerebral em camundongos.

3.5.1 Imunofluorescência direta

Utilizou-se a técnica padrão para detecção do antígeno rábico padronizada por Dean et al. (1996), com conjugado anti-nucleocapsídeo Chemicom® (Rabies DFA Reagent – USA), na diluição de 1:30. Lâminas com impressões dos cérebros foram preparadas e fixadas em acetona por, no mínimo, 15 minutos. Para a coloração com o conjugado, incubavam-se as lâminas por 30 minutos em câmara úmida, em estufa a 37°C , lavando-as posteriormente por imersão em solução salina fosfatada (PBS) durante 10 minutos e, em seguida, três vezes em água destilada. Após secagem ao ambiente, as lâminas eram montadas com glicerina tamponada e lamínula, e observadas em microscópio de imunofluorescência Olympus® com sistema de epi-iluminação.

3.5.2 Inoculação intracerebral em camundongos

A prova biológica preconizada por Koprowski (1996) foi empregada, utilizando-se os fragmentos de encéfalos coletados em pipetas plásticas do tipo Pasteur, triturados em gral estéril e suspendidos aproximadamente a 20%, em meio de cultura contendo água destilada, soro normal de eqüino e antibióticos. Inoculou-se 0,03 ml de cada suspensão, por via intra-cerebral, em camundongos albinos suíços, separados em grupos de 8, entre 21 e 25 dias de vida e peso entre 11 a 15g, provenientes do Biotério Central da UNESP de Botucatu e do Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba. Os camundongos foram acondicionados em caixas plásticas de 22x30cm, com tampa metálica, alimentados com ração e água e mantidos em ambiente com ar condicionado à temperatura de 23ºC. Durante 30 dias foram feitas observações diárias dos animais, para a verificação de sintomas típicos da raiva. Os cérebros dos camundongos que vinham à óbito durante o período de observação, eram submetidos novamente ao teste de IFD para confirmação de diagnóstico. Os animais que sobreviveram, após os 30 dias, foram sacrificados com éter etílico.

Figura 1 - Área da propriedade pertencente à Companhia Brasileira de Equipamentos, em Ribeirão Grande, SP. Ao fundo, mata onde foram realizadas as capturas e à frente, área de aterramento

Figura 2 – Mapa do Estado de São Paulo, destacando Ribeirão Grande e municípios considerados

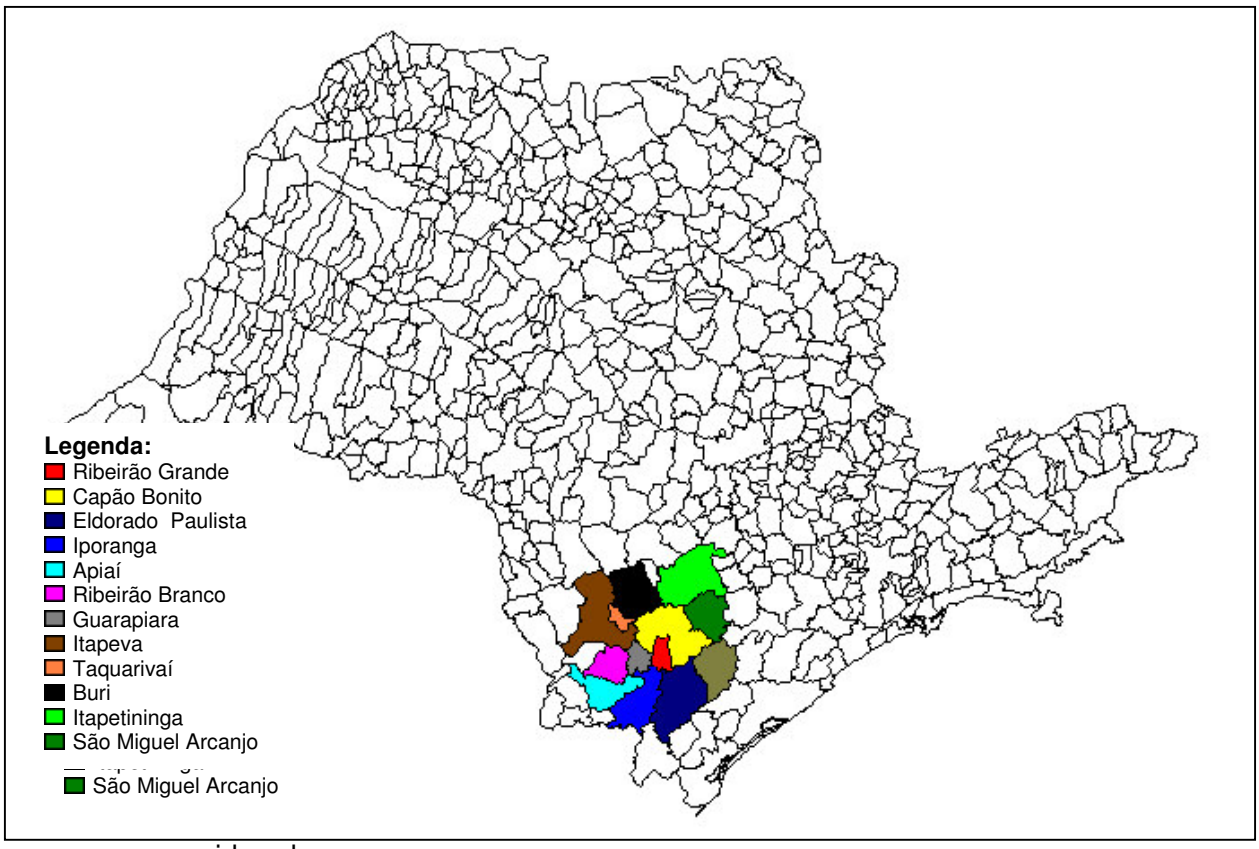

Figura 3 - Armadilha metálica do tipo Sherman montada em solo[2]

Figura 4 - Armadilha metálica de grade montada sobre o galho de uma árvore

[2]As figuras 3 a 6 foram gentilmente cedidas por Juliana Quadros e sua equipe.

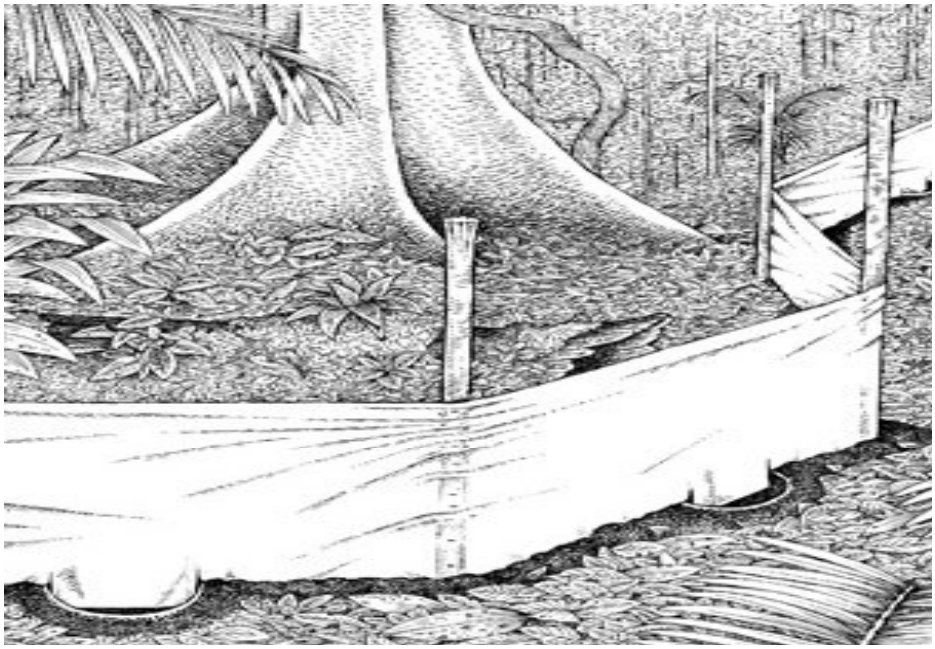

Figura 5 - Armadilha-de-queda com baldes enterrados (“pitfall”)

Figura 6 - Canaleta artificial com obstáculo de tela metálica

Figura 7 - Pipeta plática tipo Pasteur introduzida através do forame magno, preservando-se a integridade craniana

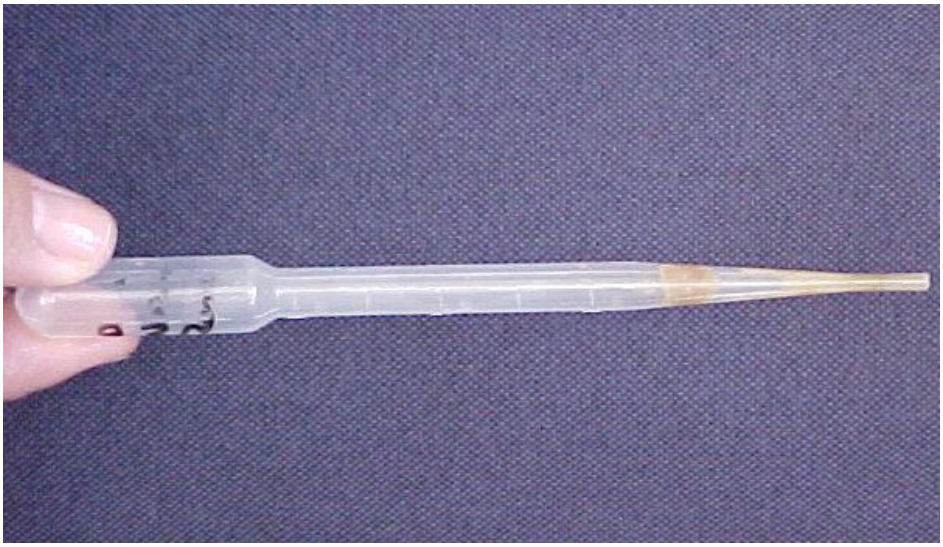

Figura 8 - Pipeta plática do tipo Pasteur com amostra de cérebro após a aspiração

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período compreendido entre outubro de 2002 a outubro de 2004, dos animais capturados na reserva particular em Ribeirão Grande, 104 amostras foram enviadas para o laboratório de diagnóstico de raiva da UNESP de Araçatuba (Quadro 2). Destas, 49 (47,1%) pertenciam à ordem Chiroptera, 48 (46,2%) pertenciam à Rodentia e sete (6,7%) à Marsupialia, abrangendo diferentes gêneros e espécies, idades e sexo, como demonstrado no quadro 2. Todas as amostras recebidas foram submetidas ao diagnóstico de raiva, pela imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos, sendo que nenhuma delas revelou-se positiva.

A amostragem utilizada neste estudo pode ser classificada como não-probabilística e por conveniência (THRUSFIELD, 1995). As principais razões de optarmos por este tipo de amostragem foram o curto espaço de tempo para a realização do estudo e a limitação de recursos. Ao se trabalhar com animais de vida livre, o cálculo do número de amostras se torna um grande desafio, principalmente pelo fato de, na maioria das vezes, não existirem informações sobre o número total de uma dada população e também pela dificuldade de se saber a real prevalência da doença no meio silvestre. Desta forma, utilizando-se da fórmula de cálculo de número de amostras necessárias para a estimação de uma prevalência (THRUSFIELD, 1995), considerando-se uma população infinita, um intervalo de confiança de 95%, considerando-se uma prevalência esperada de 1,8%[1] para morcegos, e uma precisão absoluta desejada de 1%, o total de amostras desta

[1] O valor da prevalência esperada foi baseada na porcentagem de positividade de morcegos obtida pelos dados da Coordenação do Programa de Raiva do Estado de São Paulo fornecidos pelo Instituto Pasteur, dividindo-se o número de animais com diagnóstico positivo pelo número total de amostras enviadas. Apesar de não ser uma prevalência real, extrapolamos os dados para se estimar o número de amostras, pois é praticamente impossível ter o conhecimento da população total, sem prévio estudo, quando se trata de animais silvestres de vida livre.

espécie somente, seria de 679 amostras (Apêndice), valor que está muito acima do total de amostras enviadas.

As amostras de morcegos capturados na reserva particular e enviados ao laboratório foram todas provenientes de espécies não-hematófagas, das famílias Phillostomidae e Vespertilionidae. O diagnóstico positivo para a raiva em morcegos não- hematófagos é freqüente no Brasil, como já citado na revisão de literatura (ALMEIDA et al., 1994; CUNHA et al., 2001; MARTORELLI et al., 1995; MARTORELLI et al., 1996; OPAS, 1999; OPAS, 2002; PASSOS et al., 1998; QUEIROZ DA SILVA et al., 1999; QUEIROZ DA SILVA et al., 2001; RODRIGUES et al., 1975; UIEDA; HARMANI; SILVA,1995). Apesar de não termos obtido resultado positivo, não é possível afirmar que o vírus não esteja circulando nestas espécies nesta reserva particular em questão, uma vez que foram detectados casos positivos de raiva em morcegos na região. Segundo os pesquisadores da Sociedade Fritz Müller de Ciências Naturais, observou-se a presença de *Desmodus rotundus,* porém, infelizmente estes conseguiram fugir da rede de neblina durante a captura.

O município de Ribeirão Grande localiza-se em uma região endêmica para a raiva em herbívoros, e de acordo com dos dados fornecidos pela Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo (Quadro 1), foram registrados no período de 1994 a 2003, no próprio município e em municípios da região, um total de 103 casos de raiva bovina, 09 casos em outras espécies (principalmente eqüinos) e dois casos em morcegos não identificados. Quando foram comparados os números de casos positivos em relação do total de amostras examinadas, observou-se que a porcentagem de positivos foi de 44,4%

Ordem	Família	Gênero e Espécie	Sexo			Idade			Total
			M[1]	F[2]	NI[3]	J[4]	A[5]	NI	
Chiroptera	Phyllostomidae	*Anoura geoffroyi*	0	2	0	0	2	0	2
		Artibeus fimbriatus	1	0	0	0	1	0	1
		Carollia perspicillata	2	0	0	0	2	0	2
		Glossophaga soricina	1	0	1	0	1	1	2
		Sturnira lilium	9	1	0	2	8	0	10
	Vespertilionidae	*Epitesicus* sp.	0	1	0	0	1	0	1
		Myotis rubber	3	6	0	0	9	0	9
		Myotis sp.	9	13	0	0	22	0	22
Marsupialia	Didelphidae	*Marmosops icanus*	0	2	0	0	2	0	2
		Monodelphis americana	1	2	0	1	2	0	3
		Monodelphis rubida	1	0	0	0	1	0	1
		Philander frenata	1	0	0	0	1	0	1
Rodentia	Muridae	*Akodon* sp.	5	3	1	1	8	0	9
		Juliomys pictipes	0	2	0	0	2	0	2
		Nectomys squamines	1	0	0	0	1	0	1
		Oligoryzomys sp.	1	1	0	0	2	0	2
		Oryzomys sp.	14	7	1	1	20	1	22
		Oxymycterus sp.	1	2	0	0	3	0	3
		Não Identificados[6]	4	3	2	2	5	2	9
Total			54	45	5	7	93	4	104

[1] M: macho
[2] F: fêmea
[3] NI: Não informado
[4] J: jovem
[5] A: adulto
[6] Animais identificados somente como sendo da subfamília Sigmodontinae.

Quadro 2 – Animais enviados aos laboratório de diagnóstico de Raiva da Unesp de Araçatuba segundo Ordem, Família, Gênero, Espécie, Sexo e Idade, 2002-2004

para os bovinos; 22,6% em outras espécies e 1,8% em morcegos. Os resultados observados em morcegos nesta região, foram semelhantes aos observados em outras regiões do Estado de São Paulo, como Botucatu (CÔRTES et al. , 1994), Araçatuba (QUEIROZ DA SILVA et al., 2001) e no Noroeste do Estado (CUNHA et al., 2001), mostrando que a taxa de infecção em morcegos está ao redor de1 a 2%.

A diminuição de casos no decorrer dos anos, observada no quadro 1, deve-se provavelmente à vacinação do gado, que é obrigatória em regiões consideradas endêmicas (CEDESA; CDA, 2000). Por outro lado, o recrudescimento de casos a partir do ano de 2000, que ocorreu em Itapeva, Ribeirão Branco, Apiaí e Eldorado, permite afirmar que o vírus permanece em circulação em morcegos hematófagos da região, o que corrobora nossa afirmação anterior.

Foi possível observar também, pelos dados fornecidos pelo Instituto Pasteur, que durante os 10 anos em questão, somente dois casos de morcegos infectados pelo vírus rábico foram notificados, não sendo possível obter informação sobre a espécie dos mesmos. Ao mesmo tempo, observa-se que ocorreu um aumento no número de envio de morcegos para o diagnóstico de raiva. Portanto, como já ressaltado por Rupprecht, Halon e Hemachudha (2002), para que se possa ter um controle efetivo da doença e a detecção de novos casos, é de extrema importância implementação de ações educativas visando uma maior conscientização da população das áreas rurais, bem como dos profissionais que atuam na área de pesquisa em animais silvestres, sobre a importância de envio de amostras para o diagnóstico de raiva.

O diagnóstico positivo para raiva em animais pertencentes às ordens Rodentia é raro (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001), porém ocasionalmente podem estar envolvidos em exposições a humanos e outras

espécies (WINKLER, 1991). Na literatura existem alguns trabalhos, nos quais vários exemplares de pequenos roedores foram capturados e submetidos à coleta de soro para a pesquisa de anticorpos, e fragmentos de tecido nervoso, para a pesquisa do vírus rábico por IFD e/ou ICC , obtendo-se apenas resultados negativos ou não significativos (BROWN; TINGPALAPONG; ANDREWS, 1979; CELER; MATOUCH; JUNIOR CELER, 1994; KANTAKAMALAKUL et al., 2003; KULONEM; BOLDINA, 1996). Por outro lado, existem estudos que relatam casos de isolamentos do vírus rábico em pequenos roedores. Sodja, Lim e Matouch (1971), capturaram pequenos roedores de duas localidades, sendo uma enzoótica para a raiva e outra onde não haviam casos notificados de raiva por um longo período. Nos primeiros dois anos, 928 animais foram capturados e em 13 foi possível o isolamento de um vírus definidos pelos autores como “rabies-like”, sendo os animais positivos pertencentes às espécies *Microtus arvalis*, *Apodemus flavicollis*, *Mus musculus* e *Clethrionomys glareolus*. Dos 13 positivos, somente dois não pertenciam a área enzoótica. Neste mesmo trabalho realizou-se ainda a pesquisa de anticorpos neutralizantes no soro de 700 animais. Títulos maiores que 1:10 foram demontrados em 22,5% dos soros de animais da área enzoótica e em 12,8% da outra região.

Svrcek et al. (1984), capturaram 283 hamsters (*Cricetus cricetus*) na região leste da Eslováquia, isolando o vírus rábico de cinco animais. Verificaram ainda que a virulência parecia ser reduzida, produzindo a doença com curso fatal em raposas e em gatos, mas sendo apatogênico para lobos cães e coelhos.

Nos Estados Unidos, Fishbein et al. (1986), realizaram um levantamento nos dados da vigilância do Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, no período de 1971 a 1984, constatando que haviam 104 casos registrados de raiva em roedores e lagomorfos, sendo que 80% dos casos foram reportados entre 1980 e

1984. Além disso, dos casos positivos, 64% ocorreram em marmotas (*Marmota monax*), roedores de grande porte, estando a maior parte dos casos associados a epizootias de raiva em guaxinins (*Procyon lotor*) nos estados da região média do Atlântico. Após alguns anos, Childs et al. (1997), realizaram um levantamento dos dados da mesma fonte, entre os anos de 1985 e 1994, constatando 368 casos de raiva em roedores (95% dos casos relatados) e lagomorfos (5%), sendo a marmota novamente a espécie mais acometida (86% dos casos).

Segundo Beran (1994), a razão de ser raro o isolamento do vírus em roedores pequenos, apesar de não esclarecida, talvez seja mais comportamental do que biológica. O pequeno tamanho dos roedores e a possibilidade mínima de sobreviverem aos ferimentos causados durante encontros com animais raivosos, provavelmente contribuem para pequena notificação nestes animais (CHILDS et al., 1997).

Talvez esta mesma hipótese possa ser também aplicada aos gambás, os quais, por outro lado, são considerados menos suscetíveis a raiva que outras espécies de mamíferos (WHO[2], 1973 apud ALMEIDA et al., 2001, p. 397) eresistentes à exposição laboratorial (BERAN, 1994). No trabalho de Almeida et al. (2001), é descrita uma prevalência mais alta de anticorpos neutralizantes em marsupiais nativos, sugerindo uma infecção natural por contato com animais infectados, como os morcegos, que compartilham do mesmo habitat. A pesquisa de anticorpos neutralizantes em soro dos animais capturados na reserva particular em Ribeirão Grande, poderia ter sido um procedimento muito interessante de ser realizado e poderia ter trazido resultados reveladores. Porém, devido a dificuldades operacionais e financeiras, não foi possível realizar a coleta de sangue dos animais.

[2] WHO. Rabies. Informe técnico n. 523, sixth report, WHO, Geneva, Switzerland, 1973. 49 p.

A utilização da pipeta plástica (tipo Pasteur) já foi citada por King (1998), indicando-a para situações onde não há a possibilidade da abertura do crânio. East et al. (2001), utilizaram canudos de plástico ("plastic straw") para a coleta de amostras de cérebros de hienas mortas por carros, leões ou por outros motivos, introduzindo os canudos pelo forame magno. Não existe descrição destes métodos em literatura brasileira, porém a utilização da pipeta plástica demonstrou-se bastante útil para a coleta de cérebro de animais, sem a necessidade da abertura do crânio possibilitando a obtenção de medidas e outras características importantes para a identificação de espécies. Vale ressaltar que neste estudo, observou-se que em pequenos animais, como o morcego, por exemplo, pode existir uma dificuldade maior de se introduzir a pipeta pelo forame magno dependendo do tamanho do animal, além de ocorrer uma perda de material em relação ao método tradicional de coleta de cérebro, em que o crânio é aberto. Esta técnica possibilita uma maior parceria com grupos de pesquisa ambiental que venham a capturar e sacrificar animais para estudo, além de facilitar a coleta de amostras de cérebro de animais mortos por atropelamento em estradas ("road-killed").

A propriedade da CBE é uma área que têm sofrido grandes alterações e interferências com a obra de aterramento. Estas alterações no ambiente podem ter como uma das conseqüências, mudanças comportamentais de alguns animais ou populações, que pode ser uma das causas que levam ao surgimento de zoonoses emergentes (BROWN, 2000). Desta forma o estudo foi relevante, pois, além das espécies enviadas para diagnóstico, animais como cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*), quati (*Nasua nasua*), irara (*Eira barbara*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), entre outros, foram observados pelos pesquisadores na área de abrangência da pesquisa. Nenhum destes animais foi

capturado ou sacrificado para estudo, porém como são considerados suscetíveis ao vírus rábico, estão sujeitos a infecção, caso a raiva venha a se manifestar como uma doença emergente.

Outro ponto importante que não podemos deixar de destacar sobre o presente estudo, foi a parceria com biólogos pois estes possuem um amplo conhecimento em relação à captura e identificação de animais.

5 CONCLUSÕES

Com o presente estudo, podemos concluir que:

1) Apesar de todas as amostras terem apresentado resultados negativos tanto para a IFD quanto à ICC, não é possível afirmar que o vírus não circula naquela propriedade, uma vez que o número de amostras analisadas foi menor que o número de amostras necessárias pelo cálculo da amostragem.
2) Baseado nos dados da Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva do Estado de São Paulo, fornecidos pelo Instituto Pasteur, pode-se afirmar que na região em que se encontra o município de Ribeirão Grande, existe a circulação do vírus rábico em morcegos, principalmente hematófagos, visto que foram notificados casos de raiva em bovinos e em eqüinos nos últimos anos.
3) O método de coleta de amostras de cérebros com a pipeta plástica tipo Pasteur através do forame magno, mostrou-se bastante útil em pequenos animais cujo crânio não pode ser danificado para não prejudicar posterior identificação da espécie.
4) A área onde realizou-se a pesquisa vêm sofrendo grandes alterações, o que pode predispor ao surgimento de zoonoses. Desta forma, sugere-se que a pesquisa do vírus rábico continue sendo realizada e, além disso, devido ao potencial de aparecimento de zoonoses emergentes, outros estudos poderiam ser realizados no local, como por exemplo, a pesquisa de Hantavírus.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Rabia. In: _____ **Zoonosis y Enfermedades Transmissibles Comunes al Hombre y a los Animales**. 3. ed.Whashington: Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 2003. p. 351-383.

ALMEIDA, M. F.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; SILVA, M. M. S. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 5, p. 341-344, 1994.

ALMEIDA, M. F.; MASSAD, E.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; JOPPERT, A. M. S. Neutralizing antirabies antibodies in urban terrestrial wildlife in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 2, p. 394-398, 2001.

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

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two *Lyssavirus* phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268-3276, 2001. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/vol75/issue7/index.shtml>. Acesso em: 20 out. 2004.

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

BROWN, C. Emerging infectious diseases of animals: an overview. In: BROWN, C.; BOLIN, C. (Ed.). **Emerging diseases of animals**. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. p. 1-12.

BROWN, J. L.; TINGPALAPONG, M.; ANDREWS, W.K. Serological survey of feral rodents in Thailand for evidence of rabies virus infection. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 15, n. 4, p. 601-607, 1979.

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

CELER,V.; MATOUCH, O.; JUNIOR CELER, V. The role of small terrestrial mammals in the epidemiology of rabies. **Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie:** casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti J.E. Purkyne, v. 43, n. 3, p. 124-126, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 15 ago. 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Investigation of rabies infections in Organ Donor and Transplant Recipients – Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, n. 26, p. 586-589, 2004. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5326a6.htm>. Acesso em: 20 out. 2004.

CENTRO DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL; COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Comunicado técnico:** raiva dos herbívoros, 2000. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/informe3.htm>. Acesso em: 18 fev. 2005.

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

CHILDS, J. E.; COLBY, L.; KREBS, J. W.; STRINE, T.; FELLER, M.; NOAH, D.; DRENZEK, C.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E. Surveillance and spatiotemporal associations of rabies in rodents and lagomorphs in the United States, 1985-1994. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 1, p. 20-27, 1997.

CLIQUET, F.; AUBERT, M.; SAGNÈ, L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantification of rabies-neutralizing antibody. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 79-87, 1998.

CORRÊA, S. H. R.; PASSOS, E. C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 493-499.

CÔRTES, V. A.; SOUZA, L. C.; UIEDA, W.; FIGUEIREDO, A. C. Abrigos diurnos e infecção rábica em morcegos de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 6, p. 179-186, 1994.

CUNHA, E. M. S.; SILVA, M. M. S.; SOUZA, M. C. C.; SOUZA, M. C. A. M.; CASTRO, A. F.; SCHYMONSKY, B. Bat rabies in Nothwestern São Paulo State from 1997 to 2000. **Virus Reviews and Research**, v. 6, n. 2, p. 177, 2001.

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

EAST, M. L.; HOFER, H.; COX, J. H.; WULLE, U.; WIIK, H.; PITRA, C. Regular exposure to rabies virus and lack ofsymptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15026-15031, 2001. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/vol98/issue26/> . Acesso em: 12 ago. 2004.

ETESSAMI, R.; CONZELMANN, K. K.; FADAI-GOTBI, B.; NATELSON, B.; TSIANG, H.; CECCALDI, P. E. Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2147-2153, 2000. Disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/>. Acesso em: 31 de janeiro de 2005.

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

FISHBEIN, D. B.; BELOTTO, A. J.; PACER, R. E.; SMITH, J. S.; WINKLER, W. G.; JENKINS, S. R.; PORTER, K. M. Rabies in rodents and lagomorphs in the United States, 1971-1984: increased cases in the woodchuck (*Marmota monax*) in mid-Atlantic states. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, n. 2, p. 151-155, 1986.

GARDNER, S.; KING, A. A. Rabies – recent developments in research and human prophylaxis. In: MORGAN-CAPNER, P. (Ed.). **Current Topics in Clinical Virology**. London: Public Health Laboratory Service, 1991. p. 141-163.

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

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

GOSZTONYI, G.; LUDWIG, H. Interactions of viral proteins with neurotransmitter receptors may protect or destroy neurons. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 253, p. 121-144, 2001.

JACKSON, A. C. Rabies virus infection: an update. **Journal of Neurovirology**, v. 9, p 253-258, 2003a. Disponível em:<http://www.jneurovirol.com/reviews.php>. Acesso em: 27 ago. 2004.

JAKCSON, A. C. Rabies Pathogenesis. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2003b. p.17-19.

KANTAKAMALAKUL, W.; SIRITANTIKORN, S.; THONGEHAROEN, P.; SINGEHAI, C.; PUTHAVATHANA, P. Prevalence of rabies virus and Hantaan virus infections in commensal rodents and shrews trapped in Bangkok. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 86, n. 11, p. 1008-1014, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 15 ago. 2004.

KAPLAN, C. Rabies: a worldwide disease. In: BACON, P. J. (Ed.). **Population dynamics of rabies in wildlife**. London: Academic Press Inc., 1985. p. 1-20.

KING, A. A. Rabies. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D. I. H. (Ed.). **Zoonoses**. Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 437-458.

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

KREBS, J. W.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E.; CHILDS, J. E. Rabies surveillance in the United States during 1997. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 12, p. 1713-1728, 1998.

KULONEN, K.; BOLDINA, I. No rabies detected in volves and field mice in a rabies-endemic area. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B.**, v. 43, n. 7, p. 445-447, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 15 ago. 2004.

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

LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G. H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, p. 182-184, 1982.

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

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

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

MATTOS, C. A. de; MATTOS, C. C. de; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields´ virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1245-1274.

MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWISK, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 9-27.

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 variant? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 609-610, 2000.

NIETFELD, J. C.; RAKICH, P. M.; TYLER, D. E.; BAUER, R. W. Rabies-like inclusions in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.1, p. 333-338, 1989.

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

OPAS. **Boletín:** vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, v. 31, 1999. 34 p.

OPAS. **Boletín:** vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, v. 34, 2002. 40 p.

OPAS. **Boletín:** vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, v. 35, 2003. No prelo.

OPAS. **Boletín:** vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, v. 36, 2004. No prelo.

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

PICCINNI, R. S.; GITTI, C. B.; SILVA, S. B.; GUIMARÃES, C. N.; BASTOS, P. V. Presença do vírus rábico em uma colônia de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* no município de Rio Preto, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 106-109, 1996.

QUEIROZ DA SILVA, L. H.; PEDRO, W. A.; PILZ, D.; CARVALHO, C.; PINHEIRO, D. M. Rabies infection in bats in Araçatuba region, São Paulo, Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 6, n. 2, p. 180-181, 2001.

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

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

RUPPRECHT, C. E. Rabies suveillance – problems in gauging the sounds of softly falling trees in poorly visited forests. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. p. 19.

RUPPRECHT, C. E.; DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W. H.; KOPROWSKI, H. Antigenic relationships of Lyssaviruses. In: BAER, G. (Ed.) **The natural history of rabies**. Florida: CRC Press, 1991. p. 69-100.

RUPPRECHT, C. E.; SMITH, J. S.; FEKADU, M.; CHILDS, J. E. The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 4, p. 107-114, 1995.

RUPPRECHT, C. E.; HALON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 327-343, 2002. Disponível em: <http://infection.thelancet.com>. Acesso em: 05 ago. 2004.

RUPPRECHT, C. E.; STÖHR, K.; MEREDITH, C. Rabies. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. (Ed.). **Infectious disease of wild mammals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001.p. 3-36. Disponível em: <http://wildlife.wisc.edu/courses/961/2004/publications/rupprecht%20et%20al%20viral%20prion.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2004.

SCHNEIDER, L. G. Spread of virus from the central nervous system. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2. ed. Florida: CRC Press, 1991. p.133

SHANKAR, V.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior investigation. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2736-2738, 1991. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&action=stream&blobtype=pdf&artid=240640>. Acesso em: 31 jan. 2005

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

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

SMITH, J. S.; FISHBEIN, D. B.; RUPPRECHT, C. E.; CLARK, K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States: a virologic investigation. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, p. 205-211, 1991.

SMITH, J. S.; PAMELA, A. Y.; GEORGE, M. B. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 48, p. 535-541, 1973.

SODJA, I.; LIM, D.; MATOUCH, O. Isolation of rabies-like virus from murine rodents. **Journal of Hygiene Epidemiology, Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 229-230, 1971.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2. ed. Florida: CRC Press, 1991. p. 1-24.

SVCEK, S.; ONDREJKA, R.; MLYNARCIKOVA, K. SVEC, J. Rabies in common hamster (*Cricetus cricetus*) in Slovakia. **Veterinarni Medicina**, v. 29., n. 11, p. 643-52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 15 ago. 2004.

TAKAOKA, N. Y. Alteração no perfil epidemiológico da raiva no estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. p. 23-24

TANG, Y.; RAMPIN, O.; GIULIANO, F.; UGOLINI, G. Spinal and brain circuits to motorneurons of the bulbospongiosus muscle: retrograde transneuronal tracing with rabies virus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 414, p. 167-192, 1999. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jissue/66001761>. Acesso em: 31 jan. 2005.

THOULOUZE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v.72, p. 7181-7190, 1998. Disponível em: <http://jvi.asm.org/> . Acesso em: 20 jan. 2005.

TORDO, N.; BADRANE, H.; CECCALDI, P. E.; REAL, E.; TUFFEREAU, C.; BLONDEL, D.; GAUDIN, Y.; PERRIN, P. Genetic and Functional Diversity of Lyssaviruses. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. p. 11-12

TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; BRANDÃO, P. E., CARRIERI, M. L.; BARBOSA, T. F. S.; MEDEIROS, D. B. A.; CASSEB, L. M. N.; KOTAIT, I.; VASCONCELOS, P. F. C. Laboratorial confirmation of human rabies outbreak transmitted by hematophagous bats (*Desmosdus rotundus*). In: XV REUNIÓN INTERNACIONAL DE RABIA EN LAS AMÉRICAS, 2004. **Anais...** p. 49-50.

TUFFEREAU, C.; BENEJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A. Low-affinity nerve growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. **The EMBO journal**, v. 17, p. 7250-7259, 1998. Disponível em: <http://embojournal.npgjournals.com/cgi/content/full/17/24/7250>. Acesso em: 20 jan. 2005.

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

WARRELL, M. J.; WARRELL, D. A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v. 363, p. 959-969, 2004. Disponível em: <http://www.thelancet.com>. Acesso em: 27 ago. 2004.

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

WHO. **Fact sheets**, n. 99, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/> . Acesso em: 19 ago. 2004.

WHO. WHO expert committee on Rabies, eighth report. **WHO technical report series**, v. 824, p. 1-40, 1992. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/WHO_Expert_Committee_8th_report.pdf>. Acesso em: 08 fev. 2005.

WHO. **WHO workshop on genetic and antigenic molecular epidemiology**. (WHO/Rab. Res/94.46), 13 p., 1995. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/WHO_workshop_genetic_antigenic_molecular_epidemiology_lyssaviruses.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2005.

WHO. **World survey for rabies**, n. 34, 1998. Disponível em: <http://www.who.int/emc-documents/rabies/docs/wsr98/wsr98.pdf>. Acesso em: 27 out. 2004.

WHO. **World survey for rabies**, n. 35, 1999. Disponível em: < http://www.who.int/emc-documents/rabies/whocdscsreph200210.html >. Acesso em: 24 out. 2004.

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

WILKINSON, L. Understanding the nature of Rabies: na historical perspective. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M.(Ed.). **Rabies**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 1-23

WINKLER, W. G. Rodent rabies. In: BAER, G.M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2. ed. Florida: CRC Press, 1991. p. 405-410.

ZHEN FANG FU. Rabies and rabies research: past, present and future. **Vaccine**. v. 15, p. S20-S24, 1997. Supplement.

APÊNDICE - Cálculo de número de amostras para estimativa de prevalência

Considerando-se um intervalo de confiança de 95%:

$$n = \frac{1{,}96^2 \; P_{exp} \, (1 - P_{exp})}{d^2}$$

onde,

n: número de amostras
P*exp*: prevalência esperada
d: precisão absoluta desejada

Considerando-se uma P*exp*=1,8% e um d=1%, teremos:

$$n = \frac{3{,}8416 \times 0{,}018(1-0{,}018)}{(0{,}01)^2}$$

$$n = \frac{3{,}8416 \times 0{,}017676}{0{,}0001}$$

n= 679,041

n= 679 amostras

KEILA IAMAMOTO

Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz da Silva

São Paulo
2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T. 1492
FMVZ

Iamamoto, Keila
Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo / Keila Iamamoto. – São Paulo : K. Iamamoto, 2005.
76 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

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

Orientador: Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz da Silva.

1. Raiva. 2. Animais silvestres. 3. Diagnóstico. 4. Chiroptera. 5. Rodentia. 6. Marsupialia. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo", Protocolo nº291/2003, utilizando 2000 (estimativa) comundongos, sob a responsabilidade da Profª Drª Luzia Helena Queiroz da Silva (UNESP/Araçatuba), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/10/03.

(We certify that the Research "Research of rabies virus in wild mammals from a private animal reserve in Ribeirão Grande, São Paulo, Brasil" protocol number 291/2003, utilizing 2000 mice, under the responsibility of Prof. Dr. Luzia Helena Queiroz da Silva (UNESP/Araçatuva), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 10/29/2003, meeting.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-000 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fones: (011) 3091-7671/3091-7676 Fax: (011) 3032-2224

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome da autora: IAMAMOTO, Keila

Título: Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Às pessoas que mais amo em minha vida:
Deus, o meu criador;
Timóteo e Irene, meus pais;
Heber e Tércio, meus irmãos;
Teru Tamai, meu grande amor.

À minha orientadora e amiga,
Luzia Helena Queiroz da Silva.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz da Silva, minha orientadora, pelos ensinamentos, pela amizade, compreensão, confiança e pelo apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Fumio Honma Ito, por sua prontidão em nos ajudar, por sua amizade e seus ensinamentos.

À Juliana Quadros e sua equipe, por terem aceitado nossa parceria, possibilitando a realização desta pesquisa . Agradeço também pelas fotos gentilmente cedidas.

À Profa. Cáris Maroni, por nos auxiliar nos cálculos de amostragem e por sua contribuição na elaboração da dissertação.

Ao Prof. Sílvio Arruda Vasconcellos, pelo incentivo, apoio, e pela maneira como coordena o curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Ao “Tião”, taxidermista do Museu de História Natural Capão de Imbuia, que realizou a coleta de todas as amostras.

Ao João Linhares, coordenador do Projeto Fernandes da Companhia Brasileira de Equipamentos, e ao Manoel Domingues, da Juris Ambientis Consultores Ltda., que permitiram a inclusão do meu projeto.

À Dra. Tereza Mitiko Omoto, médica sanitarista do Instituto Pasteur, por ter disponibilizado os dados da Coordenação do Programa de Controle de Raiva do Estado de São Paulo.

Ao Cristiano de Carvalho, técnico do laboratório de diagnóstico de raiva da UNESP de Araçatuba, por ter me ensinado todos os procedimentos do laboratório e pelo auxílio prestado.

À Devani Mariano Pinheiro, por ter me ensinado e me ajudado com a rotina do infectório, mesmo nos momentos de dores.

Ao Biotério Central da UNESP de Botucatu e ao Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba, por fornecerem os camundongos necessários para a realização deste projeto.

Ao Sr. Jorge Watanabe, por ter fornecido a maravalha durante todo o período em que realizamos a pesquisa.

À bibliotecária, Elza Faquim, sempre atenciosa e paciente.

Aos colegas da Pós-graduação, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos meus familiares e amigos, que sempre torceram por mim.

Aos meus pais e aos meus irmãos pelo apoio, pela paciência e compreensão.

Ao Teru Tamai, pela confiança e compreensão, mesmo estando tão longe.

Ao Dr. Antônio Messias da Costa, grande amigo e incentivador para o meu ingresso neste curso de mestrado.

À Capes pela concessão de uma bolsa e à Fundunesp (00806/03) pelo auxílio financeiro oferecido ao projeto.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu:
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar
e tempo de arrancar o que se plantou;
tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derribar, e tempo de edificar;
tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de saltar de alegria;
tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar as pedras; tempo de abraçar,
e tempo de afastar-se de abraçar;
tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de deitar fora;
tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar;
tempo de amar, e tempo de aborrecer; tempo de guerra, e tempo de paz.

Eclesiastes 3:1-8

RESUMO

IAMAMOTO, K. **Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo**. [Rabies virus search in wild mammals from a private natural reserve from Ribeirão Grande, São Paulo]. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

No Brasil e em alguns países da América Latina, a incidência de raiva transmitida por animais domésticos tem diminuído enquanto tem aumentado em animais silvestres. Durante os últimos anos, no Brasil, a raiva tem sido diagnosticada em morcegos hematófagos ou não, primatas não-humanos, cachorros-do-mato, quatis, guaxinins, capivaras, cervos, gambás e outras espécies silvestres. O presente estudo foi realizado em parceria com biólogos, pesquisadores na área de monitoramento de fauna silvestre, e o objetivo foi pesquisar a presença do vírus rábico em mamíferos silvestres de vida livre, provenientes de uma reserva natural particular, localizado no município de Ribeirão Grande, São Paulo, região que já foi alvo de raiva nos últimos anos. Durante o período de 2002 a 2004, 104 amostras de cérebro de animais capturados foram enviadas para diagnóstico no Laboratório de Raiva da UNESP de Araçatuba, SP, acondicionadas em pipetas plásticas do tipo Pasteur individuais. Os animais pertenciam a três ordens, Chiroptera (47,1%), Rodentia (46,2%) e Marsupialia (6,7%), sendo de diferentes idades e sexos. As amostras foram submetidas ao teste de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos e todas apresentaram resultado negativo para a raiva. Segundo dados da Coordenação do Programa de Controle da Raiva do Estado de São Paulo a raiva é endêmica na região estudada e a porcentagem de positividade em morcegos nos últimos dez anos é de 1,8%. Embora dos

diagnósticos tenham sido negativos neste estudo, não é possível afirmar que o vírus rábico não circula naquela propriedade.

Palavras-chave: Raiva. Animais Silvestres. Diagnóstico. Chiroptera. Rodentia. Marsupialia.

ABSTRACT

IAMAMOTO, K. **Rabies virus search in wild mammals from a private natural reserve from Ribeirão Grande, São Paulo**. [Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no Município de Ribeirão Grande, São Paulo]. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

In Brazil and some Latin American countries, the incidence of rabies transmitted by domestic animals has decreased while it has been increasing in wild animals. During the last few years rabies has been diagnosed in hematophagous or nonhematophagous bats, nonhuman primates, crab-eating foxes, coatis, raccoons, capybaras, deers, skunks and some other species. The present study was carried out with biologists, researchers in wild fauna monitoring and the objective was to search the presence of the rabies virus in wildlife mammals from a private natural reserve, in Ribeirão Grande city, SP, region that was target of rabies in the last few years. During 2002 to 2004, 104 brain samples of captured animals were sent for diagnosis to UNESP Rabies Laboratory from Araçatuba, SP, conditioned in individuals Pasteur plastic pipettes. The animals belonged to three different orders, Chiroptera (47,1%), Rodentia (46,2%) and Marsupialia (6,7%), and to different ages and sex. The samples were submitted to direct fluorescent antibody test and mouse inoculation test and all samples resulted negative for rabies. According to data of the Rabies Control Program Coordination from São Paulo State, rabies is endemic in the studied region and the percentage of positive cases in bats during the last 10 years was 1,8%. Although all diagnosis were negative in this study, it is not possible to affirm that the rabies virus do not circulate in that property.

Key words: Rabies. Wild animals. Diagnosis. Chiroptera. Rodentia. Marsupialia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área da propriedade pertencente à Companhia Brasileira de Equipamentos, em Ribeirão Grande, SP. Ao fundo, mata onde foram realizadas as capturas e à frente, área de aterramento 53

Figura 2 - Mapa do Estado de São Paulo, destacando Ribeirão Grande e municípios considerados 53

Figura 3 - Armadilha metálica do tipo Sherman montada em solo 54

Figura 4 - Armadilha metálica de grade montada sobre o galho de uma árvore 54

Figura 5 - Armadilha-de-queda com baldes enterrados (“pitfall”) 55

Figura 6 - Canaleta artificial com obstáculo de tela metálica 55

Figura 7 - Pipeta plática do tipo Pasteur introduzida através do forame magno, preservando-se a integridade craniana 56

Figura 8 - Pipeta plática do tipo Pasteur com amostra de cérebro após a aspiração 56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diagnóstico de raiva segundo o ano e a espécie animal avaliada durante o período de 1994 a 2003, em diferentes municípios[1] próximos à Ribeirão Grande-SP 48

Quadro 2 – Animais enviados aos laboratório de diagnóstico de Raiva da Unesp de Araçatuba segundo Ordem, Família, Gênero, Espécie, Sexo e Idade, 2002-2004 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
CBE	Companhia Brasileira de Equipamentos
DFA	anticorpo fluorescente direto
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAVN	teste fluorescente de vírus neutralização
GABA	ácido gama-amino-butírico
GT	genotipo
ha	hectare
ICC	inoculação intracerebral em camundongos
IFD	imunofluorescência direta
Km^2	quilômetro quadrado
nm	nanômetro
OPAS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	solução salina fosfatada
RFFIT	teste de inibição rápida de focos fluorescentes
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação em cadeia pela polimerase - transcriptase reversa
SNC	sistema nervoso central
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
USA	Estados Unidos da América
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 18
2 **REVISÃO DE LITERATURA** 21
2.1 HISTÓRICO 21
2.2 ETIOLOGIA 24
2.3 EPIDEMIOLOGIA 26
2.4 PATAGENIA 37
2.5 DIAGNÓSTICO 40
2.6 PREVENÇÃO E CONTROLE 42
3 **MATERIAIS E MÉTODOS** 46
3.1 ÁREA DE ESTUDO 46
3.2 OS ANIMAIS 49
3.3 CAPTURA 49
3.4 COLETA DO ENCÉFALO 50
3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL 51
3.5.1 **Imunofluorescência direta** 51
3.5.2 **Inoculação intracerebral em camundongos** 52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
5 CONCLUSÕES 65
REFERÊNCIAS 66
APÊNDICE 76

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade caracterizada por uma encefalite viral aguda geralmente fatal tanto para animais quanto para os seres humanos. Os agentes etiológicos envolvidos são vírus RNA, neurotrópicos, pertences ao gênero *Lyssavirus*, família Rhabdoviridae (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001).

Devido a sua evolução letal, ao elevado número de casos em humanos, bem como de pessoas submetidas anualmente ao tratamento anti-rábico pós-exposição, a raiva continua sendo um problema de saúde publica em todo o mundo. Porém, a falta de sistemas adequados de informação e vigilância epidemiológica na maioria dos países, não permite o conhecimento da real magnitude do problema (BELOTTO, 2000). No mundo, estima-se que 10 milhões de pessoas submetam-se anualmente ao tratamento anti-rábico após exposição a algum animal suspeito de raiva e que o número de mortes anuais causadas por esta doença esteja entre 40.000 a 70.000 casos, lembrando-se que estimativas mais elevadas são usadas para países com altas densidades populacionais da África e Ásia, lugares onde a raiva é endêmica (WHO, 2001). No entanto, é importante salientar que em muitos países africanos e asiáticos o diagnóstico da raiva, na maioria dos casos, é realizado apenas clinicamente, ou seja, não adotam-se os testes laboratoriais como ferramentas auxiliares na rotina (WHO, 1999).

A principal fonte de infecção do vírus rábico em vários países europeus e no Canadá são os animais silvestres. Nos Estados Unidos, após um programa de prevenção à raiva que consistia na vacinação de humanos e de cães, que iniciou-se na década de 1920, observou-se que o índice de sua ocorrência em animais

domésticos começou a decrescer, aumentando porém o número de casos em animais silvestres, principalmente em guaxinins, gambás, raposas e morcegos (RUPPRECHT et al., 1995). Desde 1990, as espécies silvestres representam mais de 90% dos casos notificados (KING, 1998).

Um quadro semelhante ao ocorrido nos Estados Unidos e na Europa pode vir a ocorrer no Brasil e em outros países da América pois tem se observado a diminuição de casos em animais domésticos e o aumento da incidência em animais silvestres nos últimos anos. Desde 1988, os morcegos tornaram-se a segunda fonte de infecção mais importante da raiva para humanos no Brasil, sendo esta classificação antes pertencente aos gatos domésticos (ALMEIDA et al., 2001). No entanto, em 2004, observou-se pela primeira vez um número maior de casos de raiva em humanos transmitida por morcegos hematófagos (22 casos) em relação aos casos transmitidos por cães (5 casos) (OPAS, 2004). Além do mais, durante os últimos anos, o vírus rábico tem sido diagnosticado em outras espécies silvestres como raposas, primatas não-humanos, cangambás, quatis e outras espécies não identificadas (CORRÊA; PASSOS, 2001).

No Estado de São Paulo uma alteração no perfil epidemiológico da raiva também tem sido observada nos últimos anos, com considerável diminuição progressiva nos casos de cães e gatos, resultante das campanhas de vacinação e com um aumento crescente da doença em herbívoros e morcegos hematófagos ou não (TAKAOKA, 2000).

A chave para um programa bem sucedido de controle e prevenção da raiva é um sistema de vigilância efetivo, baseado preferencialmente em diagnóstico laboratorial (RUPPRECHT, 2003). A obtenção das amostras se faz geralmente pela busca passiva, ou seja, o material de um animal suspeito é enviado ao laboratório,

sendo este procedimento adotado tanto para animais domésticos quanto silvestres. A busca ativa é um procedimento extremamente trabalhoso além de oneroso, justificando-se somente em casos especiais, em se tratando da raiva (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001).

O presente estudo realizou-se em parceria com um grupo de pesquisadores que desenvolvem um "Programa Básico Ambiental de Monitoramento da Fauna – área específica Mastofauna" da Companhia Brasileira de Equipamentos (CBE), em Ribeirão Grande, São Paulo, cujo principal objetivo é avaliar as interferências das atividades de aterramento sobre a mastofauna que vive ao redor da obra, em uma área de reserva natural particular, por meio do monitoramento de certas espécies, sendo as espécies escolhidas pertencentes às ordens Chiroptera, Rodentia e Marsupialia. Na primeira fase do programa, foi necessária a identificação das espécies que viviam naquela área e para tanto, a captura e a eutanásia de alguns animais foram imprescindíveis para posterior taxidermia e identificação. O encéfalo da maioria dos animais eutanasiados foi cuidadosamente retirado, preservando-se a integridade craniana, sendo encaminhados posteriormente para o diagnóstico de raiva.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi de pesquisar a presença do vírus rábico em mamíferos silvestres de vida livre, provenientes de uma reserva natural particular, localizado no município de Ribeirão Grande, Estado de São Paulo, região que já foi alvo de surtos de raiva nos últimos anos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura procurou-se abordar os principais aspectos sobre o histórico da doença, epidemiologia (com ênfase nos principais reservatórios no Brasil e no mundo), patogenia, diagnóstico, prevenção e controle.

2.1 HISTÓRICO

A palavra "raiva" provém do latim, *rabere*, que significa delirar, desvairar, que por sua vez tem sua origem no sânscrito antigo, *rabhas*, cuja tradução é "fazer violência" (BERAN,1994; STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Descrita pelo menos há 4 milênios, a raiva é uma das doenças infecciosas mais antigas que se tem conhecimento (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). O primeiro registro da doença, segundo Albright[1] (1952 apud BERAN, 1994, p.307), encontra-se no Código Sumariano da cidade de Eshnunna, datando 1885 a.C., contendo a seguinte lei:

> [...] se um cão está louco e as autoridades informaram o proprietário e o mesmo não prender o cão, se este então morder um homem e causar a sua morte, o proprietário do cão deverá pagar dois terços de uma mina (40 shekels) de prata.

Na Grécia, as primeiras descrições da doença em cães realizaram-se por Demócritos, 500 a. C., e Aristóteles, no século IV a. C., mas não reconheciam o

[1]ALBRIGHT, W. F. The old testament world. In: BUTTRICK, G. H.; BOWIE, W. R.; SCHERER, P.; KNOX, J.; TERRIEN, S.; HARMON, N. B. **The interpreter's Bible**. New York: Abingdon Press, 1952. v. 6, p. 233.

acometimento de humanos. Em humanos o responsável pela primeira descrição foi Hipócrates (BERAN, 1994; STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Cardanus, um escritor romano, descreveu a infectividade da saliva dos cães raivosos como um “material venenoso”, cuja palavra latina era “vírus”. Outra possível causa, segundo Pliny e Ovid, seria a presença de um “verme da língua de cão” (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Celsus, físico do século I, foi enfático ao dizer que todos os animais que continham o “veneno”, eram perigosos para o homem e para outros animais. Afirmava ainda que a hidrofobia, como chamavam os gregos, caracterizava-se por uma pessoa atormentada, com sede e com medo de água concomitantemente. Foi o primeiro a recomendar o tratamento da ferida com substâncias cáusticas, fogo, aplicação de sal, sangria por meio de ventosas ou sugadura, cada método com sua indicação (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Foi a partir do século XIX que a ciência deu um grande salto no conhecimento da raiva e descobertas muito importantes ocorreram. Em 1804, Zinke demonstrou pela primeira vez que a raiva poderia ser transmitida pela saliva, contaminando incisões superficiais na pele do animal sadio com a saliva do animal doente. Escreveu um livro sobre a fonte, a patogênese e o tratamento da doença, em que ainda observava-se traços de superstição mas já com algumas idéias modernas, como por exemplo, a lavagem da ferida por horas (KAPLAN, 1985; STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Em 1879, Galtier demonstrou a transmissão da doença em coelhos e de coelhos para coelhos, observando-se um período de incubação de 18 dias, paralisia e convulsões. Não expôs, porém, com muitos detalhes o método da transmissão (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

O trabalho definitivo sobre a transmissão da raiva foi realizado por Louis Pasteur. Em 1881, concluiu que o sistema nervoso central (SNC) estava envolvido no desenvolvimento da doença, provando que o vírus não estava presente somente na saliva. Posteriormente, descobriu que, injetando-se o material de SNC de um animal raivoso diretamente no cérebro de outro animal, o período médio de incubação era de duas semanas. Em 1884, por meio de experimentos, concluiu que todo o SNC era suscetível à raiva, levantando ainda a suspeita de que o microorganismo envolvido seria extremamente pequeno. Além disso, em colaboração de Chamberland e Roux, estudou a atenuação do vírus (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Neste mesmo ano, demonstrou com sucesso a primeira imunização em cães e no ano seguinte, em um garoto de nove anos, Joseph Meister. Em ambos os casos, o tratamento realizou-se pós-exposição, utilizando-se suspensão da medula espinal de coelhos infectados e obtendo sucesso nos resultados (BERAN,1994; STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Em 1903, Paul Remlinger conseguiu demonstrar a filtrabilidade do agente etiológico da raiva. No mesmo ano, Aldechi Negri observou a presença de corpúsculos de inclusão em tecido nervoso, apontando-os como o agente da doença (BERAN, 1994; WILKINSON, 1988). Os corpúsculos de Negri tornaram-se achados patognômonicos para a raiva.

O diagnóstico da raiva deu um grande salto com o desenvolvimento do teste de inoculação intracerebral em camundongos (ICC), por Webster e Dawson, em 1935. Descobriram que o camundongo era suscetível a viroses neurotrópicas e observaram que a raiva era reproduzida por inoculação intracerebral de amostra de cérebro de cão que continha o corpúsculo de Negri. Com o teste em camundongos constatou-se que em apenas 85 a 95% dos casos positivos de raiva eram

encontrados os corpúsculos de Negri ao exame microscópico (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

Goldwasser e Kissiling, em 1958, reportaram a aplicação do teste de imunofluorescência direta (IFD) para demonstrar o antígeno da raiva no tecido do SNC. O teste também tem sido utilizado para vários outros tecidos como células da córnea, da mucosa oro-nasal e bulbo capilar porém, seu uso mais freqüente é em tecido cerebral *post mortem* (BERAN, 1994). Ainda hoje, o teste de imunofluorescência direta e o teste de inoculação intracerebral em camundongos são considerados os testes de eleição para o diagnóstico da raiva (MESLIN; KAPLAN, 1996)

2.2 ETIOLOGIA

Os agentes etiológicos envolvidos pertencem à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae e ao gênero *Lyssavirus* (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001). Neste gênero estão agrupados o vírus da raiva e os vírus relacionados genética e antigênicamente, sendo todos adaptados à replicação no sistema nervoso central (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

Os vírions possuem um formato peculiar semelhante a uma bala de revólver, com aproximadamente 180nm de comprimento e 75nm de diâmetro. São compostos por uma ribonucleoproteína interna, que contém o RNA genômico associado a 3 proteínas internas: a transcriptase, a nucleoproteína e a fosfoproteína. Juntas formam o complexo RNA ativo, o qual é funcional no processo de transcrição e replicação. Externamente, existe um envelope de bicamada lipídica, sendo que no interior desta bicamada, encontra-se a proteína da matriz. Ainda no envelope, na

sua superfície externa, existe a presença da glicoproteína (BERAN, 1994; KING, 1998; RUPPRECHT et al., 1991).

Antigamente acreditava-se que apenas uma espécie de vírus causava a doença, até que por meio de métodos sorológicos, antigênicos e genéticos, baseados principalmente em estudos da glicoproteína e da nucleoproteína, comprovou-se a existência de pelo menos 7 genotipos (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

O genotipo 1 (GT1), representado pelo vírus rábico, é o membro mais significativo do gênero, apresentando uma ampla distribuição mundial, além de uma importância na saúde pública e veterinária. Anteriormente eram denominados vírus fixo ou de vacina (vírus adaptado por passagens em animais ou culturas de células) e vírus de rua ou silvestre (vírus não adaptado), porém com o uso da técnica de anticorpos monoclonais e com o avanço das técnicas moleculares, identificaram-se e diferenciaram-se diversas variantes originadas de diferentes reservatórios, tanto domésticos quanto silvestres, principalmente carnívoros e quirópteros. Os vírus Lagos Bat (GT2), Mokola (GT3) e Duvenhage (GT4) foram isolados no continente Africano e a epidemiologia destes ainda é pouco conhecida. Os dois primeiros foram isolados primeiramente em animais silvestres e posteriormente em animais domésticos. No continente Europeu foram isolados os vírus European Bat I (GT5) e European Bat II (GT6) em morcegos insetívoros. Na Austrália identificou-se o GT7, o vírus Australian Bat, isolado de morcegos frugívoros e insetívoros (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). Dois novos lyssavírus foram isolados de morcegos no continente asiático: o vírus Aravan , no Quirguistão, e o vírus Khujand, no Tadjiquistão, em 1991 e 2001, respectivamente, sugerindo novos genotipos (ARAI et al., 2003; KUZMIN et al., 2003).

Por meio de técnicas moleculares, tem se desenvolvido o estudo filogenético destes vírus, sendo que os 7 genotipos foram divididos em 2 filogrupos: o filogrupo 1, composto pelos GT1, GT4, GT5, GT6 e GT7, e o filogrupo 2,composto pelo GT2 e GT3. Estudos revelaram ainda que existe uma variação de patogenicidade entre os dois filogrupos e com relação à imunidade, a neutralização cruzada ocorre somente dentro do filogrupo, mas não entre os filogrupos (BADRANE et al., 2001; TORDO et al., 2003).

2.3 EPIDEMILOGIA

Embora todos os animais vertebrados de sangue quente sejam suscetíveis à infecção experimental, apenas os mamíferos são importantes na epidemiologia da raiva. Existem mais de 4.000 espécies na classe Mammalia, todos teoricamente suscetíveis e capazes de infectar outros mamíferos (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001), observando-se dentro deste grupo alguns mais aptos que outros na dispersão do vírus rábico e uma variação de suscetibilidade entre as espécies (KAPLAN, 1985). O vírus já foi isolado de quase todas as ordens de mamíferos, porém os que são considerados reservatórios pertencem principalmente às ordens Carnivora e Chiroptera (ACHA; SZYFRES, 2003; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

A epidemiologia dos Lyssavírus é influenciada, em parte, pela distribuição, abundância, demografia, ecologia comportamental, dispersão das espécies de reservatórios, assim como pelas suas interações com seres humanos (RUPPRECHT et al., 1995).

No mundo, o cão doméstico ainda é o principal reservatório da doença para humanos (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001). Os morcegos são reservatórios extremamente importantes em todos os continentes habitados e seis dos sete genotipos descritos, são encontrados nesta ordem de mamíferos (BADRANE et al., 2001). Quanto aos felinos, tanto os domésticos quanto os silvestres, apesar de serem altamente suscetíveis e capazes de transmitir a doença, ainda não foi possível a identificação de uma variante específica desta espécie e a transmissão entre felinos parece ser limitada (BERAN, 1994). Os animais pertencentes às ordens Rodentia e Lagomorpha, embora usados amplamente como modelos laboratoriais, raramente são diagnosticados como positivos para a raiva, porém apresentam relevância na saúde pública dedicada à rotina de consulta ou profilaxia após contato com estes pequenos mamíferos ubíquos. (BERAN, 1994; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002). Na literatura existem alguns trabalhos em que foram capturados um grande número de roedores, obtendo-se somente resultados negativos para a raiva (BROWN; TINGPALAPONG; ANDREWS, 1979; CELER; MATOUCH; JUNIOR CELER, 1994; KANTAKAMALAKUL et al., 2003; KULONEM; BOLDINA, 1996), porém existem outros que comprovam a detecção de antígeno e isolamento viral (CHILDS et al., 1997; FISHBEIN et al., 1986; SODJA; LIM; MATOUCH, 1971; SVRCEK et al., 1984). Com relação aos marsupiais, poucos dados existem na literatura disponível, considerando-se raros os casos de raiva nas espécies desta ordem. Os gambás[2] (animais pertencentes às famílias Didelphidae),

[2]Em inglês, existem dois nomes populares de mamíferos, “skunk” e “opossum”, que na língua portuguesa podem possuir a mesma tradução, “gambá”. Apesar de receberem o mesmo nome, são mamíferos pertencentes a ordens, famílias e espécies diferentes. O “skunk”, cujo nome científico é *Mephitis mephitis,* pertence à ordem Carnivora e à família Mustelidae. Já o “opossum”, *Didelphis sp.,* pertence à ordem Didelphimorphia e à família Didelphidae. Dentro desta mesma ordem e família, temos ainda, por exemplo, o “short-tailed opossum”, *Monodelphis sp.* No texto, para “skunk”, traduziu-se como cangambá, enquanto “opossum”, como gambá. Existe apenas uma exceção, que é com relação aos dados da OPAS, em que a tradução encontrada para “zorrillo” foi cangambá, porém não se tem acesso aos nomes científicos dos animais em questão para certificar-se da espécie.

são considerados menos suscetíveis à raiva que outras espécies de mamíferos (WHO[3], 1973 apud ALMEIDA et al., 2001, p. 397), embora possam se infectar.

Na Ásia, os registros da doença são predominantemente em canídeos, tendo o cão como principal reservatório e principal causador de fatalidades para o homem (WHO, 1998). Porém, a dificuldade na obtenção de dados sobre casos de raiva ainda é uma realidade em muitos países deste continente (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). A ocorrência da raiva varia entre os países, sendo que alguns são considerados "livres", como por exemplo, o Japão, Coréia, Catar, Singapura e Bahrain (BERAN, 1994; WHO, 1999). Raposas (*Vulpes vulpes*, *Vulpes rueppelli*), lobos (*Canis lupus arabs*), hienas (*Hyaena hyaena*), chacais (*Canis aureus*) e mangustos (*Ichneumia albicauda*) são importantes reservatórios silvestres na Ásia (BERAN, 1994; KAPLAN, 1985; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). A raiva em morcegos é raramente reportada, lembrando-se que geralmente os morcegos são capturados para exame somente após uma exposição humana (KING, 1998).

No continente africano são poucos registros da doença, sendo que não existem documentações científicas disponíveis antes de 1928. Existem evidências de que os lyssavírus tenham sua origem neste continente por ser este o único lugar, dentre outros continentes, onde observa-se a presença de quatro genotipos. O papel dos animais silvestres na manutenção da doença na África, é obscurecida pela presença do cão doméstico. A falta de equipes experientes, de equipamentos e sistemas de comunicações adequados, levam a um sistema de vigilância também inadequado. Em toda a África, a raiva tem sido diagnosticada em muitas espécies de animais silvestres: chacais (*Canis mesomelas, Canis adustus, Canis simensis*),

[3]WHO. Rabies. Informe técnico n. 523, sixth report, WHO, Geneva, Switzerland, 1973. 49 p.

raposas (*Otocyon megalotis, Vulpes,* sp.), mangustos (*Ichneumia albicauda, Cynictis penicillata*), gerbils (*Gerbillus gerbillus, Tatera leucogaster*), “civets” (*Civettictis civetta*), texugos (*Mellivora capensis*), hienas (*Crocuta crocuta*), entre outros (KAPLAN, 1985; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001).

No continente europeu, as epidemias de raiva envolvendo animais e pessoas começaram a ser descritas no século XIII (BAER, 1994). Durante muitos séculos na Europa Ocidental e Central a doença foi prevalente tanto em animais domésticos quanto em animais selvagens, especialmente raposas e lobos (*Canis lupus*) (WILKINSON, 1988), existindo também relatos em texugo (*Meles meles*) e urso (*Ursus arctos*) (STEELE; FERNANDEZ, 1991). A raiva em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), que era comum nos países da Europa no século XIX, diminuiu em grande escala por motivos desconhecido, porém, após a II Guerra Mundial, a doença reemergiu na mesma população espalhando-se pela Europa, da Polônia para a região leste da Alemanha (BERAN, 1994; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). Além das raposas vermelhas, existem as raposas do Ártico, que encontram-se em uma extensão menor em áreas do círculo polar (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). No ano de 1999, 839 casos de raiva foram diagnosticados em cães domésticos, enquanto que em raposas, observou-se um total de 3.273 casos (WHO, 1999). Outro importante reservatório na Europa é o “racoon dog” (*Nyctereutes procyonoides*) que parece ser capaz de coexistir nos mesmos habitats que as raposas vermelhas (KAPLAN, 1985). A raiva em morcegos da Europa foi reconhecida pela primeira vez no início da década de 50 e um aumento de casos inesperado ocorreu em 1985, com um pico em 1987. Uma explicação para este aumento seria a maior atenção que foi dada aos morcegos como um reservatório em potencial da raiva. As duas espécies mais freqüentemente acometidas são o

Epitesicus serotinus e o *Myotis* spp. (KING,1998; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001).

Na América do Norte, a epidemiologia da raiva tem sofrido mudanças nos últimos 100 anos (RUPPRECHT et al., 1995). Atualmente, mais de 90% dos casos ocorrem em animais silvestres (KREBS et al., 1998). Entre as espécies mais importantes estão os guaxinins (*Procyon lotor*), cangambás (*Mephitis mephitis*, *Spilogale putoris*), raposas (*Alopex lagopus*, *Vulpes vulpes* e *Urocyon cinereoargenteus*), coiotes (*Canis latrans*) e morcegos insetívoros (KAPLAN, 1985; KING, 1998).

Na América Central e na América do Sul, a raiva continua causando sérios problemas econômicos e de saúde pública (KING, 1998). A raiva canina é enzoótica na maioria dos países da América Latina (SMITH; BAER, 1988), sendo o cão a principal fonte de infecção para o homem (KAPLAN,1985). A raiva paralítica bovina tem grande importância econômica e o reservatório responsável é o morcego hematófago ou vampiro (KING, 1998). Os morcegos vampiros encontram-se na América Central e na América do Sul, existindo três espécies: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diemus youngi*. A primeira citada é a mais prevalente das espécies e a mais freqüentemente infectada pelo vírus da raiva (BERAN, 1994). Além dos morcegos hematófagos, em 2002, foram notificados casos de raiva nas seguintes espécies silvestres: guaxinins, mangustos, morcegos não-hematófagos, primatas, cangambás e raposas (OPAS, 2002). No Caribe, os mangustos foram importados da Ásia durante o século XIX com o objetivo de controlar cobras e roedores em plantações de cana-de-açúcar, mas hoje são importantes reservatórios da raiva (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

No Brasil, tem-se observado um aumento na incidência de casos de raiva em animais silvestres. No ano de 1999, registrou-se 37 casos em silvestres, sendo 04 em morcegos hematófagos, 06 em não-hematófagos, 15 em raposas, 03 em cangambás, 01 em macaco e 08 em espécies não identificadas (OPAS, 1999). No ano de 2002, o número de casos elevou-se para 89, sendo 12 morcegos hematófagos, 2 não-hematófagos e 55 não identificados, 5 cangambás, 13 raposas, 2 animais de outras espécies (OPAS, 2002). Em 2003, somente em morcegos, foram registrados 113 casos (OPAS, 2003).

A maior parte dos relatos existentes na literatura sobre a raiva em silvestres, restringe-se aos morcegos, sendo a espécie mais comumente relatada como positiva, o *Desmodus rotundus*. Dentre os vários relatos, destacam-se o de Nilson e Nagata que em 1975 descreveram o isolamento do vírus rábico em um exemplar encontrado caído e paralítico em uma residência em Barueri, São Paulo. Também, no município de Rio Preto, Minas Gerais, foram capturados 59 morcegos desta mesma espécie, oriundos de uma mesma colônia localizada em uma gruta natural, isolando-se o vírus de 32 animais (PICCININI et al., 1996).

Os morcegos insetívoros, por sua vez, apresentam ampla distribuição mundial, tendo sido relatados vários casos de isolamento do vírus rábico nestas espécies, inclusive no Brasil. A preocupação com os insetívoros é bastante relevante já que esses animais parecem ser cada vez mais freqüentes em áreas urbanas (ALMEIDA et al., 1994). Em 1975, descreveu-se um caso de isolamento em um morcego insetívoro *Molossus obscurus*, capturado em condição de semi-paralisia em Campinas, São Paulo (RODRIGUES et al., 1975). Em 1988 e 1990, foram diagnosticados positivos dois morcegos da espécie *Nyctinomops macrotis*, ambos de

bairros residenciais do município de São Paulo (ALMEIDA et al., 1994). Quase neste mesmo período (1988 - 1991), no Estado de São Paulo, 4 morcegos capturados em áreas residenciais pertencentes às espécies *Molossus molossus*, *Nyctinomops laticuadatus* e *N. macrotis*, foram positivos para a raiva (UIEDA; HARMANI; SILVA,1995). Em 1994, encontrou-se um morcego insetívoro *Myotis nygricans* em área peri-urbana no município de Ribeirão Pires, São Paulo, do qual se isolou o vírus rábico (MARTORELLI et al., 1995). No ano de 1995, diagnosticou-se também positivo, um morcego da espécie *Lasyurus borealis* em área residencial no município de Jundiaí, São Paulo (MARTORELLI et al., 1996) e em 1997, um exemplar de *Nyctinomops macrotis*, no município de Diadema, São Paulo (PASSOS et al., 1998). Na região noroeste do Estado de São Paulo, nos municípios de Araçatuba, Penápolis e São José do Rio Preto, foram registrados 4 casos de raiva em *Molossus ater* capturados em áreas urbanas (QUEIROZ DA SILVA et al., 1999).

A raiva ocorre também em morcegos frugívoros, como por exemplo o *Artibeus lituratus*, que foi a espécie com maior número de exemplares positivos na região Noroeste do Estado de São Paulo (CUNHA et al., 2001; QUEIROZ DA SILVA et al., 2001).

Outras espécies silvestres, além do morcego, tem sido diagnosticadas como positivas no Brasil. Segundo Corrêa e Passos (2001), durante o período de 1965 a 1974, a raiva foi diagnosticada no estado do Rio de Janeiro em 07 sagüis, 05 macacos, 04 cervos, 02 ratos e 01 esquilo mantidos em cativeiro ou criados como animais de estimação. Cita-se também o relato da ocorrência de 06 sagüis de vida livre, 08 macacos, 01 jaguatirica, 01 raposinha (*Cedocyon thous*), 01 gato-do- mato (*Leopardus tigrinus*) e 01 cervo em São Paulo, no período de 1971 a 1978. Ainda, em 1979 a 1982 ocorreram casos de raiva em 15 macacos, 01 guaxinim (*Procyon*

carnivorus), 01 capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), 01 onça pintada (*Panthera onca*), 07 raposinhas (*Cerdocyon thous*), 01 quati (*Nasua nasua*), 01 cervo (*Mazama americana*) e 01 lontra (*Lontra longicaudis*)[4].

No município de Matão, Estado de São Paulo, capturou-se em uma área selvática , uma cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) que veio à óbito após 48 horas. Após o resultado positivo, a variante do vírus rábico identificada nesta amostra foi comparada com outras isoladas no Brasil e mostrou-se antigenicamente homóloga a uma variante de morcego hematófago, a qual já havia sido encontrada anteriormente no Brasil, em um morcego e um gato (FAVORETTO et al., 2002). Este trabalho foi o primeiro a isolar esta variante de um animal silvestre terrestre em nosso país e sugere que no ambiente silvestre há uma interação entre as espécies, permitindo a circulação do vírus rábico entre mamíferos aéreos e terrestres.

Gomes (2004), analisou animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, localizado no Nordeste do Brasil e de um total de 581 amostras, 50 (8,6%) foram positivas à IFD, sendo que destas, 47 (8,09%) se confirmaram à ICC. Isolou-se vírus de raposas (*Dusicyon vetulus*), morcegos não hematófagos, bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e cães. Realizou-se tipificação antigência e genética das amostras concluindo-se que a epidemiologia da raiva nesta região é complexa, visto que existem variantes distintas mantidas por cães domésticos, raposas, morcegos insetívoros e morcegos hematófagos.

No município de São Paulo, no período de 1994 a1997, realizou-se um estudo da prevalência de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva em soro de animais silvestres de diferentes espécies. Um total de 547 soros foram examinados, sendo que marsupiais representaram 45% das amostras, primatas não-humanos

[4] No texto original não constavam todos os nomes científicos dos animais citados.

37%, carnívoros 6%, roedores 6%, cervos 3% e edentados 2%. Todas as espécimes foram entregues ao Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, devido à invasão domiciliar, histórico de agressão a humanos ou após captura por autoridades policiais por conta do comércio ilegal. A prevalência de anticorpos neutralizantes foi maior nos primatas capturados em residências, sugerindo vacinação. A maior prevalência nos marsupiais ocorreu entre os nativos, sugerindo uma infecção natural. O pequeno número de edentados, roedores, cervos e carnívoros neste estudo não permitiu nenhuma inferência sobre os resultados, porém, segundo os autores, sugeriu-se que o vírus rábico esteja circulando entre estas espécies (ALMEIDA et al., 2001).

Entre o período de 1981 e 1998, 28 casos de raiva humana transmitidos por animais silvestres foram reportados no Brasil, sendo que 2,5% dos casos foram transmitidos por primatas, guaxinins e raposas (MORAIS et al., 2000).

O Estado do Ceará apresenta o maior percentual de casos de raiva humana originados de silvestres. A principal espécie transmissora é o sagüi (*Callithrix jacchus*), muito bem adaptado à vegetação da costa. Em 1998, ocorreram dois casos de raiva em humanos causados por esta espécie (MORAIS et al., 2000). A variante do vírus rábico isolada destes animais mostrou-se diferente de todas as variantes já identificadas anteriormente (FAVORETTO et al., 2002). Além dos sagüis, foram isolados casos de raiva em raposas na região da Serra de Ibiapaba (CORRÊA; PASSOS, 2001).

Apesar do morcego hematófago ser um reservatório para a raiva na América do Sul, poucos casos de raiva humana transmitida por morcegos tem sido reportados nesta região. No ano de 2004, entre os meses de março e maio, o laboratório de raiva do Instituto Evandro Chagas confirmou a ocorrência de duas

epidemias de raiva humana causada por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) no estado do Pará, sendo uma na cidade de Portel, ilha de Marajó, com 16 mortes, e outra na cidade de Viseu, localizada na região nordeste do estado, com 6 mortes (TRAVASSOS DA ROSA, 2004). Devido a estas epidemias, o morcego, em 2004, foi o principal transmissor da raiva para humanos, como mencionado anteriormente (OPAS, 2004).

O modo mais comum de transmissão é a mordedura (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002), tendo como veículo a saliva. Como a infecção por um lyssavírus geralmente leva o hospedeiro à morte, a propagação a um outro suscetível ocorre efetivamente durante um curto período de excreção do vírus (3 a 10 dias) durante o estágio final da doença. A excreção do vírus por várias semanas antes do aparecimento de sinais clínicos não é usual (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). Segundo Gardner e King (1991), o vírus garante sua própria sobrevivência causando aflição no hospedeiro quando este apresenta-se próximo da morte, para que o mesmo encontre outro hospedeiro e vítima.

Existem relatos na literatura sobre transmissões por via aerógena. Em uma caverna no Texas (Frio Cave), habitada por milhões de morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis*, dois cientistas foram infectados pelo vírus da raiva, sem receberem mordidas. Nesta mesma caverna coiotes e lobos foram colocados em jaulas a prova de morcegos ou artrópodes, comprovando-se a transmissão por via aerógena, provavelmente em conseqüência de aerossóis formados pela saliva e urina daqueles morcegos insetívoros. Outro caso ocorreu em um laboratório onde a vítima preparava vacinas concentradas (ACHA; SZYFRES, 2003).

A transmissão entre humanos não tem sido relatada atualmente, exceto os casos de transplante de córnea ocorridos nos Estados Unidos e na França (ACHA; SZYFRES, 2003; KING, 1998). Recentemente, nos Estados Unidos, o diagnóstico de raiva foi confirmado em três pacientes que haviam recebido os órgãos (fígado e rins) de um doador com raiva (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2004). Em todos os casos não houve suspeita da doença no doador.

De acordo com Acha e Szyfres (2003), experimentalmente têm sido possível a infecção de animais por via digestiva e se comprovou a infecção por canibalismo de ratas que se alimentaram de lactentes inoculados com o vírus. Shirakawa (2003) realizou um estudo experimental com gatos (*Felis catus*), alimentando-os oralmente com cérebros de camundongos previamente inoculados. Após o período de observação, os animais foram submetidos à eutanásia, coletando-se o cérebro, coração, pulmões e rins. Nas provas de IFD e inoculação em camundongos, todos os animais foram negativos. À prova de RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase – trancriptase reversa), houve positividade principalmente nos rins, seguido de pulmões, coração e cérebro. Concluiu-se que os gatos são resistentes à raiva pela via oral e que, apesar de não se saber o real significado dos achados na prova de RT-PCR, talvez os animais tenham sido sacrificados antes da manifestação do pródromo da doença.

Tradicionalmente, o ciclo de transmissão da raiva pode ser dividido em dois: urbano e silvestre (ACHA; SZYFRES, 2003). Entretanto, segundo Rupprecht, Stöhr e Meredith (2001), essa descrição muito simplificada do ciclo silvestre e urbano não permite comunicar a real dinâmica da doença.

2.4 PATOGENIA

Como mencionado anteriormente, o principal modo de transmissão é a mordedura, na qual o vírus presente na saliva do animal, é inoculado, através da pele, no músculo e em tecidos subcutâneos (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004). Existe uma grande variação no período de incubação da doença tanto em humanos quanto em animais, geralmente variando entre 20 a 90 dias (JACKSON, 2003a), existindo relatos de períodos maiores que um ano. Smith et al. (1991), por exemplo, investigaram três pacientes, imigrantes nos Estados Unidos, que morreram de raiva sem histórico de exposição a qualquer fonte de infecção. Concluiu-se que a infecção não poderia ter ocorrido naquele país, mas sim nos países de origem de cada um dos imigrantes, sugerindo então que tratavam-se longos períodos de incubação (11 meses, 4 anos e 6 anos). Esta variabilidade pode ser justificada pela proximidade da mordida em relação ao SNC, variação da inervação do local, pela severidade da lesão, pela quantidade de vírus inoculado e por fatores do próprio hospedeiro (JACKSON, 2003b).

Charlton et al. (1997), realizaram uma pesquisa utilizando gambás (*Mephitis mephitis*), que foram inoculados com vírus rábico isolado de glândulas salivares de um outro um gambá proveniente do Canadá, por via intramuscular em uma dosagem baixa. Após dois meses da inoculação, os animais foram sacrificados e os tecidos coletados foram examinados pelo método de RT-PCR e pela imunohistoquímica. O método de RT-PCR mostrou que o RNA genômico viral estava frequentemente presente nos músculos onde ocorreu a inoculação, mas não foi encontrado nem na gânglio espinal nem na medula espinal, que seriam tecidos utilizados na rota do vírus. Com relação à imunohistoquímica, mostraram evidência de uma infecção das

fibras musculares extrafusais e fibrócitos ocasionais no local da inoculação. Este estudo demonstra o retardamento do movimento do vírus que parece ocorrer no local da inoculação nos períodos longos de incubação e embora ainda não esteja esclarecida, a infecção das fibras musculares pode ser um passo importante na patogenia da raiva.

Em um estudo realizado por Shankar, Dietzschold e Koprowski (1991), demonstrou-se também, sob condições experimentais, a possibilidade do vírus entrar no sistema nervoso periférico sem que ocorra uma replicação em células extraneurais do local da inoculação. Segundo Jackson (2003a), este mecanismo deve raramente ocorrer em condições naturais.

O vírus pode invadir nervos periféricos provavelmente ligando-se a receptores da acetilcholina nicotínica da junção neuromuscular (LENTZ et al., 1981). Lewis, Fu e Lentz (2000) pesquisaram a entrada do vírus nos neurônios, concluindo que a junção neuromuscular é o principal local de entrada. Existem ainda dois receptores na membrana neuronal em que o vírus pode se ligar: a molécula de adesão da célula neuronal (THOULOUZE et al., 1998) e o receptor de neurotropina p75 (TUFFEREAU et al., 1998). Além disso, os receptores de N-metil-D-aspartato subtipo R1 e do GABA, que são neurotransmissores do sistema nervoso central, são também possíveis receptores do vírus da raiva (GOSZTONYI; LUDWIG, 2001).

O vírus, após ganhar o acesso aos nervos periféricos, caminha na direção retrógrada dentro do axoplasma (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004) e devido a este movimento ser estritamente retrógrado, o vírus têm sido utilizado em alguns experimentos para traçar o caminho dos neurônios (TANG et al., 1999). Quando o atinge o SNC, uma replicação intensa acontece nas membranas dentro dos neurônios e a transmissão ocorre de célula para célula atravessando as junções

sinápticas (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004). A glicoproteína, presente na superfície externa do envelope viral, tem uma participação muito importante na dispersão trans-sináptica do vírus entre os neurônios (ETESSAMI et al., 2000).

Os sintomas de encefalite e mesmo a morte podem ocorrer com poucas alterações histopatológicas, suportando a idéia que a difunção neuronal, mais do que a morte celular, deve desempenhar um importante papel na produção da doença (JACKSON, 2003a ; WARRELL, M.; WARRELL D., 2004). A dispersão centrífuga do vírus, do SNC aos nervos somáticos e autonômicos, leva ao depósito do vírus em muitos tecidos, incluíndo músculos esqueléticos e cardíacos, glândulas adrenais, pulmões, retina, córnea, ovário, útero, fígado, baço, pâncreas e nervos ao redor de folículos caplilares e em morcegos, na gordura marrom interescapular (SCHNEIDER, 1991; WARRELL, M.; WARREL D., 2004).

A raiva é uma doença geralmente considerada fatal, porém reconhece-se a possibilidade de animais eventualmente se recuperarem. A questão é se existem animais que sejam “portadores sãos”: eliminam o vírus pela saliva mas permanecem saudáveis. Em um estudo recente, hienas (*Crocuta crocuta*) foram monitoradas durante 9 a 13 anos e com base nos títulos de anticorpos neutralizantes, 37% dos animais estudados foram soropositivos e avaliações posteriores revelaram que alguns se tornaram soronegativos. Destes os soropositivos, embora não tenha sido isolado vírus da saliva de nenhum animal, foi possível demonstrar a presença de RNA viral na saliva pelo método de RT-PCR em 45,5%. Contudo, durante este período de estudo, sinais clínicos da raiva nunca foram observados (EAST et al., 2001). Estes achados, segundo Jackson (2003a), indicam uma exceção a um antigo dogma e no futuro talvez possamos aprender que sob algumas circunstâncias, a situação seja semelhante em morcegos e outras espécies.

2.5 DIAGNÓSTICO

Sempre que possível, uma suspeita clínica de raiva deve ser confirmada por testes laboratoriais (KING, 1998). Os resultados laboratoriais influenciam tanto na decisão de se proceder ou não com um tratamento, como na decisão de se instituir medidas para o controle de uma epizootia em uma comunidade. Além disso, permitem assegurar a eficácia e a segurança de produtos biológicos usados nos tratamentos de prevenção em humanos e animais (MESLIN; KAPLAN, 1996).

O teste de imunofluorescência direta, descrita por Goldwasser e Kissling (1958) e modificado por Dean, Albelseth e Atanasiu (1996), ainda permanece como o padrão ouro para o diagnóstico de raiva e consiste no exame microscópico, sob luz ultravioleta, de impressões de tecidos em lâminas após tratamento com de anticorpos anti-rábicos conjugados com isotiocianato de fluoresceína. É uma prova rápida, muito sensível e específica. Outra vantagem é que pode se aplicar em pacientes ainda com vida, utilizando-se de impressões das córneas, rapados da mucosa lingual, biópsia de pele, incluindo folículos capilares da nuca e do local da ferida. No diagnóstico *post mortem*, o principal tecido analisado é o cérebro, sendo que quando o resultado desta prova é positiva, confirma-se o diagnóstico, porém, quando negativa, não se pode excluir a possibilidade da infecção (ACHA; SZYFRES, 2003; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002). Recomenda-se que a IFD seja realizada paralelamente com a prova de inoculação intracerebral em camundongos, método descrito por Koprowisk (1996) pelo qual o vírus é isolado e os sintomas da doença são reproduzidos nestes animais. Por outro lado, alguns laboratórios utilizam-se do cultivo de células, ao invés de animais, para se fazer o isolamento (BERAN, 1994). Os métodos de isolamento podem ser úteis também no

diagnóstico *ante mortem* em humanos, utilizando-se saliva ou *swabs* de garganta e olhos (KING, 1998; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

A pesquisa microscópica dos corpúsculos de Negri por exame histopatológico com coloração direta, como no método de Sellers, é um procedimento simples, rápido e econômico, porém é um método menos sensível (ACHA; SZYFRES, 2003). A freqüência da ocorrência destes corpúsculos, tamanho e formato podem ser influenciados pela espécie do hospedeiro, pela cepa do vírus e pela fase clínica da doença (KING, 1988). Este exame, quando utilizado isoladamente, pode produzir resultados falsos-negativos, pois nem todos os casos apresentam desenvolvimento de inclusões, ou resultados falsos-positivos devido a corpúsculos de inclusões não específicos (NIETFELD et al., 1989).

Os anticorpos monoclonais contra o vírus rábico foram produzidos pela primeira vez por Wiktor e Koprowisk (1978) e atuam na glicoproteína ou no nucleocapsídeo viral. Com esta técnica foi possível caracterizar e classificar o vírus rábico e os vírus relacionados, além de permitir a diferenciação de vírus isolados de hospedeiros terrestres e de morcegos nos Estado Unidos, na Europa, África, Ásia e na América Latina. Embora ela seja usada principalmente em investigações epidemiológicas, tem se mostrado útil no diagnóstico em certas circunstâncias, como nos casos de raiva humana “importada” e de casos sem histórico de exposição (MESLIN; KAPLAN, 1996; SMITH et al., 1991)

As provas sorológicas são aplicadas para se conhecer a resposta imunológica de pessoas ou animais vacinados, as evidências de infecções não fatais e também em experimentos que envolvem a patogenia. Utilizam-se freqüentemente os ensaios enzimáticos (ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (BERAN, 1994) e os testes de soro-neutralização em cultivos celulares como o teste de

inibição rápida de focos fluorescentes (RFFIT – “Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test”) (SMITH; PAMELA; GEORGE, 1973) e o teste fluorescente de vírus neutralização (FAVN – “Fluorescent Antibody Virus Neutralisation Test”)(CLIQUET; AUBERT; SAGNÈ, 1998).

As técnicas moleculares modernas, como o RT-PCR, podem detectar o ácido nucléico dos lyssavírus. A alta sensibilidade da técnica aumenta também o risco de falsos-positivos devido a contaminação laboratorial ou erro técnico, e de falsos-negativos, caso os primers não possuam homologia suficiente para todas as variantes presentes na região. Além do mais, ela é mais demorada quando comparada a outros testes, o custo do equipamento é alto e há necessidade de manutenção da técnica. Recomenda-se, portanto, que não se utilize estas técnicas para diagnóstico de rotina, podendo ser usado como um teste confirmatório (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002; WHO, 1995).

2.6 PREVENÇÃO E CONTROLE

A prevenção da raiva humana é um grande desafio na saúde pública em muitos países do mundo (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001) e devido a sua fatalidade, a profilaxia pós-exposição é extremamente importante (WHO, 1992). Nos países menos desenvolvidos, onde a maior parte dos casos de raiva humana acontece devido à raiva canina, as mortes ocorrem principalmente pela falta de acesso a agentes biológicos adequados e necessários para um tratamento profilático conveniente. Em países mais desenvolvidos, ainda que muitos já tenham controlado a raiva em animais domésticos, a doença continua sendo um risco para a população. Os imunobilógicos são acessíveis e as poucas mortes humanas

ocorrem principalmente pela ignorância ou pelo não reconhecimento da exposição, sendo de grande importância tanto a educação do público quanto dos profissionais da área de saúde (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH,2001).

Em qualquer tipo de lesão conseqüente de uma exposição, é importante que se faça uma lavagem imediata e vigorosa com água e sabão no local da ferida, associando-se o álcool iodado, por exemplo, com o objetivo de diminuir a carga viral local (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004; WHO, 1992). Deve-se evitar a sutura, mas se for necessária, recomenda-se a infiltração de imunoglobulina ao redor da ferida, além da administração da vacina anti-rábica (WHO, 1992). O sucesso do tratamento pós-exposição depende ainda da resposta imune do indivíduo e da suscetibilidade do vírus à imunidade induzida pela vacina (WARRELL, M.; WARRELL D., 2004).

O tratamento pré-exposição é uma medida apropriada para grupos de alto risco de contato com o vírus rábico, como biólogos, veterinários, pesquisadores, técnicos em laboratórios de diagnóstico, produção de vacina, espeleólogos, entre outros (WHO, 1992).

Alguns países declarados livres da raiva, mantém um controle na importação de animais, incluindo a quarentena, que tem como objetivo prevenir a introdução da doença, resguardando um animal por um período de tempo suficiente para que, caso esteja incubando o vírus, venha a desenvolver sinais clínicos evidentes (KING, 1998).

Devido à diversidade de reservatórios para este vírus, que acomete tanto animais domésticos quanto silvestres, o controle da raiva animal também é um grande desafio (ZHEN FANG FU, 1997) e a sua erradicação, questionável

(MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001). Com relação à raiva urbana, o principal reservatório é o cão e o controle consiste basicamente em vacinação anual dos animais de estimação, medidas de controle de animais errantes e eliminação de cães e gatos que tenham sido agredidos por animais raivosos (ACHA; SZYFRES, 2003). Já em relação à raiva silvestre, no passado, houveram várias tentativas de controle, incluindo destruição do habitat, caçadas com armas, armadilhas, distribuição de veneno, entre outros métodos. Porém, todos este métodos levantaram sérias discussões econômicas, éticas, ecológicas e questões sobre a eficácia dos mesmos. Nos últimos anos, tem-se administrado vacinas orais em iscas e até o momento, a Europa e a América do Norte mostraram resultados positivos no controle da raiva em carnívoros terrestres de vida livre, como coiotes e o guaxinins (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

O controle da raiva transmitida por morcegos hematófagos é de especial interesse na América Latina e na América Central, onde estas espécies ocorrem. Deve-se ressaltar que em algumas áreas, além de se adotar medidas de redução da população de morcegos hematófagos, os herbívoros devem ser compulsoriamente vacinados. O controle populacional dos hematófagos baseia-se principalmente na utilização de uma pasta contendo anticoagulante na sua formulação. Passa-se a pasta no dorso dos quirópteros, cujo hábito de se lamberem, tem como conseqüência muitas mortes na colônia. Recomenda-se que se retorne ao abrigo para a retirada dos morcegos mortos pois existe a possibilidade de que estes constituam um perigo para animais de outras espécies, caso venham a ingeri-los (ACHA; SZYFRES, 2003; KING, 1998). Os morcegos não-hematófagos, dos quais algumas espécies apresentam-se em perigo de extinção, possuem importantes funções de polinização, dispersão de sementes e predação de insetos,

principalmente em regiões tropicais. Deve-se evitar a presença destes animais nas habitações de humanos (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descrições da área de estudo, dos animais utilizados, dos métodos de captura, dos procedimentos para coleta dos encéfalos e do diagnóstico laboratorial que baseou-se em dois métodos: o teste de imunofluorescência direta e o teste de inculação intracerebral em camundongos.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado em parceria com um grupo de pesquisadores pertencentes a uma organização não-governamental (ONG), Sociedade Fritz Müller de Ciências Naturais, Curitiba, Paraná, contratados pela Juris Ambientis Consultores Ltda., para realizar um "Programa básico ambiental de monitoramento de fauna", cujo objetivo era pesquisar o impacto ambiental, causado por uma obra de aterramento de um vale para construção de uma fábrica, em uma reserva natural particular na propriedade pertencente à Companhia Brasileira de Equipamentos, localizado na Rodovia João Ferreira dos Santos Filho, no município de Ribeirão Grande, São Paulo. A parceria se deu especificamente com o grupo responsável pela pesquisa de mamíferos[1], coordenado pela bióloga Juliana Quadros. Na figura 1, observa-se a reserva natural particular de 150,7 ha, constituída por mata secundária, e à frente, a área de aterro. A reserva é cortada por três córregos (Fernandes, Barracão e Água Limpa), os quais foram utilizados como

[1] Neste "Programa básico ambiental de monitoramento de fauna", além do grupo responsável pela pesquisa em mamíferos, existem os grupos de répteis, anfíbios e aves.

referência para a colocação das armadilhas, desaguando no Rio das Almas, agora, por meio de uma canaleta artificial.

Ribeirão Grande é um município da região de Itapetininga que possui uma população de 7.828 habitantes e uma área total de 332 km² e localiza-se em uma região considerada endêmica para a raiva bovina (CEDESA; CDA, 2000). Segundo dados da Coordenação do Programa de Raiva do Estado de São Paulo fornecidos pelo Instituto Pasteur, Ribeirão Grande e municípios da região indicados na figura 2 (Apiaí, Buri, Capão Bonito, Eldorado, Guarapiara, Iporanga, Itapetininga, Itapeva, Ribeirão Branco, São Miguel Arcanjo, Sete Barras, Taquarivaí), tiveram vários casos de raiva notificados principalmente nos anos de 1994 e 1995 e especialmente em bovinos (Quadro 1). Em 1994, de 41 casos positivos para a raiva bovina, 34 ocorreram em Capão Bonito, município vizinho de Ribeirão Grande, onde apenas um caso foi registrado. Foi também em Capão Bonito que, neste mesmo ano, isolou-se o vírus rábico de um quiróptero. Em 1995, somente neste município, ocorreram 22 casos e em Eldorado, também adjacente a Ribeirão Grande, 9 casos. Nos anos seguintes a raiva foi controlada e o número de casos positivos sofreu uma redução significante (Quadro 1), sendo que em 1998 e 1999, não houve notificação em espécie alguma. No ano de 2000 houve um recrudecimento do número de casos, sendo que em 2003 mais espécies foram diagnosticadas positivas além da bovina, incluindo um quiróptero no município de Apiaí e um eqüino, em Itapeva. Durante estes 10 anos considerados (1994-2003), não houve notificação nas espécies canina e felina nos municípios da região.

Ano	ESPÉCIE ANIMAL								
	Bovinos			Quirópteros			Outras		
	P [2]	T[3]	%	P	T	%	P	T	%
1994	41	70	58,6	1	11	9,1	5	18	27,8
1995	39	65	60,0	0	2	0,0	6	16	37,5
1996	8	26	30,8	0	1	0,0	2	8	25,0
1997	1	7	14,3	0	1	0,0	0	1	0,0
1998	0	5	0,0	0	5	0,0	0	1	0,0
1999	0	7	0,0	0	19	0,0	0	3	0,0
2000	1	8	12,5	0	15	0,0	0	4	0,0
2001	4	17	23,5	0	10	0,0	0	3	0,0
2002	7	16	43,8	0	40	0,0	0	1	0,0
2003	2	11	18,2	1	4	25	1	7	14,3
Total	103	232	44,4	2	108	1,9	14	62	22,6

[1]Municípios considerados: Ribeirão Grande, Apiaí, Buri, Capão Bonito, Eldorado, Guapiara, Iporanga, Itapetininga, Itapeva, Ribeirão Branco, São Miguel Arcanjo, Sete Barras, Taquarivaí
[2]P: amostras positivas
[3]T: total de amostras analisadas.
Fonte: Instituto Pasteur, São Paulo, 2004. Dados sujeitos a alteração posteriori.

Quadro 1 – Diagnóstico de raiva segundo o ano e a espécie animal avaliada durante o período de 1994 a 2003, em diferentes municípios[1] próximos à Ribeirão Grande-SP

3.2 OS ANIMAIS

Os animais escolhidos para o estudo pertenciam às ordens Chiroptera, Rodentia e Marsupialia, sendo de diferentes idades e sexos. Os principais motivos que levaram os pesquisadores a optarem por estes espécimes, em particular, foram a maior facilidade de captura e o custo, visto que este monitoramento durará sete anos. Na primeira fase do projeto realizado na CBE, os animais capturados deveriam ser eutanasiados para posterior procedimento de identificação com o objetivo de se obter o conhecimento das espécies que ali habitam (número do processo no IBAMA 02001.002555/02-38). Na fase seguinte do projeto, a maioria dos animais recebeu uma marcação com anilhas e brincos metálicos numerados, sendo posteriormente soltos.

3.3 CAPTURA

Para a captura de marsupiais e roedores, foram montadas armadilhas no solo e sobre as árvores (Figuras 3 e 4), utilizando-se mortadela, bacon, farinha de milho ou de fubá e banana como iscas, sendo espalhadas pela mata usando os córregos como referencial. As armadilhas de queda com baldes de 20 litros enterrados no chão ("pitfall" – Figura 5), utilizadas especialmente pelas equipes da herpetofauna e da anurofauna, também serviram para a captura de alguns pequenos mamíferos. Todas as armadilhas eram revisadas matinalmente.

Os pesquisadores observaram que após a construção da canaleta artificial, devido ao aterramento, muitos animais caíam e não conseguiam voltar à terra, vindo à obito por afogamento. Desta forma, construíram obstáculos com grades metálicas

(Figura 6) para resgatarem os animais e assim, obterem uma estimativa dos animais que morrem desta forma. Alguns mamíferos utilizados em nosso estudo, foram coletados neste local.

Para a captura de morcegos foram utilizadas redes de neblina que eram armadas em corredores de estrada, sendo mantidas abertas durante 3 horas após o crepúsculo.

Após a captura, os animais eram levados a um laboratório improvisado, onde eram eutanasiados com éter sulfúrico e em seguida, submetidos à sexagem, biometria, coleta de fezes e conteúdo gastrointestinal e coleta de ectoparasitos. Posteriormente, eram devidamente identificados e levados ao freezer (-20%) para congelamento.

3.4 COLETA DO ENCÉFALO

Todos os animais foram transportados congelados e levados ao Museu de História Natural Capão de Imbuia, localizado no município de Curitiba, Paraná, onde realizou-se a coleta dos encéfalos durante o processo de taxidermização. O encéfalo de cada animal foi retirado cuidadosamente com uma pipeta plástica descartável do tipo Pasteur através do forame magno, preservando-se a integridade do osso craniano (Figuras 7 e 8). Esse procedimento foi de extrema importância uma vez que as medidas cranianas são úteis para a identificação da espécie de alguns animais.

As pipetas eram identificadas, embrulhadas em papel alumínio também identificado, mantidas em freezer (-20°C) e transportadas para o laboratório de diagnóstico de raiva da UNESP de Araçatuba, em isopor com gelo seco para evitar o

descongelamento das amostras. No laboratório foram conservadas em freezer comum até a realização do diagnóstico. O período de captura e envio das amostras do presente estudo foi de outubro de 2002 a outubro de 2004, tendo sido submetidos ao diagnóstico de raiva um total de 104 amostras.

3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Utilizaram-se dois testes para realizar o diagnóstico laboratorial: o teste de imunofluorescência direta e o teste de inoculação intracerebral em camundongos.

3.5.1 Imunofluorescência direta

Utilizou-se a técnica padrão para detecção do antígeno rábico padronizada por Dean et al. (1996), com conjugado anti-nucleocapsídeo Chemicom® (Rabies DFA Reagent – USA), na diluição de 1:30. Lâminas com impressões dos cérebros foram preparadas e fixadas em acetona por, no mínimo, 15 minutos. Para a coloração com o conjugado, incubavam-se as lâminas por 30 minutos em câmara úmida, em estufa a 37°C , lavando-as posteriormente por imersão em solução salina fosfatada (PBS) durante 10 minutos e, em seguida, três vezes em água destilada. Após secagem ao ambiente, as lâminas eram montadas com glicerina tamponada e lamínula, e observadas em microscópio de imunofluorescência Olympus® com sistema de epi-iluminação.

3.5.2 Inoculação intracerebral em camundongos

A prova biológica preconizada por Koprowski (1996) foi empregada, utilizando-se os fragmentos de encéfalos coletados em pipetas plásticas do tipo Pasteur, triturados em gral estéril e suspendidos aproximadamente a 20%, em meio de cultura contendo água destilada, soro normal de eqüino e antibióticos. Inoculou-se 0,03 ml de cada suspensão, por via intra-cerebral, em camundongos albinos suíços, separados em grupos de 8, entre 21 e 25 dias de vida e peso entre 11 a 15g, provenientes do Biotério Central da UNESP de Botucatu e do Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba. Os camundongos foram acondicionados em caixas plásticas de 22x30cm, com tampa metálica, alimentados com ração e água e mantidos em ambiente com ar condicionado à temperatura de 23ºC. Durante 30 dias foram feitas observações diárias dos animais, para a verificação de sintomas típicos da raiva. Os cérebros dos camundongos que vinham à óbito durante o período de observação, eram submetidos novamente ao teste de IFD para confirmação de diagnóstico. Os animais que sobreviveram, após os 30 dias, foram sacrificados com éter etílico.

Figura 1 - Área da propriedade pertencente à Companhia Brasileira de Equipamentos, em Ribeirão Grande, SP. Ao fundo, mata onde foram realizadas as capturas e à frente, área de aterramento

Figura 2 – Mapa do Estado de São Paulo, destacando Ribeirão Grande e municípios considerados

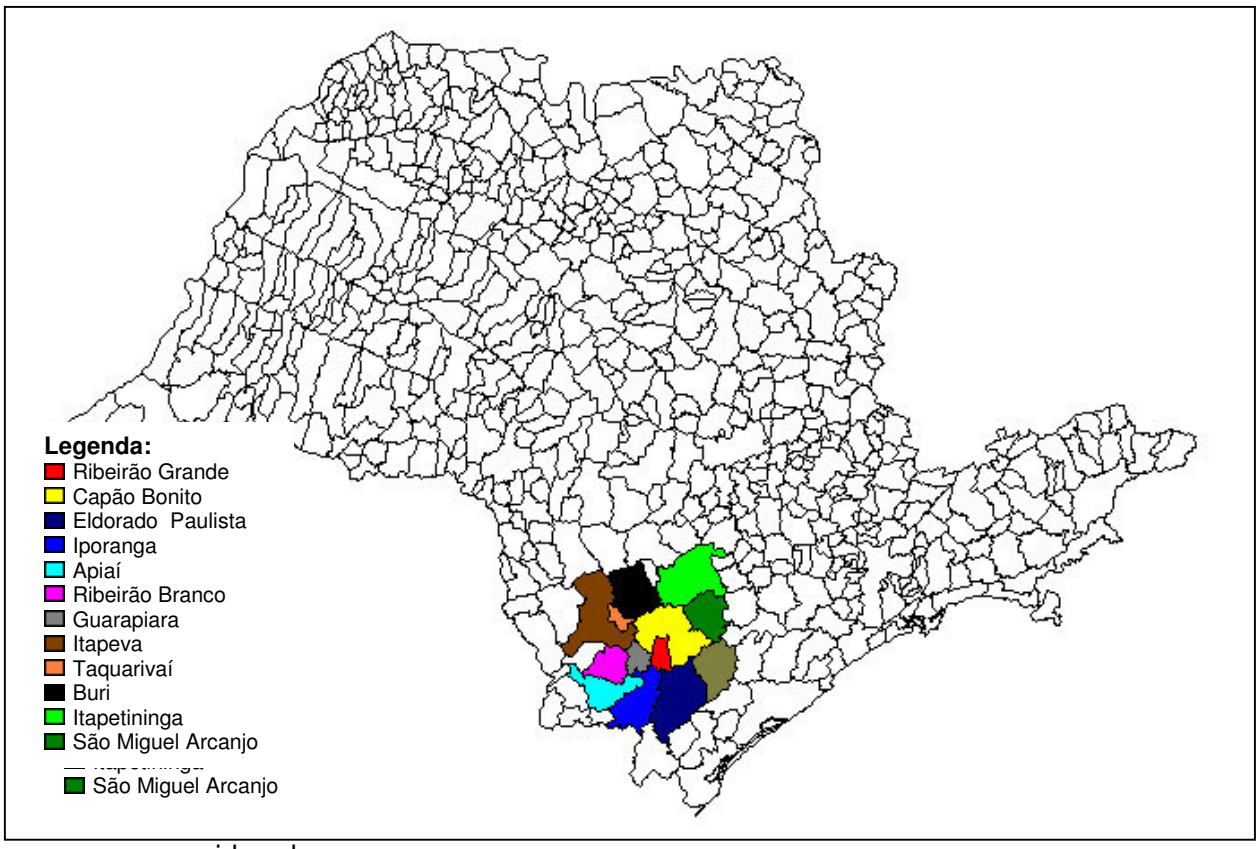

Figura 3 - Armadilha metálica do tipo Sherman montada em solo[2]

Figura 4 - Armadilha metálica de grade montada sobre o galho de uma árvore

[2]As figuras 3 a 6 foram gentilmente cedidas por Juliana Quadros e sua equipe.

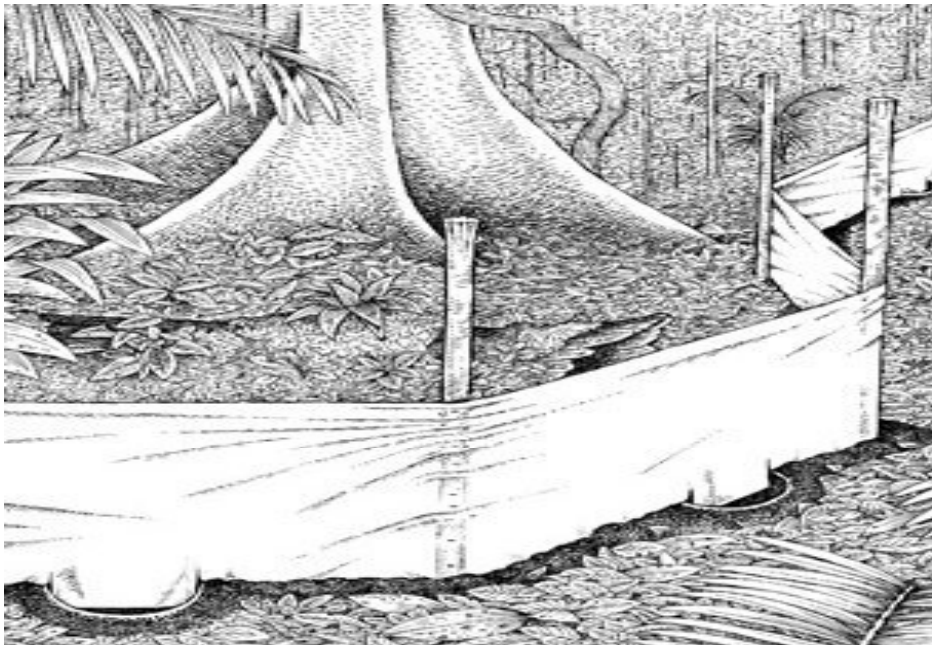

Figura 5 - Armadilha-de-queda com baldes enterrados (“pitfall”)

Figura 6 - Canaleta artificial com obstáculo de tela metálica

Figura 7 - Pipeta plática tipo Pasteur introduzida através do forame magno, preservando-se a integridade craniana

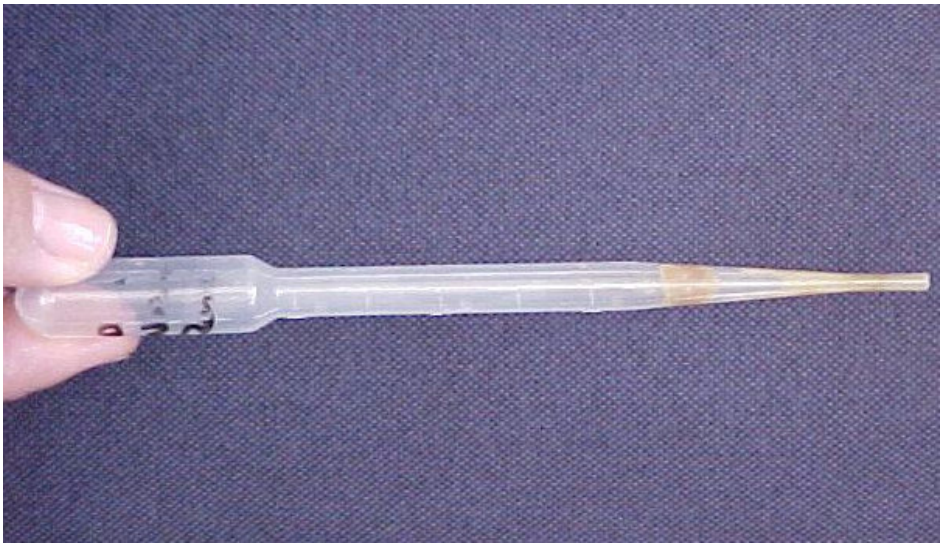

Figura 8 - Pipeta plática do tipo Pasteur com amostra de cérebro após a aspiração

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período compreendido entre outubro de 2002 a outubro de 2004, dos animais capturados na reserva particular em Ribeirão Grande, 104 amostras foram enviadas para o laboratório de diagnóstico de raiva da UNESP de Araçatuba (Quadro 2). Destas, 49 (47,1%) pertenciam à ordem Chiroptera, 48 (46,2%) pertenciam à Rodentia e sete (6,7%) à Marsupialia, abrangendo diferentes gêneros e espécies, idades e sexo, como demonstrado no quadro 2. Todas as amostras recebidas foram submetidas ao diagnóstico de raiva, pela imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos, sendo que nenhuma delas revelou-se positiva.

A amostragem utilizada neste estudo pode ser classificada como não-probabilística e por conveniência (THRUSFIELD, 1995). As principais razões de optarmos por este tipo de amostragem foram o curto espaço de tempo para a realização do estudo e a limitação de recursos. Ao se trabalhar com animais de vida livre, o cálculo do número de amostras se torna um grande desafio, principalmente pelo fato de, na maioria das vezes, não existirem informações sobre o número total de uma dada população e também pela dificuldade de se saber a real prevalência da doença no meio silvestre. Desta forma, utilizando-se da fórmula de cálculo de número de amostras necessárias para a estimação de uma prevalência (THRUSFIELD, 1995), considerando-se uma população infinita, um intervalo de confiança de 95%, considerando-se uma prevalência esperada de 1,8%[1] para morcegos, e uma precisão absoluta desejada de 1%, o total de amostras desta

[1] O valor da prevalência esperada foi baseada na porcentagem de positividade de morcegos obtida pelos dados da Coordenação do Programa de Raiva do Estado de São Paulo fornecidos pelo Instituto Pasteur, dividindo-se o número de animais com diagnóstico positivo pelo número total de amostras enviadas. Apesar de não ser uma prevalência real, extrapolamos os dados para se estimar o número de amostras, pois é praticamente impossível ter o conhecimento da população total, sem prévio estudo, quando se trata de animais silvestres de vida livre.

espécie somente, seria de 679 amostras (Apêndice), valor que está muito acima do total de amostras enviadas.

As amostras de morcegos capturados na reserva particular e enviados ao laboratório foram todas provenientes de espécies não-hematófagas, das famílias Phillostomidae e Vespertilionidae. O diagnóstico positivo para a raiva em morcegos não- hematófagos é freqüente no Brasil, como já citado na revisão de literatura (ALMEIDA et al., 1994; CUNHA et al., 2001; MARTORELLI et al., 1995; MARTORELLI et al., 1996; OPAS, 1999; OPAS, 2002; PASSOS et al., 1998; QUEIROZ DA SILVA et al., 1999; QUEIROZ DA SILVA et al., 2001; RODRIGUES et al., 1975; UIEDA; HARMANI; SILVA,1995). Apesar de não termos obtido resultado positivo, não é possível afirmar que o vírus não esteja circulando nestas espécies nesta reserva particular em questão, uma vez que foram detectados casos positivos de raiva em morcegos na região. Segundo os pesquisadores da Sociedade Fritz Müller de Ciências Naturais, observou-se a presença de *Desmodus rotundus,* porém, infelizmente estes conseguiram fugir da rede de neblina durante a captura.

O município de Ribeirão Grande localiza-se em uma região endêmica para a raiva em herbívoros, e de acordo com dos dados fornecidos pela Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo (Quadro 1), foram registrados no período de 1994 a 2003, no próprio município e em municípios da região, um total de 103 casos de raiva bovina, 09 casos em outras espécies (principalmente eqüinos) e dois casos em morcegos não identificados. Quando foram comparados os números de casos positivos em relação do total de amostras examinadas, observou-se que a porcentagem de positivos foi de 44,4%

Ordem	Família	Gênero e Espécie	Sexo			Idade			Total
			M[1]	F[2]	NI[3]	J[4]	A[5]	NI	
Chiroptera	Phyllostomidae	*Anoura geoffroyi*	0	2	0	0	2	0	2
		Artibeus fimbriatus	1	0	0	0	1	0	1
		Carollia perspicillata	2	0	0	0	2	0	2
		Glossophaga soricina	1	0	1	0	1	1	2
		Sturnira lilium	9	1	0	2	8	0	10
	Vespertilionidae	*Epitesicus* sp.	0	1	0	0	1	0	1
		Myotis rubber	3	6	0	0	9	0	9
		Myotis sp.	9	13	0	0	22	0	22
Marsupialia	Didelphidae	*Marmosops icanus*	0	2	0	0	2	0	2
		Monodelphis americana	1	2	0	1	2	0	3
		Monodelphis rubida	1	0	0	0	1	0	1
		Philander frenata	1	0	0	0	1	0	1
Rodentia	Muridae	*Akodon* sp.	5	3	1	1	8	0	9
		Juliomys pictipes	0	2	0	0	2	0	2
		Nectomys squamines	1	0	0	0	1	0	1
		Oligoryzomys sp.	1	1	0	0	2	0	2
		Oryzomys sp.	14	7	1	1	20	1	22
		Oxymycterus sp.	1	2	0	0	3	0	3
		Não Identificados[6]	4	3	2	2	5	2	9
Total			54	45	5	7	93	4	104

[1] M: macho
[2] F: fêmea
[3] NI: Não informado
[4] J: jovem
[5] A: adulto
[6] Animais identificados somente como sendo da subfamília Sigmodontinae.

Quadro 2 – Animais enviados aos laboratório de diagnóstico de Raiva da Unesp de Araçatuba segundo Ordem, Família, Gênero, Espécie, Sexo e Idade, 2002-2004

para os bovinos; 22,6% em outras espécies e 1,8% em morcegos. Os resultados observados em morcegos nesta região, foram semelhantes aos observados em outras regiões do Estado de São Paulo, como Botucatu (CÔRTES et al. , 1994), Araçatuba (QUEIROZ DA SILVA et al., 2001) e no Noroeste do Estado (CUNHA et al., 2001), mostrando que a taxa de infecção em morcegos está ao redor de1 a 2%.

A diminuição de casos no decorrer dos anos, observada no quadro 1, deve-se provavelmente à vacinação do gado, que é obrigatória em regiões consideradas endêmicas (CEDESA; CDA, 2000). Por outro lado, o recrudescimento de casos a partir do ano de 2000, que ocorreu em Itapeva, Ribeirão Branco, Apiaí e Eldorado, permite afirmar que o vírus permanece em circulação em morcegos hematófagos da região, o que corrobora nossa afirmação anterior.

Foi possível observar também, pelos dados fornecidos pelo Instituto Pasteur, que durante os 10 anos em questão, somente dois casos de morcegos infectados pelo vírus rábico foram notificados, não sendo possível obter informação sobre a espécie dos mesmos. Ao mesmo tempo, observa-se que ocorreu um aumento no número de envio de morcegos para o diagnóstico de raiva. Portanto, como já ressaltado por Rupprecht, Halon e Hemachudha (2002), para que se possa ter um controle efetivo da doença e a detecção de novos casos, é de extrema importância implementação de ações educativas visando uma maior conscientização da população das áreas rurais, bem como dos profissionais que atuam na área de pesquisa em animais silvestres, sobre a importância de envio de amostras para o diagnóstico de raiva.

O diagnóstico positivo para raiva em animais pertencentes às ordens Rodentia é raro (MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, 2001), porém ocasionalmente podem estar envolvidos em exposições a humanos e outras

espécies (WINKLER, 1991). Na literatura existem alguns trabalhos, nos quais vários exemplares de pequenos roedores foram capturados e submetidos à coleta de soro para a pesquisa de anticorpos, e fragmentos de tecido nervoso, para a pesquisa do vírus rábico por IFD e/ou ICC , obtendo-se apenas resultados negativos ou não significativos (BROWN; TINGPALAPONG; ANDREWS, 1979; CELER; MATOUCH; JUNIOR CELER, 1994; KANTAKAMALAKUL et al., 2003; KULONEM; BOLDINA, 1996). Por outro lado, existem estudos que relatam casos de isolamentos do vírus rábico em pequenos roedores. Sodja, Lim e Matouch (1971), capturaram pequenos roedores de duas localidades, sendo uma enzoótica para a raiva e outra onde não haviam casos notificados de raiva por um longo período. Nos primeiros dois anos, 928 animais foram capturados e em 13 foi possível o isolamento de um vírus definidos pelos autores como “rabies-like”, sendo os animais positivos pertencentes às espécies *Microtus arvalis*, *Apodemus flavicollis*, *Mus musculus* e *Clethrionomys glareolus*. Dos 13 positivos, somente dois não pertenciam a área enzoótica. Neste mesmo trabalho realizou-se ainda a pesquisa de anticorpos neutralizantes no soro de 700 animais. Títulos maiores que 1:10 foram demontrados em 22,5% dos soros de animais da área enzoótica e em 12,8% da outra região.

Svrcek et al. (1984), capturaram 283 hamsters (*Cricetus cricetus*) na região leste da Eslováquia, isolando o vírus rábico de cinco animais. Verificaram ainda que a virulência parecia ser reduzida, produzindo a doença com curso fatal em raposas e em gatos, mas sendo apatogênico para lobos cães e coelhos.

Nos Estados Unidos, Fishbein et al. (1986), realizaram um levantamento nos dados da vigilância do Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, no período de 1971 a 1984, constatando que haviam 104 casos registrados de raiva em roedores e lagomorfos, sendo que 80% dos casos foram reportados entre 1980 e

1984. Além disso, dos casos positivos, 64% ocorreram em marmotas (*Marmota monax*), roedores de grande porte, estando a maior parte dos casos associados a epizootias de raiva em guaxinins (*Procyon lotor*) nos estados da região média do Atlântico. Após alguns anos, Childs et al. (1997), realizaram um levantamento dos dados da mesma fonte, entre os anos de 1985 e 1994, constatando 368 casos de raiva em roedores (95% dos casos relatados) e lagomorfos (5%), sendo a marmota novamente a espécie mais acometida (86% dos casos).

Segundo Beran (1994), a razão de ser raro o isolamento do vírus em roedores pequenos, apesar de não esclarecida, talvez seja mais comportamental do que biológica. O pequeno tamanho dos roedores e a possibilidade mínima de sobreviverem aos ferimentos causados durante encontros com animais raivosos, provavelmente contribuem para pequena notificação nestes animais (CHILDS et al., 1997).

Talvez esta mesma hipótese possa ser também aplicada aos gambás, os quais, por outro lado, são considerados menos suscetíveis a raiva que outras espécies de mamíferos (WHO[2], 1973 apud ALMEIDA et al., 2001, p. 397) eresistentes à exposição laboratorial (BERAN, 1994). No trabalho de Almeida et al. (2001), é descrita uma prevalência mais alta de anticorpos neutralizantes em marsupiais nativos, sugerindo uma infecção natural por contato com animais infectados, como os morcegos, que compartilham do mesmo habitat. A pesquisa de anticorpos neutralizantes em soro dos animais capturados na reserva particular em Ribeirão Grande, poderia ter sido um procedimento muito interessante de ser realizado e poderia ter trazido resultados reveladores. Porém, devido a dificuldades operacionais e financeiras, não foi possível realizar a coleta de sangue dos animais.

[2] WHO. Rabies. Informe técnico n. 523, sixth report, WHO, Geneva, Switzerland, 1973. 49 p.

A utilização da pipeta plástica (tipo Pasteur) já foi citada por King (1998), indicando-a para situações onde não há a possibilidade da abertura do crânio. East et al. (2001), utilizaram canudos de plástico ("plastic straw") para a coleta de amostras de cérebros de hienas mortas por carros, leões ou por outros motivos, introduzindo os canudos pelo forame magno. Não existe descrição destes métodos em literatura brasileira, porém a utilização da pipeta plástica demonstrou-se bastante útil para a coleta de cérebro de animais, sem a necessidade da abertura do crânio possibilitando a obtenção de medidas e outras características importantes para a identificação de espécies. Vale ressaltar que neste estudo, observou-se que em pequenos animais, como o morcego, por exemplo, pode existir uma dificuldade maior de se introduzir a pipeta pelo forame magno dependendo do tamanho do animal, além de ocorrer uma perda de material em relação ao método tradicional de coleta de cérebro, em que o crânio é aberto. Esta técnica possibilita uma maior parceria com grupos de pesquisa ambiental que venham a capturar e sacrificar animais para estudo, além de facilitar a coleta de amostras de cérebro de animais mortos por atropelamento em estradas ("road-killed").

A propriedade da CBE é uma área que têm sofrido grandes alterações e interferências com a obra de aterramento. Estas alterações no ambiente podem ter como uma das conseqüências, mudanças comportamentais de alguns animais ou populações, que pode ser uma das causas que levam ao surgimento de zoonoses emergentes (BROWN, 2000). Desta forma o estudo foi relevante, pois, além das espécies enviadas para diagnóstico, animais como cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*), quati (*Nasua nasua*), irara (*Eira barbara*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), entre outros, foram observados pelos pesquisadores na área de abrangência da pesquisa. Nenhum destes animais foi

capturado ou sacrificado para estudo, porém como são considerados suscetíveis ao vírus rábico, estão sujeitos a infecção, caso a raiva venha a se manifestar como uma doença emergente.

Outro ponto importante que não podemos deixar de destacar sobre o presente estudo, foi a parceria com biólogos pois estes possuem um amplo conhecimento em relação à captura e identificação de animais.

5 CONCLUSÕES

Com o presente estudo, podemos concluir que:

1) Apesar de todas as amostras terem apresentado resultados negativos tanto para a IFD quanto à ICC, não é possível afirmar que o vírus não circula naquela propriedade, uma vez que o número de amostras analisadas foi menor que o número de amostras necessárias pelo cálculo da amostragem.
2) Baseado nos dados da Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva do Estado de São Paulo, fornecidos pelo Instituto Pasteur, pode-se afirmar que na região em que se encontra o município de Ribeirão Grande, existe a circulação do vírus rábico em morcegos, principalmente hematófagos, visto que foram notificados casos de raiva em bovinos e em eqüinos nos últimos anos.
3) O método de coleta de amostras de cérebros com a pipeta plástica tipo Pasteur através do forame magno, mostrou-se bastante útil em pequenos animais cujo crânio não pode ser danificado para não prejudicar posterior identificação da espécie.
4) A área onde realizou-se a pesquisa vêm sofrendo grandes alterações, o que pode predispor ao surgimento de zoonoses. Desta forma, sugere-se que a pesquisa do vírus rábico continue sendo realizada e, além disso, devido ao potencial de aparecimento de zoonoses emergentes, outros estudos poderiam ser realizados no local, como por exemplo, a pesquisa de Hantavírus.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Rabia. In: _____ **Zoonosis y Enfermedades Transmissibles Comunes al Hombre y a los Animales**. 3. ed.Whashington: Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 2003. p. 351-383.

ALMEIDA, M. F.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; SILVA, M. M. S. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 5, p. 341-344, 1994.

ALMEIDA, M. F.; MASSAD, E.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; JOPPERT, A. M. S. Neutralizing antirabies antibodies in urban terrestrial wildlife in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 2, p. 394-398, 2001.

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

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two *Lyssavirus* phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268-3276, 2001. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/vol75/issue7/index.shtml>. Acesso em: 20 out. 2004.

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

BROWN, C. Emerging infectious diseases of animals: an overview. In: BROWN, C.; BOLIN, C. (Ed.). **Emerging diseases of animals**. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. p. 1-12.

BROWN, J. L.; TINGPALAPONG, M.; ANDREWS, W.K. Serological survey of feral rodents in Thailand for evidence of rabies virus infection. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 15, n. 4, p. 601-607, 1979.

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

CELER,V.; MATOUCH, O.; JUNIOR CELER, V. The role of small terrestrial mammals in the epidemiology of rabies. **Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie:** casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti J.E. Purkyne, v. 43, n. 3, p. 124-126, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 15 ago. 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Investigation of rabies infections in Organ Donor and Transplant Recipients – Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, n. 26, p. 586-589, 2004. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5326a6.htm>. Acesso em: 20 out. 2004.

CENTRO DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL; COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Comunicado técnico:** raiva dos herbívoros, 2000. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/informe3.htm>. Acesso em: 18 fev. 2005.

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

CHILDS, J. E.; COLBY, L.; KREBS, J. W.; STRINE, T.; FELLER, M.; NOAH, D.; DRENZEK, C.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E. Surveillance and spatiotemporal associations of rabies in rodents and lagomorphs in the United States, 1985-1994. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 1, p. 20-27, 1997.

CLIQUET, F.; AUBERT, M.; SAGNÈ, L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantification of rabies-neutralizing antibody. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 79-87, 1998.

CORRÊA, S. H. R.; PASSOS, E. C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 493-499.

CÔRTES, V. A.; SOUZA, L. C.; UIEDA, W.; FIGUEIREDO, A. C. Abrigos diurnos e infecção rábica em morcegos de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 6, p. 179-186, 1994.

CUNHA, E. M. S.; SILVA, M. M. S.; SOUZA, M. C. C.; SOUZA, M. C. A. M.; CASTRO, A. F.; SCHYMONSKY, B. Bat rabies in Nothwestern São Paulo State from 1997 to 2000. **Virus Reviews and Research**, v. 6, n. 2, p. 177, 2001.

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

EAST, M. L.; HOFER, H.; COX, J. H.; WULLE, U.; WIIK, H.; PITRA, C. Regular exposure to rabies virus and lack ofsymptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15026-15031, 2001. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/vol98/issue26/> . Acesso em: 12 ago. 2004.

ETESSAMI, R.; CONZELMANN, K. K.; FADAI-GOTBI, B.; NATELSON, B.; TSIANG, H.; CECCALDI, P. E. Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2147-2153, 2000. Disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/>. Acesso em: 31 de janeiro de 2005.

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

FISHBEIN, D. B.; BELOTTO, A. J.; PACER, R. E.; SMITH, J. S.; WINKLER, W. G.; JENKINS, S. R.; PORTER, K. M. Rabies in rodents and lagomorphs in the United States, 1971-1984: increased cases in the woodchuck (*Marmota monax*) in mid-Atlantic states. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, n. 2, p. 151-155, 1986.

GARDNER, S.; KING, A. A. Rabies – recent developments in research and human prophylaxis. In: MORGAN-CAPNER, P. (Ed.). **Current Topics in Clinical Virology**. London: Public Health Laboratory Service, 1991. p. 141-163.

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

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

GOSZTONYI, G.; LUDWIG, H. Interactions of viral proteins with neurotransmitter receptors may protect or destroy neurons. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 253, p. 121-144, 2001.

JACKSON, A. C. Rabies virus infection: an update. **Journal of Neurovirology**, v. 9, p 253-258, 2003a. Disponível em:<http://www.jneurovirol.com/reviews.php>. Acesso em: 27 ago. 2004.

JAKCSON, A. C. Rabies Pathogenesis. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2003b. p.17-19.

KANTAKAMALAKUL, W.; SIRITANTIKORN, S.; THONGEHAROEN, P.; SINGEHAI, C.; PUTHAVATHANA, P. Prevalence of rabies virus and Hantaan virus infections in commensal rodents and shrews trapped in Bangkok. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 86, n. 11, p. 1008-1014, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 15 ago. 2004.

KAPLAN, C. Rabies: a worldwide disease. In: BACON, P. J. (Ed.). **Population dynamics of rabies in wildlife**. London: Academic Press Inc., 1985. p. 1-20.

KING, A. A. Rabies. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D. I. H. (Ed.). **Zoonoses**. Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 437-458.

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

KREBS, J. W.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E.; CHILDS, J. E. Rabies surveillance in the United States during 1997. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 12, p. 1713-1728, 1998.

KULONEN, K.; BOLDINA, I. No rabies detected in volves and field mice in a rabies-endemic area. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B.**, v. 43, n. 7, p. 445-447, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 15 ago. 2004.

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

LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G. H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, p. 182-184, 1982.

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

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

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

MATTOS, C. A. de; MATTOS, C. C. de; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields´ virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1245-1274.

MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWISK, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 9-27.

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 variant? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 609-610, 2000.

NIETFELD, J. C.; RAKICH, P. M.; TYLER, D. E.; BAUER, R. W. Rabies-like inclusions in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.1, p. 333-338, 1989.

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

OPAS. **Boletín:** vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, v. 31, 1999. 34 p.

OPAS. **Boletín:** vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, v. 34, 2002. 40 p.

OPAS. **Boletín:** vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, v. 35, 2003. No prelo.

OPAS. **Boletín:** vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, v. 36, 2004. No prelo.

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

PICCINNI, R. S.; GITTI, C. B.; SILVA, S. B.; GUIMARÃES, C. N.; BASTOS, P. V. Presença do vírus rábico em uma colônia de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* no município de Rio Preto, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 106-109, 1996.

QUEIROZ DA SILVA, L. H.; PEDRO, W. A.; PILZ, D.; CARVALHO, C.; PINHEIRO, D. M. Rabies infection in bats in Araçatuba region, São Paulo, Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 6, n. 2, p. 180-181, 2001.

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

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

RUPPRECHT, C. E. Rabies suveillance – problems in gauging the sounds of softly falling trees in poorly visited forests. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. p. 19.

RUPPRECHT, C. E.; DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W. H.; KOPROWSKI, H. Antigenic relationships of Lyssaviruses. In: BAER, G. (Ed.) **The natural history of rabies**. Florida: CRC Press, 1991. p. 69-100.

RUPPRECHT, C. E.; SMITH, J. S.; FEKADU, M.; CHILDS, J. E. The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 4, p. 107-114, 1995.

RUPPRECHT, C. E.; HALON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 327-343, 2002. Disponível em: <http://infection.thelancet.com>. Acesso em: 05 ago. 2004.

RUPPRECHT, C. E.; STÖHR, K.; MEREDITH, C. Rabies. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. (Ed.). **Infectious disease of wild mammals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001.p. 3-36. Disponível em: <http://wildlife.wisc.edu/courses/961/2004/publications/rupprecht%20et%20al%20viral%20prion.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2004.

SCHNEIDER, L. G. Spread of virus from the central nervous system. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2. ed. Florida: CRC Press, 1991. p.133

SHANKAR, V.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior investigation. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2736-2738, 1991. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&action=stream&blobtype=pdf&artid=240640>. Acesso em: 31 jan. 2005

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

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

SMITH, J. S.; FISHBEIN, D. B.; RUPPRECHT, C. E.; CLARK, K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States: a virologic investigation. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, p. 205-211, 1991.

SMITH, J. S.; PAMELA, A. Y.; GEORGE, M. B. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 48, p. 535-541, 1973.

SODJA, I.; LIM, D.; MATOUCH, O. Isolation of rabies-like virus from murine rodents. **Journal of Hygiene Epidemiology, Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 229-230, 1971.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2. ed. Florida: CRC Press, 1991. p. 1-24.

SVCEK, S.; ONDREJKA, R.; MLYNARCIKOVA, K. SVEC, J. Rabies in common hamster (*Cricetus cricetus*) in Slovakia. **Veterinarni Medicina**, v. 29., n. 11, p. 643-52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 15 ago. 2004.

TAKAOKA, N. Y. Alteração no perfil epidemiológico da raiva no estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. p. 23-24

TANG, Y.; RAMPIN, O.; GIULIANO, F.; UGOLINI, G. Spinal and brain circuits to motorneurons of the bulbospongiosus muscle: retrograde transneuronal tracing with rabies virus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 414, p. 167-192, 1999. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jissue/66001761>. Acesso em: 31 jan. 2005.

THOULOUZE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v.72, p. 7181-7190, 1998. Disponível em: <http://jvi.asm.org/> . Acesso em: 20 jan. 2005.

TORDO, N.; BADRANE, H.; CECCALDI, P. E.; REAL, E.; TUFFEREAU, C.; BLONDEL, D.; GAUDIN, Y.; PERRIN, P. Genetic and Functional Diversity of Lyssaviruses. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. p. 11-12

TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; BRANDÃO, P. E., CARRIERI, M. L.; BARBOSA, T. F. S.; MEDEIROS, D. B. A.; CASSEB, L. M. N.; KOTAIT, I.; VASCONCELOS, P. F. C. Laboratorial confirmation of human rabies outbreak transmitted by hematophagous bats (*Desmosdus rotundus*). In: XV REUNIÓN INTERNACIONAL DE RABIA EN LAS AMÉRICAS, 2004. **Anais...** p. 49-50.

TUFFEREAU, C.; BENEJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A. Low-affinity nerve growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. **The EMBO journal**, v. 17, p. 7250-7259, 1998. Disponível em: <http://embojournal.npgjournals.com/cgi/content/full/17/24/7250>. Acesso em: 20 jan. 2005.

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

WARRELL, M. J.; WARRELL, D. A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v. 363, p. 959-969, 2004. Disponível em: <http://www.thelancet.com>. Acesso em: 27 ago. 2004.

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

WHO. **Fact sheets**, n. 99, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/> . Acesso em: 19 ago. 2004.

WHO. WHO expert committee on Rabies, eighth report. **WHO technical report series**, v. 824, p. 1-40, 1992. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/WHO_Expert_Committee_8th_report.pdf>. Acesso em: 08 fev. 2005.

WHO. **WHO workshop on genetic and antigenic molecular epidemiology**. (WHO/Rab. Res/94.46), 13 p., 1995. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/WHO_workshop_genetic_antigenic_molecular_epidemiology_lyssaviruses.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2005.

WHO. **World survey for rabies**, n. 34, 1998. Disponível em: <http://www.who.int/emc-documents/rabies/docs/wsr98/wsr98.pdf>. Acesso em: 27 out. 2004.

WHO. **World survey for rabies**, n. 35, 1999. Disponível em: < http://www.who.int/emc-documents/rabies/whocdscsreph200210.html >. Acesso em: 24 out. 2004.

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

WILKINSON, L. Understanding the nature of Rabies: na historical perspective. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M.(Ed.). **Rabies**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 1-23

WINKLER, W. G. Rodent rabies. In: BAER, G.M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2. ed. Florida: CRC Press, 1991. p. 405-410.

ZHEN FANG FU. Rabies and rabies research: past, present and future. **Vaccine**. v. 15, p. S20-S24, 1997. Supplement.

APÊNDICE - Cálculo de número de amostras para estimativa de prevalência

Considerando-se um intervalo de confiança de 95%:

$$n = \frac{1{,}96^2 \; P_{exp} \, (1 - P_{exp})}{d^2}$$

onde,

n: número de amostras
P*exp*: prevalência esperada
d: precisão absoluta desejada

Considerando-se uma P*exp*=1,8% e um d=1%, teremos:

$$n = \frac{3{,}8416 \times 0{,}018(1-0{,}018)}{(0{,}01)^2}$$

$$n = \frac{3{,}8416 \times 0{,}017676}{0{,}0001}$$

n= 679,041

n= 679 amostras

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo