

**KARIN CORRÊA SCHEFFER**

**Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados  
no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil**

**SÃO PAULO  
2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

KARIN CORRÊA SCHEFFER

**Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no  
Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil**

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 do título de Mestre em Medicina Veterinária

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de Concentração:**

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

**SÃO PAULO**

**2005**

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

8/6/05  
BIBLIOTECA VIRADUE RUFF DIÁPICE  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
E ZOOTECNIA DA USP

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1535 FMVZ	<p>Scheffer, Karin Corrêa Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil / Karin Corrêa Scheffer. – São Paulo : K. C. Scheffer, 2005. 110 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses. Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses. Orientador: Prof. Dr. Fumio Honma Ito.</p> <p>1. Raiva. 2. Morcegos. 3. Isolamento de vírus. 4. Comundongos. 5. Neuroblastoma. 6. Cultura celular. I. Título.</p>
----------------	---




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

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Distribuição do vírus da raiva em diferentes tecidos de diversas espécies de morcegos naturalmente infectados do Sudeste Brasileiro" Protocolo nº 272/2003, utilizando 5.000 camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fumio Honma Ito, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Distribution of rabies virus in different tissues of several species of bats naturally infected from the Southeastern Brazil" protocol number 272/2003, utilizing 5.000 mice, under the responsibility of Prof. Dr. Fumio Honma Ito, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 01 de abril de 2003

  
Prof.ª Dr.ª Julia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SCHEFFER, Karin Corrêa

Título: Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil

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 do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

---

**DEDICATÓRIA**

**Para meu marido Elpidio, pelo seu amor, dedicação, compreensão e ajuda sem fim, em todos os momentos da minha vida, em especial este. Obrigada Querido!**



**Aos meus pais, Carmen e Hermes,  
por sempre acreditarem em mim e  
por serem a base daquilo que sou  
hoje. Amo vocês!**

**Ao Prof. Dr. Fumio, pela paciência  
e confiança depositadas em mim  
para a realização deste trabalho.  
Obrigada!**

---

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, por sempre estar comigo nas horas mais difíceis e por me dar sabedoria para concluir mais uma etapa da minha vida.

Ao Instituto Pasteur de São Paulo em nome da Dra. Neide Yumie Takaoka, pela oportunidade e apoio recebido em todas as etapas deste trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP (FMVZ – USP) através do curso de pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, pela oportunidade oferecida.

À Dra. Ivanete Kotait, gostaria de dizer meu muito obrigada pela ajuda, pelos conselhos e palpites, enfim obrigada por TUDO.

Aos meus amigos, colegas e funcionários do trabalho por me ajudarem em várias etapas do projeto. Em especial a: Maria Luiza, Pedro, Silvana, Andréa, Graciane, Luciana, Zélia, Rosângela, Silvio, Helaine, Willian, Paulo Henrique e Paula, que estiveram ativamente presentes nessa fase da minha vida.

Às pesquisadoras Esther e Juliana, por me ajudarem na técnica de cultivo celular.

Às bibliotecárias Edna e Graça, muito obrigada pela dedicação e presteza com que vocês sempre me receberam.

À todos aqueles que acreditaram e que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

À FAPESP, pelo apoio recebido.

---

**RESUMO**

## RESUMO

SCHEFFER, K. C. **Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.** [Searching of rabies virus in naturally infected bats in the State of São Paulo, Southeastern Brazil]. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Pouco se conhece a respeito da incidência ou prevalência da infecção pelo vírus da raiva em morcegos, ou ainda sobre a distribuição do vírus em tecidos e órgãos não nervosos. Os objetivos deste trabalho foram: i) verificar as espécies de morcegos mais freqüentemente envolvidas com a raiva no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil; ii) estudar a distribuição do vírus da raiva em tecidos e órgãos não nervosos de morcegos; iii) estudar os períodos de mortalidade das amostras de vírus da raiva encontradas nos cérebros e glândulas salivares de morcegos, após inoculação intracerebral em camundongos, e iv) comparação do isolamento do vírus da raiva no sistema camundongo e cultura de células de neuroblastoma (N2A). Entre abril de 2002 a novembro de 2003, 4.393 morcegos capturados de diferentes municípios do Estado de São Paulo foram enviados à Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo. Destes, 82 (1,87%) foram positivos para raiva pela técnica de imunofluorescência aplicada aos materiais do cérebro e 33 morcegos pertenciam ao gênero *Artibeus* sp; 15 *Myotis* sp; 10 *Epitesicus* sp; 5 *Lasiurus* sp; 4 *Nyctinomops* sp; 4 *Tadarida* sp; 3 *Histiotus* sp; 1 *Molossus* sp; 1 *Eumops* sp e 6 vampiros *Desmodus rotundus*. A distribuição do vírus em diferentes órgãos foi examinada pela inoculação de camundongos e células N2A com suspensões a 20% preparadas a partir de fragmentos do cérebro, glândula salivar submandibular, pulmão, língua, coração, bexiga urinária, rins, gordura interescapular, músculo peitoral, trato genital (testículos ou ovários e útero) e estômago. O vírus foi prontamente recuperado de tecidos e órgãos não nervosos com diferentes graus de sensibilidade, tanto em camundongos como em células N2A, e os órgãos mais apropriados para o isolamento viral foram os cérebros e glândulas salivares. Os períodos máximos de mortalidade observados para os vírus presentes nos cérebros usualmente foram mais curtos que os das glândulas salivares, a média do período máximo  $\pm$  desvio padrão calculado para os

cérebros de morcegos hematófagos foi de  $15,33 \pm 2,08$  dias e para as glândulas salivares,  $11,33 \pm 2,30$  dias; para os morcegos insetívoros,  $16,45 \pm 4,48$  dias para os cérebros e para as glândulas salivares,  $18,91 \pm 6,12$  dias; e para os morcegos frugívoros, as suspensões cerebrais apresentaram período máximo médio  $12,60 \pm 2,13$  dias e para as glândulas salivares,  $15,67 \pm 4,82$  dias. O teste de ANOVA indicou existir diferenças significantes entre os períodos de mortalidade correspondentes às suspensões preparadas a partir dos cérebros de morcegos insetívoros (período mínimo) e glândulas salivares de morcegos insetívoros (período máximo) e entre glândulas salivares de morcegos insetívoros (período máximo) e cérebros de morcegos frugívoros (período mínimo), com  $p < 0.001$ . O uso de células N2A para o primo-isolamento do vírus da raiva a partir de tecidos e órgãos não nervosos de morcegos, diferente de cérebros, não mostraram resultados consistentes, especialmente devido à contaminação bacteriana e fator toxicidade.

Palavras-chave: Raiva. Morcegos. Isolamento de vírus. Camundongos. Neuroblastoma. Cultura celular.

---

## **SUMMARY**



## SUMMARY

SCHEFFER, K. C. **Searching of rabies virus in naturally infected bats in the State of São Paulo, Southeastern Brazil.** [Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil]. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Little is known about the incidence of infection or the prevalence rate of rabies in bats, or the distribution of virus in non-nervous tissues and organs. The aim of this work was to study: i) the most frequent species of bats involved with rabies virus infection in the State of São Paulo, Southeast Brazil; ii) the distribution of rabies virus in tissues and non-nervous organs of bats; iii) the mortality periods of virus found in brains and salivary glands of bats after intracerebral inoculation of mice, and iv) comparison of virus isolation in mice and N2A neuroblastoma cell culture. From April 2002 to November 2003, 4,393 bats captured from different municipalities of the State of São Paulo were sent to Rabies Diagnostic Section of the *Instituto Pasteur de São Paulo - SP*. Among these, 82 (1.87%) were found positive by the immunofluorescence technique applied to brain specimens and 33 bats were of the genus *Artibeus* sp; 15 *Myotis* sp; 10 *Eptesicus* sp, 5 *Lasiurus* sp, 4 *Nyctinomops* sp, 4 *Tadarida* sp, 3 *Histiotus* sp; 1 *Molossus* sp, 1 *Eumops* sp, and 6 vampires *Desmodus rotundus*. The distribution of virus in the organs was examined by inoculating mice and N2A cells with the 20% suspensions prepared from brain, submaxillary salivary gland, lungs, tongue, heart, urinary bladder, kidneys, brown fat, pectoral muscle, genital tract (testicles or ovaries and uterus), and stomach. The virus was promptly recovered from tissues and non-nervous organs at different degrees of sensitivity in both mice and N2A cells, and the most appropriate organs for the virus isolation were the brains and salivary glands. The maximum mortality periods found for the brain specimens usually were shorter than the salivary glands, the maximum mean period  $\pm$  standard deviation calculated for the brains taken from the vampire bats was  $15.33 \pm 2.08$  days and for salivary glands,  $11.33 \pm 2.30$  days; for the insectivorous bats the maximum for the brain suspensions was  $16.45 \pm 4.48$  days and for the salivary glands,  $18.91 \pm 6.12$ ; and for the frugivorous bats, the brain suspensions showed the maximum of

12.60 ± 2.13 days and the salivary glands, the mean maximum period of 15.67 ± 4.82 days. The ANOVA test indicated that the most significant differences in the mortality periods were between the suspensions prepared by the brains of insectivorous bats (minimum period) and salivary glands of insectivorous bats (maximum period); salivary glands of insectivorous bats (minimum period) and brains of frugivorous bats (minimum period) with  $p < 0.001$ . The use of N2A cells for the prime isolation of rabies virus from tissues and non-nervous organs other than brains of bats did not show consistent results, especially due to bacterial contamination and toxicity factor.

Key words: Rabies. Bats. Virus isolation. Mouse. Neuroblastoma. Cell culture.

---

## **LISTA DE FIGURAS**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Municípios do Estado de São Paulo que enviaram amostras de morcegos para serem submetidos ao diagnóstico da raiva no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	52
Figura 2 -	Municípios do Estado de São Paulo: procedência de morcegos de diferentes hábitos alimentares, diagnosticados positivos para raiva, pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	53
Figura 3 -	Colheita do cérebro de um morcego insetívoro enviado para o diagnóstico da raiva, Instituto Pasteur de São Paulo - São Paulo - 2005.....	58
Figura 4 -	Identificação do morcego enviado para o diagnóstico da raiva, Instituto Pasteur de São Paulo - São Paulo - 2005.....	58

---

## **LISTA DE GRÁFICOS**

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição de amostras de tecidos e órgãos de morcegos positivos para a prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo – 2005.....	64
Gráfico 2 -	Distribuição dos tecidos e órgãos de morcegos positivos para a prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	66
Gráfico 3 -	Média aritmética dos períodos de mortalidade, mínimos e máximos, correspondente aos camundongos inoculados intracerebralmente com suspensões de cérebros de morcegos de diferentes hábitos alimentares, Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	68
Gráfico 4 -	Média aritmética dos períodos de mortalidade, mínimos e máximos, correspondente aos camundongos inoculados intracerebralmente com suspensões de glândulas salivares de morcegos de diferentes hábitos alimentares, Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	69
Gráfico 5 -	Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), obtidos de morcegos hematófagos com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	72
Gráfico 6 -	Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), obtidos de morcegos insetívoros com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	73
Gráfico 7 -	Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), obtidos de morcegos frugívoros com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo – 2005.....	74
Gráfico 8 -	Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), obtidos de morcegos hematófagos com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	75

Gráfico 9 -	Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), obtidos de morcegos insetívoros com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	76
Gráfico 10 -	Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), obtidos de morcegos frugívoros com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	77

---

## **LISTA DE TABELAS**



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos morcegos hematófagos e não hematófagos em reagentes e não reagentes à prova de imunofluorescência direta (IFD) aplicada à raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	60
Tabela 2 -	Classificação, em gênero e hábito alimentar, de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	61
Tabela 3 -	Distribuição conforme o estado de adequação e viabilidade dos tecidos e órgãos de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), submetidos à prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	62
Tabela 4 -	Distribuição conforme o estado de adequação e viabilidade dos tecidos e órgãos de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), submetidos à prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	62
Tabela 5 -	Distribuição dos tecidos e órgãos positivos e negativos à prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	63
Tabela 6 -	Distribuição dos tecidos e órgãos positivos e negativos à prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	65
Tabela 7 -	Média aritmética e desvio padrão dos períodos de mortalidade, mínimos e máximos, observados em camundongos inoculados intracerebralmente com suspensões de cérebros e de glândulas salivares de morcegos de diferentes hábitos alimentares, Instituto Pasteur de São Paulo, no período abril a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	67
Tabela 8 -	Proporção de camundongos mortos por inoculados, em porcentagem (%), após inoculação intracerebral de suspensões de cérebros e de glândulas salivares de morcegos de diferentes hábitos alimentares, Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	70
Tabela 9 -	Distribuição de morcegos com histórico de encontrados mortos, sacrificados e ignorados, segundo o hábito alimentar e com diagnóstico positivo para raiva, Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005.....	71

---

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABLV	<i>Australian bat lyssavirus</i>
ATCC	<i>American Cell Culture Typing Collection</i>
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
DP	Desvio padrão
DLIC <sub>50</sub>	Dose letal 50% intracerebral em camundongos
DUVV	<i>Duvenhage virus</i>
EBL / EBLV	<i>European bat Lyssavirus</i>
EUA	Estados Unidos da América
ICC	Inoculação em cultura celular
IFD	Imunofluorescência direta
IIC	Inoculação intracerebral em camundongos
LBV	<i>Lagos bat virus</i>
Mabs	Anticorpos monoclonais
MEM	Meio essencial mínimo
MOKV	<i>Mokola virus</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PV	<i>Pasteur virus</i>
RABV	Vírus da Raiva
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNP	Ribonucleoproteína

SNC	Sistema Nervoso Central
SCN	Suspensão de cérebro normal
SCVS	Suspensão de cérebro de camundongo infectado com vírus CVS
WCBV	<i>West Caucasian bat virus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

---

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
=	Igual
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogênio iônico
±	Mais ou menos
$\bar{X}$	Média aritmética
μl	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
X	Vezes

---

## **SUMÁRIO**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	32
1.1	A raiva.....	33
1.2	Vírus da raiva.....	35
1.3	Classificação do vírus da raiva.....	36
1.4	Os morcegos.....	38
1.5	A raiva em morcegos.....	39
1.6	Transmissão do vírus da raiva.....	43
1.7	Patogenia.....	45
1.8	O diagnóstico.....	47
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	50
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
3.1	Morcegos.....	52
3.2	Vírus CVS/31.....	54
3.3	Inóculos.....	54
3.4	Diluyente para isolamento de vírus.....	54
3.5	Conjugado imunofluorescente.....	55
3.6	Cultura de células de neuroblastoma murino-N2A.....	55
3.7	Imunofluorescência direta.....	56
3.8	Inoculação Intracerebral em camundongos (IIC).....	56
3.9	Inoculação em cultivo celular (ICC).....	57
3.10	Determinação do período de mortalidade da raiva em camundongos.....	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	59
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	78



<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>99</b>

---

# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A raiva

A raiva é uma antropozoonose (WHO, 1959) conhecida desde os tempos remotos, caracterizada por uma encefalomielite aguda fatal nos animais e no ser humano (ACHA; SZYFRES, 2003). Em princípio, esta é uma doença mantida e perpetuada na natureza por diferentes espécies de animais carnívoros domésticos e silvestres, denominados de "reservatórios", incluindo-se também os morcegos de diferentes hábitos alimentares (SMITH, 1996).

A palavra raiva deriva do latim *rabere*, "fúria", "delírio" e do sânscrito *rabhas* que significa "tornar-se violento" (STEELE; FERNANDEZ, 1991) e, da palavra grega *lyssa*, que deu origem à denominação do gênero *Lyssavirus*, ao qual pertence o vírus da raiva (WILKINSON, 2002).

No tratado intitulado "A Ferida Incurável", datado de 1584, do médico italiano Girolamo Fracastoro<sup>1</sup> (apud WILKINSON, 1988, p. 4) a raiva foi conceituada como uma doença contagiosa, que acometia os humanos e os levava à morte inexorável. Apesar de considerar uma doença contagiosa, Fracastoro afirmava que esta não poderia ser transmitida a humanos por simples contato, por fômites ou à distância, sendo necessária uma descontinuidade da pele, que poderia ser provocada por mordedura, havendo o contato com os dentes ou espuma da boca dos animais (WILKINSON, 1988).

A doença já foi descrita como sempre "fatal" uma vez iniciados os sinais e os sintomas (ACHA; SZYFRES, 2003), ou "quase sempre fatal" nos animais (BELL et al., 1971; NILSSON, 1970), ou ainda "sempre fatal" no ser humano (MACHADO, 1996), no entanto, o *Centers for Disease Control and Prevention - CDC*, Atlanta, EUA, considera como sendo uma doença prevenível por meio de

---

<sup>1</sup> FRACASTORII, H. *De Contagione et Contagiosis Morbis et Eorum Curatione*, translation and notes by Wilmer Cave Wright. New York. London: P. G. Putnam's Sons, 1930. Book II, p. 124-133.

vacinas (NATIONAL CENTERS FOR INFECTIOUS DISEASES, 2005). Está incluída dentro da lista de doenças transmissíveis a múltiplas espécies, da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2004) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera como raiva a doença nervosa em animais e no ser humano causada apenas por vírus do genótipo I do gênero *Lyssavirus* (WHO, 1999).

Na década de 1990, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) mostrou que a raiva podia ser eficazmente reduzida por meio de um programa de vacinação parenteral de animais domésticos, aliado a uma campanha educativa. Neste sentido, o ciclo da transmissão foi interrompido, especialmente se considerar a raiva canina nos ambientes urbanos. Apesar do decréscimo contínuo da raiva em cães na América Latina, graças ao estabelecimento do "Programa Regional de Eliminação da Raiva Transmitida pelo Cão nas Américas", com uso de vacinas cada vez mais seguras e eficientes (BELOTTO, 2000), a raiva em morcegos hematófagos não pôde ser controlada por meio de vacinas, como no caso de mamíferos terrestres (MAYERN, 2003).

Nos países da América Latina onde existe o problema da raiva causada pelos morcegos hematófagos, o controle da população destes reservatórios é realizado com o uso de medicamentos anticoagulantes (FLORES CRESPO, 2003). Por outro lado, apesar da raiva humana transmitida pelos morcegos não hematófagos ter mostrado um aumento crescente no mundo por causa dos lissavírus (LUMIO et al., 1986), na atualidade não existe nenhum método de controle ou conduta a ser empregado nas áreas de foco, como os existentes para outras espécies de reservatórios. No entanto, quando há menção de controle, além da vacinação dos suscetíveis, ocorre maior enfoque à preservação dos morcegos, como desalojá-los do seu abrigo e vedar o acesso ou recomendando a poda dos galhos de árvores ou recolhendo as flores e os frutos que serviriam de alimento, ou ainda a substituição de plantas frutíferas por outras que não carreguem frutos (HARMANI; SILVA; HAYASHI, 1996).

Os países ou pequenas ilhas como a Antígua, Austrália, Bahamas, Barbados, Bermuda, Ilhas Cayman, Fiji, Finlândia, Islândia, República da Irlanda, Jamaica, Japão, Nova Zelândia, Noruega,

Saint Kitts-Nevis-Anguilla, Santa Lúcia, Saint Martin (Antilhas Holandesas), Ilhas São Pedro e Miquelon, São Vicente, Suécia, Taiwan, Turquia e Ilhas Caico, Reino Unido, e Uruguai são considerados livres da raiva clássica (CANADIAN FOOD AND INSPECTION SERVICE, 2004).

## 1.2 Vírus da raiva

Em geral, os *Lyssavirus* tem uma morfologia baciliforme, semelhante à “bala de revólver”, com uma extremidade arredondada e a outra plana. O diâmetro do vírus pode variar entre 50 a 100 nm e o comprimento de 100 a 430 nm, dependendo da espécie do vírus e da presença de partículas defectivas interferentes. O vírus da raiva é constituído por dois elementos estruturais principais: uma ribonucleoproteína (RNP) complexa e o envelope viral que envolve a RNP. A RNP central apresenta-se firmemente enrolada e com simetria helicoidal. A RNP é formada por um genoma (ácido ribonucléico - RNA), que contém aproximadamente 12.000 nucleotídeos, possui fita simples, polaridade negativa e não é segmentado (MCCOLL; TORDO; SETIÉN, 2000). Esta ribonucleoproteína está associada a uma nucleoproteína (N), que é um dos maiores componentes do vírus e a maior proteína interna do complexo helicoidal (WUNNER, 2002). É fosforilada em um único sítio, exercendo a função de proteger a RNP (TORDO, 1996) e é a mais importante no processo de encapsidação (TORDO et al., 1986). Há a fosfoproteína (P, M1 ou NS), que é uma proteína multifuncional e um componente chave do complexo RNA polimerase associada ao vírion, sendo uma proteína regulatória na replicação do genoma viral. Também está associada à proteína L, uma RNA-polimerase-RNA-dependente, responsável pelas atividades enzimáticas necessárias para transcrição e replicação do RNA viral (TORDO, 1996; WUNNER, 2002).

### 1.3 Classificação do vírus da raiva

O vírus da raiva pertence ao gênero *Lyssavirus* da família *Rhabdoviridae*, ordem *Monegavirales* (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Antes de 1994, o gênero *Lyssavirus* era classificado segundo características sorológicas e antigênicas em quatro sorotipos (WHO, 1994). O sorotipo 1 compreendia as amostras clássicas do vírus rábico (Pasteur Virus - PV, Challenge Virus Standard - CVS, entre outras), e amostras que infectavam os mamíferos terrestres, morcegos hematófagos e não hematófagos das Américas. O sorotipo 2 era representado pelo vírus Lagos Bat, o sorotipo 3, pelo vírus Mokola e o sorotipo 4 correspondia ao vírus Duvenhage (TORDO, 1996). Outros vírus isolados de morcegos não hematófagos da Europa foram denominados de “European Bat Lyssaviruses”, ficando conhecidos pelas siglas EBL1 e EBL2 (SCHNEIDER, 1982).

Com as técnicas modernas, utilizadas para os estudos antigênicos e genéticos, os especialistas da OMS, reunidos em Niagara Falls, EUA, sugeriram a nomenclatura de “genótipos” para a classificação das variantes antigênicas do vírus da raiva (WHO, 1994). Na classificação atual, o gênero *Lyssavirus* contém sete genótipos (GOULD et al., 1998; VAN REGENMORTEL et al., 2000). O antigo sorotipo 1 do *Lyssavirus* clássico recebeu a denominação de genótipo I – Vírus da raiva (RABV), representado pelos vírus clássicos da raiva. O sorotipo 2 passou a ser denominado genótipo II – *Lagos bat virus* (LBV), vírus isolado de morcegos frugívoros (*Eidolon helvum*, *Micropteropus pusillus* e *Epomorphorus wahlbergi*) sendo o primeiro relato feito em 1956, na região de Lagos, na Nigéria (BINGHAM, 2001; VAN REGENMORTEL et al., 2000; WUNNER, 2002). O sorotipo 3 corresponde ao genótipo III – *Mokola virus* (MOKV), isolado de mussaranhos (*Crocidura* sp) da Nigéria, único lissavírus até o momento não isolado de morcegos. O primeiro isolamento foi feito em 1968 em um *pool* de órgãos de mussaranhos na Nigéria, seguido por isolamentos em humanos também na Nigéria, e felinos do Zimbábue e Etiópia (NEL, 2001). O sorotipo 4 recebeu a denominação de genótipo IV –

*Duvenhage virus* (DUVV), que em 1970 foi isolado de humano em Warmbaths, na região norte da Pretoria e, posteriormente isolado de morcegos insetívoros (*Miniopterus schreibersii* e *Nycteris thebaica*) da África do Sul e Zimbábue (BINGHAM, 2001).

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

Em 1996, um *Lyssavirus* foi isolado do morcego frugívoro *Pteropus alecto*, na costa leste da Austrália, um país considerado livre de raiva desde 1867. Este vírus foi classificado como genótipo VII – *Australian bat lyssavirus* (ABLV) (KING, 2001; POUNDER, 2003). Atualmente, são conhecidas mais quatro variantes virais, que foram sugeridas para constituírem novos genótipos de *Lyssavirus*, todas isoladas de morcegos. Em 2003, foi descrita a variante *Aravan virus*, isolada de um morcego insetívoro (*Myotis blythi*) do Quirguistão, Ásia Central, em 1991 (ARAI et al., 2003; KUZMIN et al., 2003). A outra variante, *Khujand*, isolada em 2001, no Noroeste do Tadjiquistão, Ásia Central, também de um morcego insetívoro (*Myotis mystacinus*) (KUZMIN et al., 2001, 2003). As outras duas variantes foram isoladas na Rússia, uma obtida na cidade de Irkutsk, denominada *Irkut virus*, isolada de um morcego *Murina leucogaster* e a outra, obtida da região Oeste das Montanhas do Cáucaso (cerca de 100 km a Sudeste da cidade de Krasnodar), denominada *West caucasian bat virus* (WCBV), isolada a partir de um morcego *Miniopterus schreibersi* (BOTVINKIN et al., 2003). No continente americano e no Caribe, até o momento, não foi registrada a presença de outros genótipos do *Lyssavirus*, a não ser o genótipo I (FOOKS, 2004).

#### 1.4 Os morcegos

Os morcegos representam aproximadamente 24% de todas as espécies de mamíferos conhecidas. Pertencem à ordem *Chiroptera* que, por sua vez, divide-se em duas subordens: *Megachiroptera* e *Microchiroptera*. A subordem *Megachiroptera* possui apenas uma família, que habita exclusivamente o Velho Mundo (África, Ásia e Oceania) e os seus representantes possuem hábitos crepusculares, são frugívoros e pelo seu tamanho, são chamados de “raposas voadoras”. Os morcegos da subordem *Microchiroptera* possuem hábitos noturnos, apresentando tamanhos variados e hábitos alimentares diversificados e a maioria dos seus representantes encontra-se no continente americano, tem ampla distribuição geográfica e inclui 17 famílias, sendo 3 cosmopolitas. A ordem tem, portanto, 18 famílias, nas quais se distribuem 168 gêneros e 986 espécies (TADDEI, 1996; VIEIRA, 1942; WIMSATT, 1969).

Os morcegos encontrados no Brasil estão incluídos em 9 famílias e subdivididos em 144 espécies, isto é, correspondendo a quase 50% dos morcegos encontrados em todo o continente americano. A família mais numerosa é a *Phyllostomidae*, com 82 espécies registradas, seguidas de *Vespertilionidae* e *Molossidae*, ambos com 19 espécies, *Emballonuridae* com 15 espécies e as famílias *Noctilionidae*, *Mormoopidae*, *Natalidae*, *Furipteridae* e *Thyropteridae*, totalizando outras 9 espécies. Quanto ao hábito alimentar, a grande maioria dos morcegos brasileiros é de hábito insetívoro, com 87 espécies; seguidos pelos frugívoros, com 35 espécies; nectarívoros com 14 espécies, carnívoros com 5 e hematófagos, com 3 espécies (TADDEI, 1996).



## 1.5 A raiva em morcegos

No início do século passado ocorreu uma grave epizootia de raiva na faixa compreendida entre a serra e o mar, em frente à Ilha de Santa Catarina, no Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil, na qual morreram cerca de 4.000 bovinos e 1.000 eqüinos e muares, que eram destinados aos trabalhos de campo e transporte de produtos agrícolas, causando elevado prejuízo econômico à população local. A possibilidade de os morcegos hematófagos desempenharem o papel de reservatório na propagação da raiva foi pela primeira vez levantada por Carini, porém, esta hipótese não foi prontamente aceita pelos pesquisadores internacionais, tendo sido considerada uma “fantasia tropical” (CARINI, 1911).

Dois veterinários alemães, Haupt e Rehaag (1925), pesquisando na mesma região onde Carini havia diagnosticado raiva em bovinos, identificaram a presença de corpúsculos de Negri, no sistema nervoso central (SNC) de um morcego hematófago que estava se alimentando em um bovino, confirmando a hipótese de Carini. Coube também aos dois pesquisadores alemães a primeira descrição, em 1916, no Brasil, da presença do vírus da raiva em um morcego não hematófago da espécie *Phyllostoma superciliatum*, atualmente classificado como *Artibeus lituratus*, no entanto, o fato só foi relatado em 1935 (TORRES; QUEIROZ LIMA, 1935). Contestações surgiram em torno da identificação da espécie do morcego envolvido, se era mesmo um morcego frugívoro *Phyllostoma superciliatum* (*A. lituratus*) ou um hematófago *Desmodus rotundus*. Entretanto, o assunto não mereceu novas investigações e Tuttle (1988, p. 1) descreveu o seguinte: "*Vampires remained scientifically neglected until one, the common vampire, Desmodus rotundus, was implicated in a rabies outbreak in Trinidad in the 1930s*".

Passados pouco mais de uma década depois da epidemia da raiva no Estado de Santa Catarina, uma doença misteriosa acometeu os bovinos da ilha de Trinidad, no Caribe, atingindo

inclusive os seres humanos, sendo mais tarde diagnosticada como raiva (CARNEIRO, 1936). Os episódios da raiva humana na ilha de Trinidad foram descritos por Hurst e Pawan (1931). O vírus da raiva foi isolado do morcego hematófago *D. rotundus* e de morcegos frugívoros *Artibeus planirostris trinitalis*, *Diclidurus albus* e *Hemiderma* sp e conseguiu infectar experimentalmente com o vírus da raiva os morcegos *D. rotundus* e *A. lituratus* (PAWAN, 1936a).

Na década de 30 do século passado, ocorrências da raiva transmitida pelos morcegos hematófagos foram registradas na Colômbia, Bolívia, México, Venezuela, Paraguai e Argentina (CARNEIRO, 1936) e em outros estados do Brasil (CARNEIRO; FREITAS LIMA, 1927), porém, aparentemente, o relato de Pawan (1936a) foi a primeira descrição sobre raiva em morcegos não hematófagos da América Latina. O fato, no entanto, não despertou muito interesse, comparado à grande repercussão e preocupação demonstrada pelos pesquisadores em relação à raiva transmitida pelos morcegos hematófagos (BAER, 1975a).

A preocupação com os morcegos hematófagos na América Latina era compreensível, dado o enorme prejuízo econômico em decorrência da morte dos animais por raiva e, além da transmissão da tripanossomíase aos equídeos, são ainda responsáveis pela diminuição da produtividade através dos repetidos ataques causando: debilidade do gado, devido à perda de sangue; infecções secundárias nas feridas; miíases, depreciação do couro e oclusão dos canais galactóforos de animais em fase de lactação, entre outras (ACHA, 1967; ARELLANO-SOTA; SUREAU; GREENHAL, 1971).

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

Um pequeno incidente ocorrido na Flórida, EUA, em 1953, quando um menino foi atacado por um morcego insetívoro *Dasypterus floridanus* (atualmente denominado de *Lasiurus intermedius*), fez com que os pesquisadores norte-americanos voltassem suas atenções à questão da raiva em

morcegos não hematófagos (BIGLER; HOFF; BUFF, 1974). O morcego agressor foi diagnosticado positivo para raiva e o menino recebeu tratamento anti-rábico de pós-exposição com vacina, não desenvolvendo a raiva (SCATTERDAY, 1954; VENTERS et al., 1954). Pouco tempo depois deste incidente, outros morcegos não hematófagos das espécies *Lasiurus cinereus* e *Lasiurus seminola*, ambos insetívoros, foram diagnosticados positivos para raiva no Estado da Pennsylvania (WITTE, 1954). A partir de então, as autoridades de saúde pública dos EUA se interessaram em conhecer a extensão da raiva nos morcegos não hematófagos e a infecção pelo vírus da raiva foi confirmada em diferentes espécies de morcegos de hábitos alimentares distintos, incluindo os insetívoros, frugívoros, omnívoros, polinívoros e piscívoros. Os gêneros de morcegos mais freqüentemente diagnosticados positivos para raiva incluíam os *Lasiurus*, *Tadarida*, *Epitesicus*, *Myotis*, *Plecotus*, *Pipistrellus*, *Mormoops*, *Euderma*, entre outros. Na década de 1960, um número grande de morcegos de diferentes hábitos alimentares foram diagnosticados positivos para raiva nos EUA, Canadá, México, Guatemala, Panamá, Honduras, Colômbia e Venezuela no continente americano, e também na Europa (Alemanha, Turquia e antiga Iugoslávia), Ásia (Tailândia) e África (África do Sul) (BAER, 1975a).

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

em uma mangueira, em Itajaí, Rio de Janeiro (SILVA; SILVA, 1974). Uieda et al. (1996) relataram que no Brasil há registros de 27 espécies de morcegos de diferentes hábitos alimentares com diagnóstico positivo para raiva, sendo que a maioria destas notificações eram procedentes dos Estados da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Rio Grande do Sul.

No Estado de São Paulo, entre os anos de 1984 e 1991 ocorreram mais sete casos de positividade em morcegos, sendo três frugívoros e quatro insetívoros (UIEDA et al., 1992, 1995). Entre esses casos estava o primeiro registro de raiva em *Nyctinomops macrotis* no Brasil (UIEDA et al., 1995). Até o final de 1998, mais um caso em morcego frugívoro (PASSOS et al., 1999) e oito casos em morcegos insetívoros, incluindo espécies como: *Myotis nigricans*, *Lasiurus borealis*, *Nyctinomops macrotis*, *Molossus ater*, *Histiotus velatus* e o primeiro caso no Estado de São Paulo em *Tadarida brasiliensis* foram diagnosticados através de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos (BERNARDI et al., 1998; MARTORELLI et al., 1995, 1996; PASSOS et al., 1998; SILVA et al., 1999; UIEDA, 1998).

Nos últimos anos, os relatos de isolamento de vírus da raiva ou de vírus aparentados à raiva a partir de morcegos de diferentes hábitos alimentares tornaram-se freqüentes no mundo todo, muitos destes foram denominados de "lissavírus" emergentes. Mesmo no Japão, país considerado livre de raiva, foi isolado um vírus do morcego *Rhinolophus cornutus*, que apresentou características muito próximas de um lissavírus. Este vírus, conforme Iwasaki et al. (2004), apresentou uma encefalite letal quando inoculado intracerebralmente em camundongos de até 3 semanas de idade e na microscopia eletrônica foram observadas numerosas partículas em forma de bala de revólver, com vírions apresentando características da família *Rhabdoviridae*. Para Fooks (2004), estes RNA vírus denominados de "emergentes" evidentemente não se encontram em estado de "estase genética" e, através de mecanismos de "transposição" (*spill-over* ou *species-jumping*), mutação, imuno-evasão e adaptação do vírus aos novos hospedeiros, novos vírus poderão emergir no futuro como patógenos afetando o ser humano.

## 1.6 Transmissão do vírus da raiva

Os morcegos hematófagos provavelmente já estavam infectados pelo vírus da raiva muito antes da descoberta da América pelos colonizadores europeus e os seres humanos e animais continuamente sofriam da raiva transmitida pelos morcegos na América tropical (CONSTANTINE, 1988). A transmissão do vírus ocorre principalmente pelo contato direto, no entanto, os morcegos não hematófagos podem ser infectados ao compartilharem o mesmo abrigo com os morcegos hematófagos portadores do vírus da raiva ou mesmo ao disputarem território com esses morcegos. Os morcegos não hematófagos infectados, quando encontrados vivos, mortos ou prostrados, em ambientes urbanos, podem transmitir acidentalmente a doença à espécie humana e a outros animais (UIEDA et al., 1995).

Os morcegos hematófagos são conhecidos por permanecem assintomáticos, no entanto, como em outros mamíferos, a condição de portador "são" não foi confirmada em estudos de inoculação experimental (MORENO; BAER, 1980). Delpietro et al.<sup>2</sup> (1972), apud Baer (1975, p. 170), isolaram vírus da raiva da glândula salivar de um morcego hematófago, porém, com ausência no cérebro. No entanto, para Sulkin e Allen (1975), não existe nenhum caso confirmado por métodos virológicos modernos que indique ausência do vírus da raiva no cérebro e presença do vírus na glândula salivar, isto é, a existência do "portador são".

Os relatos de morcegos hematófagos "portadores são", eliminando vírus pela saliva por um período prolongado pode ser devido a técnica virológica menos precisa do passado, ou seriam vírus distintos da raiva que, inoculados em camundongos eram confundidos com raiva, como no caso do *Rio Bravo virus* (PRICE<sup>3</sup>, 1978<sub>a</sub>, apud CONSTANTINE, 1988, p. 167) ou ainda o *Tamana bat virus* e o

---

<sup>2</sup> DELPIETRO, H.; DÍAZ, A. M. O.; FUENZALIDA, E.; BELL, J. F. Determination of rate of rabies attackk in bats. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, v. 73, p. 222-230, 1972.

<sup>3</sup> PRICE, J. L. Isolation of Rio Bravo and a hitherto undescribed agent, Tamana Bat virus, from insectivorous bats in Trinidad, with serological evidence of infection in bats and man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 27, p. 153, 1978.

*Tacaribe virus* (PRICE<sup>4</sup>, 1978<sub>b</sub>, apud CONSTANTINE, 1988, p. 167), que podem infectar as glândulas salivares de morcegos por um período prolongado (anos) e desta forma, ser interpretado erroneamente como "portador são" (CONSTANTINE, 1988).

No Brasil, o envolvimento de morcegos hematófagos na transmissão da raiva aos seres humanos, no início da década de 80, era de 2%, do total de casos humanos de raiva (SCHNEIDER, 1990), variando de 11,00 a 76,67% até 2004. Em 2004, dos 30 casos registrados de raiva humana, 23 foram transmitidos por morcegos hematófagos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Por outro lado, a transmissão do vírus da raiva pelos morcegos não hematófagos aos animais terrestres silvestres continua sendo uma grande indagação e, caso ocorra esta transmissão, Baer (1975a) já sugeria que deveriam ser levadas em consideração medidas de controle a serem adotadas.

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

Na Argentina, Delpietro et al. (1997), em estudo utilizando anticorpos monoclonais, relataram que amostras de vírus da raiva isoladas de morcegos frugívoros *A. lituratus* eram antigenicamente relacionadas com a variante de morcegos hematófagos. Por sua vez, amostras brasileiras isoladas de morcegos frugívoros *A. lituratus* e *A. planirostris* apresentaram o perfil filogenético estreitamente relacionado com aquele obtido de morcegos hematófagos, indicando existir uma relação complexa entre estes morcegos ainda a ser esclarecida (SHOJI et al., 2004).

---

<sup>4</sup> PRICE, J. L. Serological evidence of Tacaribe virus and arboviruses in trinidadians bats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 27, p. 162, 1978.

Na Europa, foi demonstrada a "transposição" do EBLV-1 (genótipo V) de morcegos insetívoros para os animais domésticos (RONSHOLT, 2002), porém, o primeiro caso de transposição do EBLV-1 a um animal silvestre, uma marta (*Martes foina*), foi registrada na Alemanha, em 2001. O cérebro da marta, submetido repetidas vezes à imunofluorescência acusou resultado negativo e o diagnóstico só foi possível através da inoculação em cultivo celular e em camundongos, com posterior caracterização genética (MÜLLER et al., 2004).

### 1.7. Patogenia

A patogenia do vírus da raiva inclui os seguintes passos no organismo de um indivíduo suscetível: replicação inicial do vírus na porta de entrada usualmente constituída por uma lesão da pele, migração pelos nervos periféricos até o SNC, de onde o vírus se dissemina, infectando outros tecidos não nervosos, causando lesões irreversíveis, levando à morte tanto do homem como de outros animais atingidos. O vírus não penetra pela pele intacta, a infecção depende do contato do vírus com soluções de descontinuidade da pele, já existentes ou provocadas por mordeduras ou arranhaduras, entre outras, ou com membranas mucosas como: nariz, olhos ou boca (ACHA; SZYFRES, 1986; BRASS, 1994).

Outras portas de entrada são raras, porém, em 1956, foi registrado um caso de raiva humana, em um indivíduo que trabalhava em cavernas com morcegos, porém sem histórico de mordedura ou outro contato com algum animal suspeito. Após investigação epidemiológica, aventou-se a hipótese de que o indivíduo se infectara através da inalação de partículas virais em suspensão na caverna (BRASS, 1994; WARRELL; WARRELL, 2004). A infecção por via aérea também foi demonstrada, em condições naturais, quando animais sadios foram colocados dentro de grutas onde

viviam grandes colônias de morcegos infectados (CONSTANTINE, 1962). A detecção de antígenos do vírus da raiva em receptores de células olfatórias de morcegos naturalmente infectados em cavernas, sugerindo que a mucosa nasal era a porta de entrada em infecções de morcegos foi relatada por Constantine, Emmons e Woodie<sup>5</sup> (1972), apud Baer (1975a, p. 86). Para que ocorra a transmissão por via aerógena, é necessário uma grande população de morcegos infectados em áreas não ventiladas (JACKSON, 2002).

Após alcançar o SNC, o vírus migra centrifugamente em direção aos diferentes órgãos, envolvendo particularmente o sistema nervoso parassimpático. (JACKSON, 2002). Os órgãos invadidos pelo vírus durante a migração centrífuga incluem o coração, fígado, pele, timo, rins, ovários, útero, glândula adrenal, pulmão, baço, intestinos, músculos liso e esquelético, folículos pilosos, epitélio da língua, retina e córnea (BRASS, 1994; MATTOS; MATTOS; RUPPRECHT, 2001).

O período de incubação da raiva em morcegos hematófagos infectados experimentalmente é variável, de 7 a 171 dias, esta variação pode estar relacionada à quantidade inoculada de vírus através da mordedura, lambedura ou arranhadura; local da porta de entrada; estado imune do indivíduo e à gravidade da lesão (ACHA; SZYFRES, 1986; BRASS, 1994; LUNA; CHAHUAYO; MARREROS, 1985).

As manifestações clínicas da raiva em morcegos hematófagos podem ser de forma clássica, com estágio predominante de fúria e seguida de paralisia e morte; forma paralítica clássica, com estágio predominante de silêncio, a fúria não está presente. A paralisia é seguida por morte; forma furiosa onde a paralisia não existe. A fúria é seguida de morte; ausência completa de sintomas e morte repentina; forma furiosa, onde a fúria é seguida de recuperação e forma assintomática, onde o morcego não apresenta sinal de anormalidade, mas ainda é capaz de transmitir a doença (PAWAN, 1936b). Constantine (1967), no entanto, relatou que os sinais clínicos em morcegos naturalmente infectados são predominantemente paralíticos ao invés de furiosos e incluem: irritabilidade ou depressão, debilidade, anorexia, hipotermia e paralisia. A paralisia inicial pode envolver as pernas,

---

<sup>5</sup> CONSTANTINE, D. G.; EMMONS, R. W.; WOODIE, J. D. *Science*, v. 175, p. 1255-1256, 1972.



asas, pescoço, pálpebras, cabeça ou maxilar. Prejuízos neurais podem se estender à bexiga, resultando em incontinência urinária; podendo ocorrer também incontinência fecal. A paralisia evolui por todo corpo na fase terminal e a morte acontece em alguns dias (BRASS, 1994).

São poucos os experimentos de inoculação do vírus da raiva em morcegos não hematófagos, os morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis mexicana* e *Antrozous pallidus* foram suscetíveis à infecção experimental com vírus isolado de um morcego do gênero *Tadarida*. Inoculados por via intracerebral, subcutânea e intramuscular, os morcegos apresentaram sinais de raiva e morreram dentro de 6 a 23 dias pós-inoculação. O vírus foi isolado de um *pool* de tecido cerebral e de glândula salivar de morcegos encontrados mortos. Porém, estes estudos foram realizados com um número pequeno de morcegos e a tentativa de isolamento do vírus foi feita apenas do cérebro, glândula salivar ou da saliva e em morcegos, a via de eliminação mais importante é a saliva, fato observado em infecção natural e experimental (SULKIN; ALLEN, 1975).

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

## 1.8 O diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da raiva é de fundamental importância para a confirmação do caso suspeito, bem como para o diagnóstico diferencial com outras encefalites. A técnica de imunofluorescência direta (IFD), é uma técnica rápida, sensível e específica e considerada de triagem "padrão" (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996).

Por outro lado, o isolamento do vírus por inoculação intracerebral em camundongos (IIC) apresenta um alto grau de especificidade, mas com resultados mais demorados (KOPROWSKI, 1996) e o isolamento do vírus através de cultivo celular (ICC), pelo uso da linhagem de células N2A, tem como vantagem principal a rapidez com o qual se obtém o diagnóstico. Esta célula tem se mostrado sensível ao vírus da raiva, obtendo-se os resultados em 96 horas (WEBSTER; CASEY, 1996).

Quando diferentes amostras do vírus da raiva foram inoculadas por via intraperitoneal, os camundongos apresentaram diferentes graus de susceptibilidade, embora esta diferença não fosse confirmada após inoculação intracerebral. Foi observado também que o comportamento das amostras de campo, quando inoculadas em uma mesma linhagem de camundongos pode diferir, apresentando diferença nos sinais da doença ou na proporção de mortos. Webster, Charlton e Casey <sup>6</sup> (1988), apud Webster e Casey (1988, p. 205) demonstraram, numa mesma linhagem de camundongos, que o vírus isolado do cérebro e da glândula salivar de um mesmo animal pode provocar períodos diferentes de mortalidade, isto é, o período que abrange a incubação, período clínico e morte.

Por sua vez, a maioria das amostras de vírus da raiva isoladas do cérebro cresce prontamente em células do neuroblastoma, entretanto, algumas amostras podem apresentar dificuldades no primo-isolamento, em decorrência do baixo título de vírus no tecido original. Amostras com resultado negativo para raiva na prova de IFD e posteriormente confirmado positivo por outras técnicas diagnósticas usualmente contém quantidade muito pequena de vírus. Cuidados adicionais devem ser levados em conta para o emprego desta técnica no diagnóstico de rotina da raiva, pois, as células são suscetíveis à contaminação e lise por causa das bactérias, fungos, outros vírus e devido às toxinas presentes no tecido suspeito. Deve-se também utilizar antibióticos adequados no meio de cultura para aumentar a resistência contra as contaminações bacterianas (WEBSTER; CASEY, 1988).

---

<sup>6</sup> WEBSTER, W. A.; CHARLTON, K. M.; CASEY, G. A. *Can. J. Microbiol.*, in press, 1988

---

## **OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

Pelos fatos apresentados anteriormente e com base na afirmação de Baer (1975b, p. 170) de que "*Little is known about the incidence of infection or the prevalence rate in vampires, or the distribution of virus in the various organs*" e, de maneira semelhante, com poucas informações em relação aos morcegos não hematófagos, este trabalho tem como objetivos:

- Identificar as espécies de morcegos positivos para raiva no Estado de São Paulo;
- Estudar a disseminação do vírus da raiva em diferentes órgãos de morcegos naturalmente infectados;
- Avaliar o período de mortalidade dos vírus isolados do cérebro e da glândula salivar de morcegos por meio de inoculação intracerebral em camundongos;
- Comparar o isolamento do vírus da raiva a partir do SNC e de diferentes tecidos e órgãos não nervosos de morcegos, por meio da inoculação intracerebral em camundongos e em cultivo celular N2A.

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Morcegos

No período de abril de 2002 a novembro de 2003, 4.393 morcegos foram enviados à Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo – Secretaria do Estado da Saúde, sendo 415 hematófagos e 3.978 não hematófagos, procedentes de 261 municípios do Estado de São Paulo (Figura 1). Estes morcegos foram enviados pelos profissionais da área da saúde ou da agricultura, além de profissionais autônomos ou pelos moradores dos municípios interessados em esclarecer o diagnóstico da raiva. A grande maioria destes animais foi capturada em estado aparentemente sadio e sacrificada em seguida e uma minoria apresentava relato de ter sido encontrado morto.

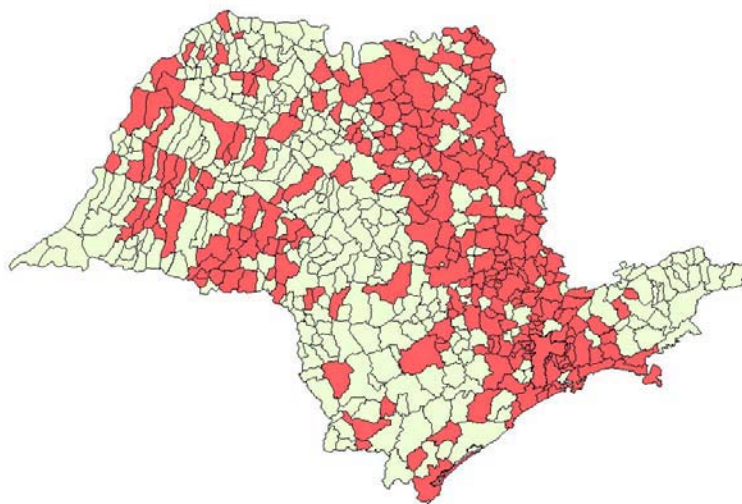


Figura 1 - Municípios do Estado de São Paulo que enviaram amostras de morcegos para serem submetidos ao diagnóstico da raiva no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Os fragmentos de cérebros destes animais foram submetidos à prova de imunofluorescência direta (IFD) para pesquisa do antígeno do vírus da raiva. Ao todo, 82/4.393 (1,87%) foram diagnosticados positivos para raiva, sendo 76 de morcegos não hematófagos e seis de hematófagos. Os morcegos com diagnóstico positivo para raiva constituíram o grupo experimental deste trabalho. Os mesmos foram classificados conforme o gênero e/ou a espécie e hábito alimentar, através da chave de identificação descrita por Vizotto e Taddei (1973) e tiveram o cérebro, glândula salivar (submandibular), músculo peitoral, coração, pulmão, estômago, rins, bexiga, trato genital (testículos ou ovários e útero), língua e gordura interescapular retirados para serem processados pelas provas de inoculação em camundongos e em cultivo celular. A procedência destes morcegos positivos para raiva está ilustrada na figura 2.

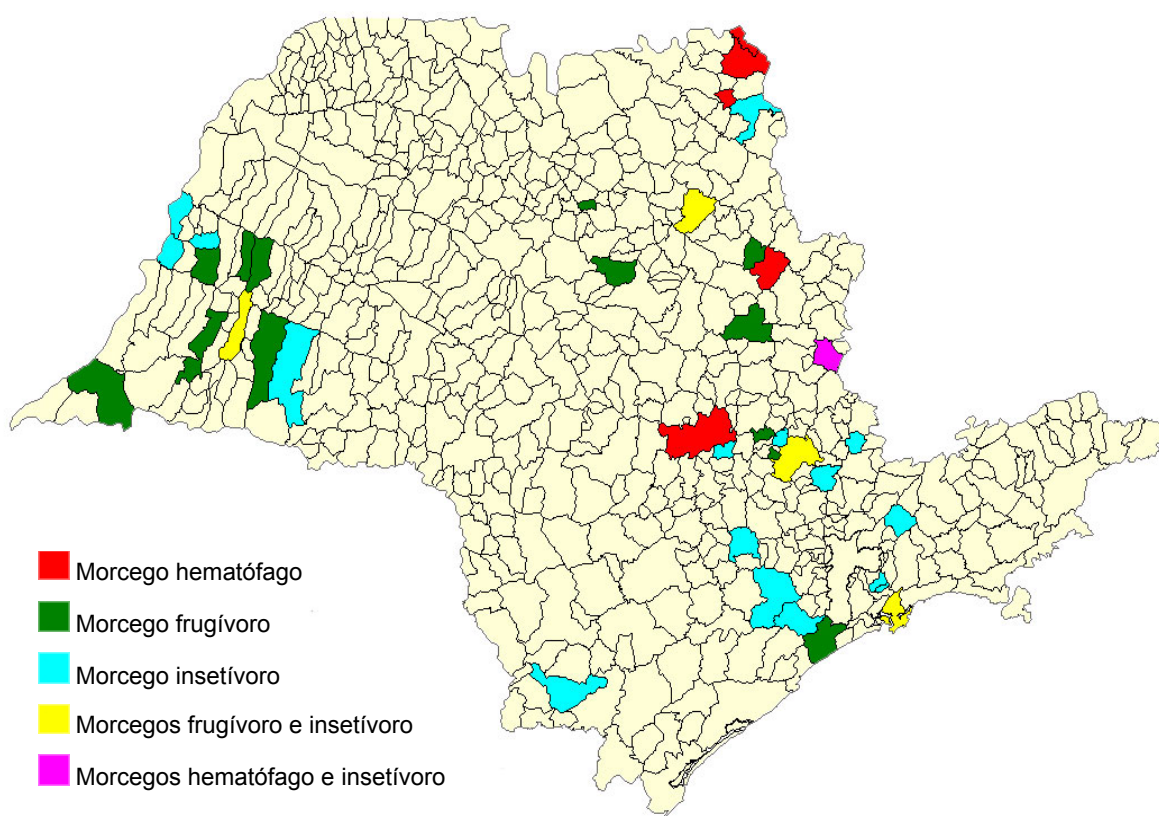


Figura 2 - Municípios do Estado de São Paulo: procedência de morcegos de diferentes hábitos alimentares, diagnosticados positivos para raiva, pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

### 3.2 Vírus CVS/31

O vírus fixo utilizado na prova de IFD para a obtenção da suspensão de vírus para o processo de absorção do conjugado anti-rábico foi o Challenge Virus Standard (CVS), amostra CVS/31, procedente do extinto Centro Panamericano de Zoonoses - CEPANZO, adaptado em cérebro de camundongo, apresentando título de  $10^6 \text{DLIC}_{50}/0,03 \text{ mL}$ .

### 3.3 Inóculos

Os fragmentos de tecidos do cérebro, glândula salivar, músculo peitoral, coração, pulmão, estômago, rins, bexiga, trato genital, língua e gordura interescapular foram macerados e acrescentados de diluente em uma diluição 1:5 (suspensão a 20%) para serem inoculados em camundongos e em cultura de células N2A, conforme as metodologias descritas respectivamente por Koprowski (1996) e Webster e Casey (1996).

### 3.4 Diluente para isolamento de vírus

Utilizou-se como diluente uma solução fisiológica a 0,85%, adicionada de 2% de soro fetal bovino, isento de anticorpos anti-rábicos e 1mL de gamicina por 1 litro de diluente. Após o preparo este diluente foi acondicionado em congelador à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para uso, foi descongelado



previamente e mantido em geladeira à 4°C, para ser empregado no preparo das suspensões dos órgãos.

### 3.5 Conjugado imunofluorescente

Utilizou-se o conjugado policlonal antinucleocapsídeo, produzido com soro hiperimune de coelho pelo Instituto Pasteur de São Paulo, em uma diluição variando de 1:90 a 1:120, conforme o lote utilizado, com a suspensão de cérebro normal de camundongo (SCN) e suspensão de cérebro de camundongo infectado com vírus CVS (SCVS).

### 3.6 Cultura de células de neuroblastoma murino-N2A

A cultura de células utilizada neste trabalho foi a de neuroblastoma murino (N2A), proveniente do ATCC – Virginia, EUA, e foi armazenada em N2 líquido até o momento do uso, foram inoculadas a partir da passagem 182.

### 3.7 Imunofluorescência direta (IFD)

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência direta descrita por Dean; Abelseth e Atanasiu (1996). De cada material, foram obtidas impressões de tecido por pressão, em lâminas de microscopia, em duplicata. Após a impressão, as lâminas foram fixadas em acetona à temperatura de -20°C, por 45 minutos e depois de secas, foram armazenadas a -20°C e processadas posteriormente. A leitura da reação foi realizada em microscópio de imunofluorescência LEICA DMBL, com lâmpada HBO-50, com aumento de 400X.

### 3.8 Inoculação intracerebral em camundongos (IIC)

Utilizou-se à técnica descrita por Koprowski (1996). Os camundongos empregados foram obtidos do biotério do Instituto Pasteur de São Paulo, albinos suíços de 21 dias de idade, com peso entre 12 e 14 gramas e inoculados via intracerebral com 0,03mL de inóculo. Foram utilizados grupos de 5 a 7 indivíduos por amostra. Após a inoculação, realizou-se a observação diária destes animais, durante 30 dias. Para a confirmação da presença do vírus da raiva nos animais que morreram no período de observação, os cérebros foram submetidos à técnica de IFD.

### 3.9 Inoculação em cultivo celular (ICC)

Foi utilizada a técnica descrita por Webster e Casey (1996), modificada pelo Instituto Pasteur, na qual utilizaram-se placas Costar ou similar, com 96 orifícios de fundo chato. Em um orifício colocou-se 40µl do inóculo, previamente preparado, e adicionou-se 160µl de meio essencial mínimo (MEM) acrescentado com gentamicina e aminoácidos não essenciais. Após a homogeneização, acrescentou-se 100µl (contendo  $5 \times 10^5$  células) de suspensão de células N2A, em cada orifício. Cada amostra foi testada em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C, por 96 horas. Aspirou-se o sobrenadante com bomba a vácuo e fixaram-se as células em acetona 80%, gelada, por 15 minutos (em banho de gelo). As placas foram secas e colocou-se o conjugado anti-rábico na diluição de 1:90, incubando-se, novamente, as placas a 37°C, por 1 hora. Desprezou-se o sobrenadante, por inversão das placas, e estas foram lavadas 3 vezes em solução salina tamponada (PBS) 0,1 molar e 3 vezes em água destilada. Após secadas as placas, colocou-se glicerina tamponada pH 8.5, para leitura. A leitura da reação foi realizada em microscópio invertido LEICA DML, de fluorescência, com lâmpada HBO-50, com aumento de 200X.

### 3.10 Determinação do período de mortalidade da raiva em camundongos

Após a inoculação intracerebral dos camundongos com inóculos preparados a partir de diferentes tecidos e órgãos de morcegos, estes foram observados diariamente, para a avaliação do período de mortalidade. Definiu-se como período mínimo de mortalidade o período compreendido

entre a inoculação e a data do primeiro óbito, e o período máximo de mortalidade, o período entre a inoculação e a data do último óbito.



Figura 3 - Colheita do cérebro de um morcego insetívoro enviado para o diagnóstico da raiva, Instituto Pasteur de São Paulo - São Paulo - 2005



Figura 4 - Identificação do morcego enviado para o diagnóstico da raiva, Instituto Pasteur de São Paulo - São Paulo - 2005

---

## **RESULTADOS**

#### 4 RESULTADOS

Dos 4.393 morcegos submetidos à prova de IFD para o diagnóstico da raiva no Setor de Diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo, 82 (1,87%) resultaram positivos para a pesquisa do vírus da raiva, conforme ilustrado na tabela 1. Destes, 3.978 (90,55%) eram morcegos não hematófagos e 415 (9,45%), morcegos hematófagos. Dentre os morcegos não hematófagos, 76/3.978 (1,91%) foram diagnosticados positivos e, 6/415 (1,44%), entre os hematófagos. Do total de morcegos com diagnóstico positivo para raiva, 76/82 (92,68%) eram de morcegos não hematófagos e 6/82 (7,32%), de morcegos hematófagos.

Tabela 1 – Distribuição dos morcegos hematófagos e não hematófagos em reagentes e não reagentes à prova de imunofluorescência direta (IFD) aplicada à raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Morcegos	Reagentes à IFD	%	Não reagentes à IFD	%	Total	%
Hematófagos	6	0,14	409	9,31	415	9,45
Não hematófagos	76	1,73	3.902	88,82	3.978	90,55
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>1,87</b>	<b>4.311</b>	<b>98,13</b>	<b>4.393</b>	<b>100,00</b>

Os morcegos positivos para a raiva com a técnica de IFD foram classificados em 10 gêneros diferentes e em três hábitos alimentares distintos, conforme ilustrado na tabela 2.

Tabela 2 – Classificação, em gênero e hábito alimentar, de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Morcegos Gênero	Hábito alimentar	Número de espécimes (n)	Reagentes (%)
<i>Artibeus sp</i>	frugívoro	33	40,24
<i>Myotis sp</i>	insetívoro	15	18,29
<i>Eptesicus sp</i>	insetívoro	10	12,20
<i>Desmodus</i>	hematófago	6	7,32
<i>Lasiurus sp</i>	insetívoro	5	6,10
<i>Nyctinomops sp</i>	insetívoro	4	4,88
<i>Tadarida sp</i>	insetívoro	4	4,88
<i>Histiotus sp</i>	insetívoro	3	3,65
<i>Molossus sp</i>	insetívoro	1	1,22
<i>Eumops sp</i>	insetívoro	1	1,22
<b>Total</b>		<b>82</b>	<b>100,00</b>

De acordo com o hábito alimentar, os morcegos insetívoros foram os que apresentaram maior número de isolamentos positivos (43/82 ou 52,44%), predominando as espécies dos gêneros *Myotis sp* (15/82 ou 18,29%) e *Eptesicus sp* (10/82 ou 12,20%). Entre os frugívoros, foram encontrados 33/82 positivos (40,24%), sendo 100,00% do gênero *Artibeus sp*. Por sua vez, todos os morcegos hematófagos (6/82) foram identificados como sendo *Desmodus rotundus*.

Em virtude do mal estado de conservação dos morcegos, dos 82 positivos, nem todos os tecidos e órgãos não nervosos estavam em estado aproveitável para serem submetidos à prova de isolamento do vírus em camundongos e cultivo celular, conforme ilustrados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Distribuição conforme o estado de adequação e viabilidade dos tecidos e órgãos de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), submetidos à prova de inoculação intracerebral em camundongos (IC), no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Tecidos e órgãos	Inoculação intracerebral em camundongos (IC)			
	Adequado/viável	%	Inadequado/inviável	%
Rim	80	97,56	2	2,44
Bexiga	79	96,34	3	3,66
Coração	79	96,34	3	3,66
Pulmão	79	96,34	3	3,66
Cérebro	76	92,68	6	7,32
Glândula salivar	76	92,68	6	7,32
Língua	76	92,68	6	7,32
Músculo peitoral	75	91,46	7	8,54
Gordura interescapular	66	80,49	16	19,51
Estômago	65	79,27	17	20,73
Trato genital	55	67,08	27	32,92

De maneira semelhante à tabela 3, estão ilustradas na tabela 4, informações relativas a respeito da viabilidade dos espécimes submetidos à inoculação em cultura de células N2A, de suspensões preparadas a partir de tecidos e órgãos de morcegos com diagnóstico positivo para a raiva pela prova de IFD.

Tabela 4 - Distribuição conforme o estado de adequação e viabilidade dos tecidos e órgãos de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), submetidos à prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), no Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Tecidos e órgãos	Inoculação em cultura de células N2A (ICC)			
	Adequado/viável	%	Inadequado/inviável	%
Rim	42	51,22	40	48,88
Bexiga	63	76,83	19	23,27
Coração	40	48,88	42	51,22
Pulmão	43	52,44	39	47,66
Cérebro	67	81,71	15	18,29
Glândula salivar	64	78,05	18	21,95
Língua	57	69,51	25	30,49
Músculo peitoral	45	54,87	37	45,13
Gordura interescapular	53	64,63	29	35,47
Estômago	36	43,90	46	56,10
Trato genital	43	52,44	39	47,66



Os resultados da inoculação de tecidos e órgãos de morcegos positivos à raiva pela prova de IFD, no sistema camundongo, estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição dos tecidos e órgãos positivos e negativos à prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Tecidos e órgãos	Inoculação intracerebral em camundongos (IIC)			
	Positivos/inoculados	%	Negativos/inoculados	%
Rim	9/80	11,25	71/80	88,75
Bexiga	23/79	29,11	56/79	70,99
Coração	20/79	25,37	59/79	74,73
Pulmão	18/79	22,78	61/79	77,22
Cérebro	68/76	89,47	8/76	10,53
Glândula salivar	44/76	57,89	32/76	42,11
Língua	25/76	32,89	51/76	67,11
Músculo peitoral	1/75	1,33	74/75	98,77
Gordura interescapular	16/66	24,24	50/66	75,76
Estômago	2/65	3,08	63/65	96,92
Trato genital	3/55	5,45	52/55	94,55

A representação gráfica dos resultados de IIC, de tecidos e órgãos de morcegos positivos para a raiva, está ilustrada no gráfico 1.

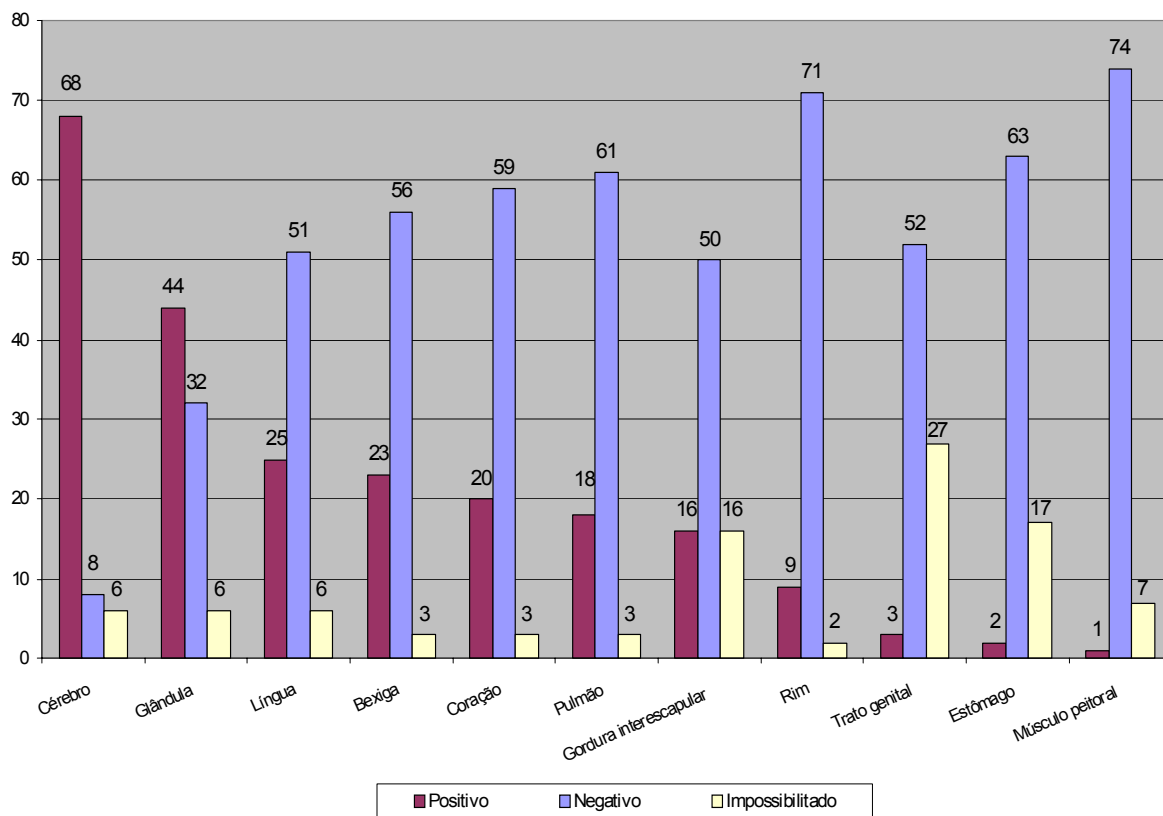


Gráfico 1 - Distribuição de amostras de tecidos e órgãos de morcegos positivos para a prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo – 2005

De maneira semelhante, os resultados da ICC, de materiais procedentes de tecidos e órgãos de morcegos com diagnóstico positivo para raiva pela técnica de IFD, estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição dos tecidos e órgãos positivos e negativos à prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), de morcegos reagentes à raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), no Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Tecidos e órgãos	Inoculação em cultura de células N2A (ICC)			
	Positivos/inoculados	%	Negativos/inoculados	%
Rim	7/42	16,67	35/42	83,33
Bexiga	7/63	11,11	56/63	88,99
Coração	6/40	15,00	34/40	85,00
Pulmão	21/43	48,83	22/43	51,17
Cérebro	56/67	83,58	11/67	16,42
Glândula salivar	29/64	45,31	35/64	54,68
Língua	10/57	17,50	47/57	82,50
Músculo peitoral	4/45	8,89	41/45	91,11
Gordura interescapular	13/53	24,53	40/53	75,47
Estômago	4/36	11,11	32/36	88,89
Trato genital	6/43	13,95	37/43	86,05

No gráfico 2 estão ilustrados os resultados da prova de ICC, de tecidos e órgãos colhidos de morcegos previamente identificados como positivos para raiva, pela prova de IFD aplicada nos materiais cerebrais.

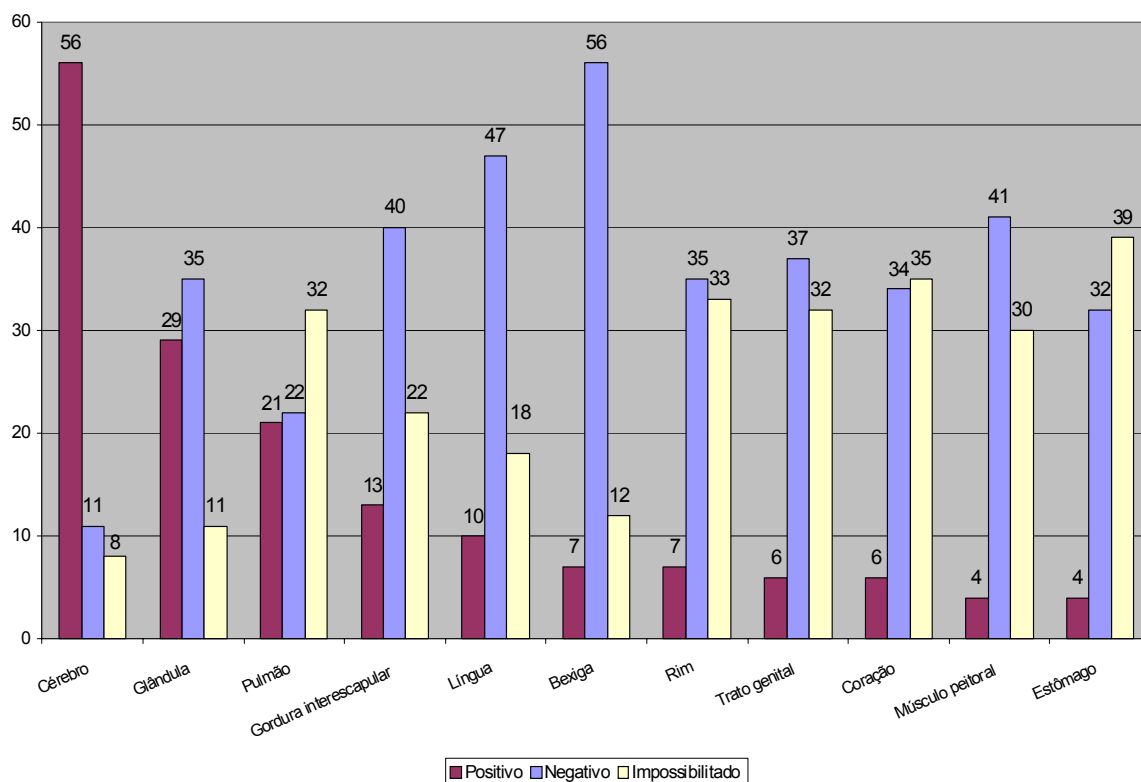


Gráfico 2 - Distribuição dos tecidos e órgãos de morcegos positivos para a prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Das 82 amostras de cérebros positivas para raiva, 76 foram inoculadas em camundongos, obtendo 68 (89,47%) isolamentos positivos e das 67 amostras inoculadas em células, 56 (83,58%) foram positivas. Com as glândulas salivares, do total de 76 amostras inoculadas em camundongos, 44 (57,89%) foram positivas e em cultura de células, de 64 amostras inoculadas, foram constatadas apenas 29 (45,31%) positivas.

O isolamento do vírus da raiva em camundongos, a partir de outros órgãos como a língua, resultou em uma positividade de 32,89%, seguida pela bexiga com 29,11%, coração, pulmão e gordura

interescapular com 25,37%, 22,78% e 24,24% respectivamente. Em menor freqüência foi possível o isolamento de vírus da raiva no rim, no trato genital, no estômago e no músculo peitoral. Por sua vez, em cultura celular, o pulmão foi encontrado com uma positividade de 48,83%, gordura interescapular com 24,53%; a língua com 17,50%, o coração com 15,00% e os demais, com menor freqüência.

O período de mortalidade das amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos foi estudado em camundongos utilizando inóculos preparados a partir dos cérebros e glândulas salivares de 74 espécimes, porém, a observação foi possível em apenas 40 espécimes. O período mínimo de mortalidade das amostras do cérebro, variou entre 7 e 20 dias e o período máximo, entre 10 e 27 dias. Por sua vez, as amostras de glândulas salivares tiveram uma variação no período mínimo, de 7 e 26 dias, e no período máximo, de 9 e 31, conforme resumidos na tabela 7.

Tabela 7 – Média aritmética e desvio padrão dos períodos de mortalidade, mínimos e máximos, observados em camundongos inoculados intracerebralmente com suspensões de cérebros e de glândulas salivares de morcegos de diferentes hábitos alimentares, Instituto Pasteur de São Paulo, no período abril a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Períodos de mortalidade em camundongos (dias)					
Hábito alimentar	Número de morcegos (n)	Cérebro		Glândula salivar	
		Mínimo $\bar{X} \pm DP$	Máximo $\bar{X} \pm DP$	Mínimo $\bar{X} \pm DP$	Máximo $\bar{X} \pm DP$
Hematófagos	3	10,67±1,52	15,33±2,08	10,00±0,00	11,33±2,30
Insetívoros	22	13,14±3,41	16,45±4,48	14,63±5,52	18,91±6,12
Frugívoros	15	10,33±2,02	12,60±2,13	12,93±3,28	15,67±4,82

<sup>1</sup>  $\bar{X} \pm DP$  = média aritmética ± desvio padrão

No gráfico 3 estão ilustradas as médias aritméticas, dos períodos de mortalidade, mínimos e máximos, observados em camundongos, com a inoculação intracerebral de suspensões cerebrais de morcegos de diferentes hábitos alimentares.

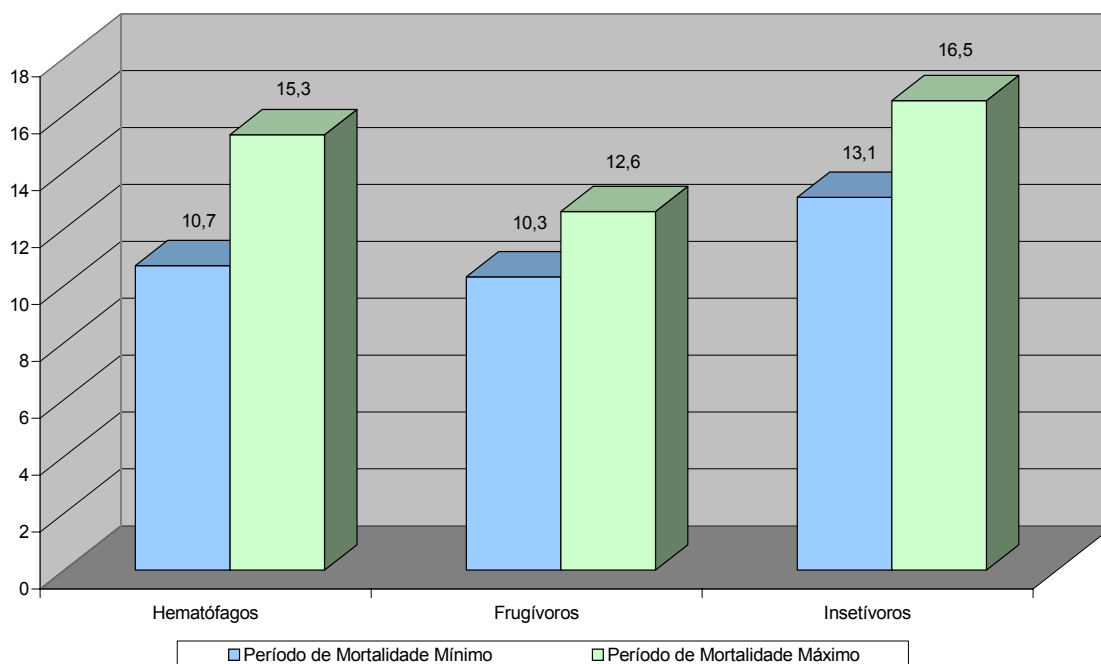


Gráfico 3 - Média aritmética dos períodos de mortalidade, mínimos e máximos, correspondente aos camundongos inoculados intracerebralmente com suspensões de cérebros de morcegos de diferentes hábitos alimentares, Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

De maneira similar, no gráfico 4 estão ilustradas as médias aritméticas dos períodos de mortalidade, mínimos e máximos, observados em camundongos, com a inoculação intracerebral de suspensões de glândulas salivares de morcegos de diferentes hábitos alimentares.

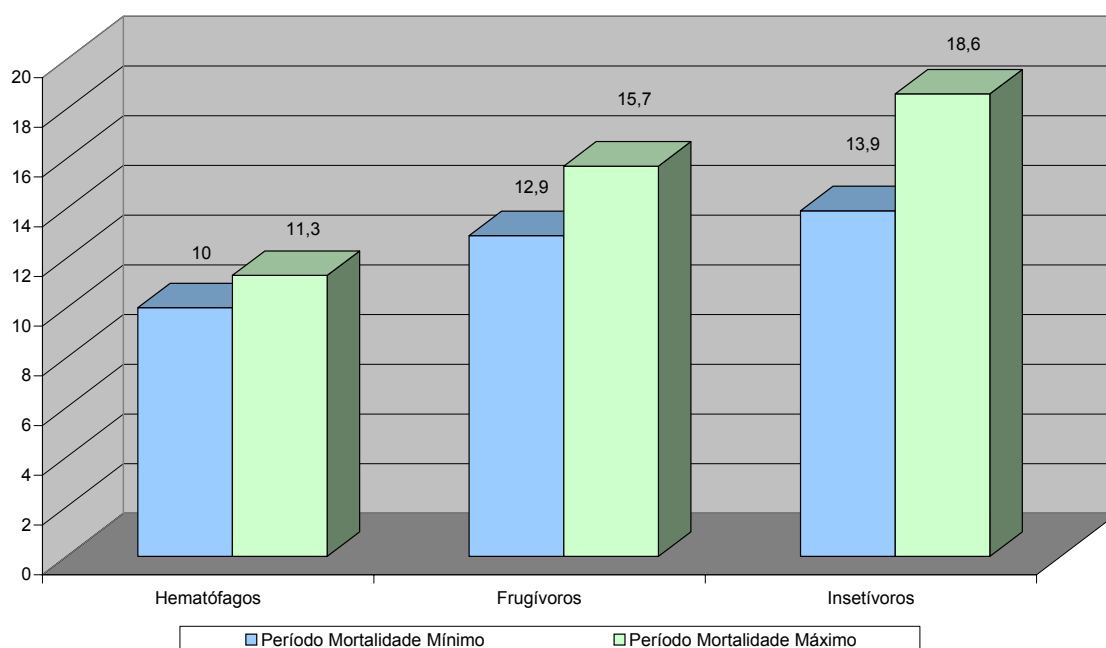


Gráfico 4 - Média aritmética dos períodos de mortalidade, mínimos e máximos, correspondente aos camundongos inoculados intracerebralmente com suspensões de glândulas salivares de morcegos de diferentes hábitos alimentares, Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

A proporção de camundongos mortos, observada após a inoculação intracerebral em camundongos com as suspensões de cérebros e de glândulas salivares está apresentada na tabela 8.

Tabela 8 - Proporção de camundongos mortos por inoculados, em porcentagem (%), após inoculação intracerebral de suspensões de cérebros e de glândulas salivares de morcegos de diferentes hábitos alimentares, Instituto Pasteur de São Paulo, período de abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

<b>Proporção de mortos por camundongos inoculados</b>			
<b>Morcegos: hábito alimentar</b>	<b>Número (n)</b>	<b>Cérebros (%)</b>	<b>Glândulas Salivares (%)</b>
<b>Hematófagos</b>	1	100,0	100,0
	2	100,0	100,0
	3	100,0	100,0
<b>Insetívoros</b>	1	100,0	100,0
	2	100,0	100,0
	3	100,0	100,0
	4	100,0	50,0
	5	100,0	83,3
	6	100,0	80,0
	7	100,0	16,7
	8	100,0	40,0
	9	100,0	100,0
	10	100,0	85,7
	11	12,5	50,0
	12	71,4	100,0
	13	100,0	100,0
	14	100,0	66,7
	15	100,0	100,0
<b>Frugívoros</b>	16	100,0	100,0
	17	100,0	80,0
	18	100,0	100,0
	19	100,0	100,0
	20	100,0	14,3
	21	100,0	100,0
	22	80,0	100,0
	1	100,0	100,0
	2	85,7	100,0
	3	100,0	100,0
	4	100,0	100,0
	5	100,0	100,0
	6	100,0	100,0
	7	100,0	100,0
	8	100,0	100,0
9	100,0	100,0	
10	100,0	100,0	
11	100,0	100,0	
12	100,0	14,3	
13	100,0	100,0	
14	100,0	100,0	
15	100,0	83,3	



Do total de morcegos positivos (82), apenas em 32 (39,0%) deles havia a informação se os mesmos tinham sido encontrados mortos (10) ou se haviam sido capturados e sacrificados em seguida (22). Dos animais encontrados mortos, 6 eram frugívoros e 4 insetívoros e, dos sacrificados, 4 eram frugívoros, 5 eram hematófagos e 13 eram insetívoros, conforme a tabela 9. Os restantes 61,0% não possuíam nenhuma informação.

Tabela 9 – Distribuição de morcegos com histórico de encontrados mortos, sacrificados e ignorados, segundo o hábito alimentar e com diagnóstico positivo para raiva, Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

Hábito alimentar	Encontrados mortos	Sacrificados	Ignorados	Total
Frugívoros	6	4	23	33
Insetívoros	4	13	26	43
Hematófagos	0	5	1	6
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>22</b>	<b>50</b>	<b>82</b>

O gráfico 5 ilustra os resultados da IIC, de tecidos e órgãos obtidos de morcegos hematófagos que haviam sido previamente diagnosticados positivos para raiva, pela prova de IFD aplicada aos fragmentos de cérebros.

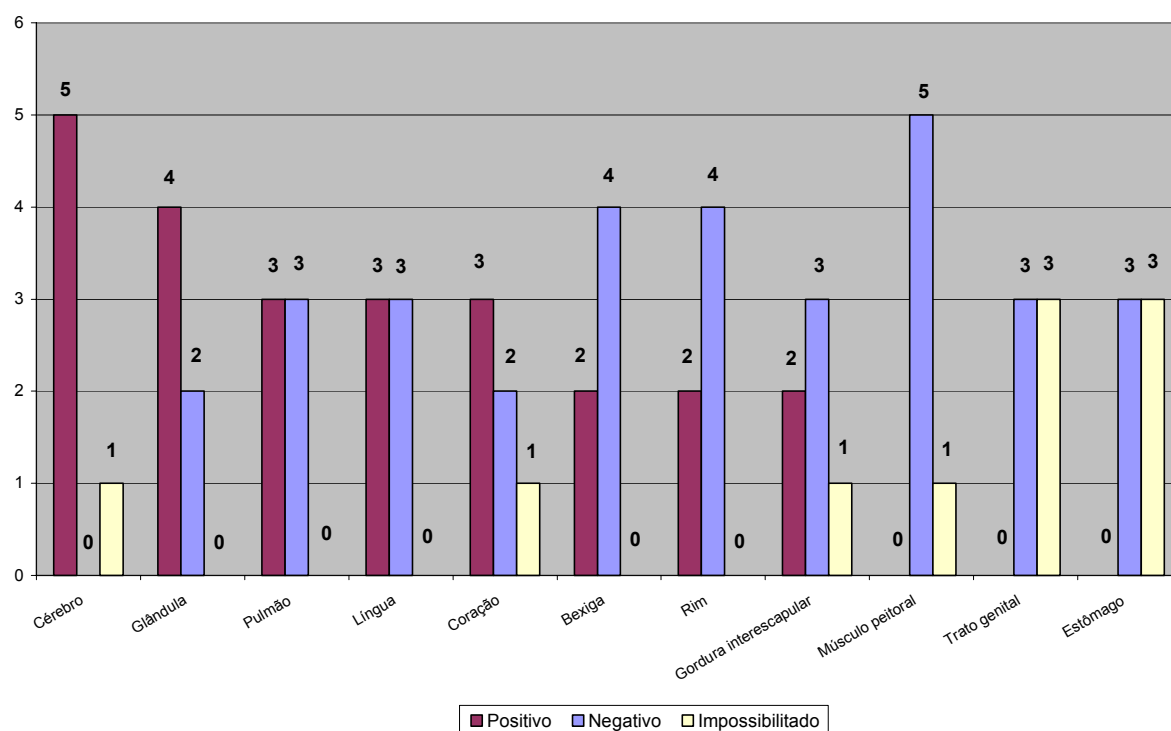


Gráfico 5 - Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), obtidos de morcegos hematófagos com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

De maneira semelhante, informação relativa à inoculação em camundongos, de tecidos e órgãos obtidos de morcegos insetívoros, está ilustrada no gráfico 6.

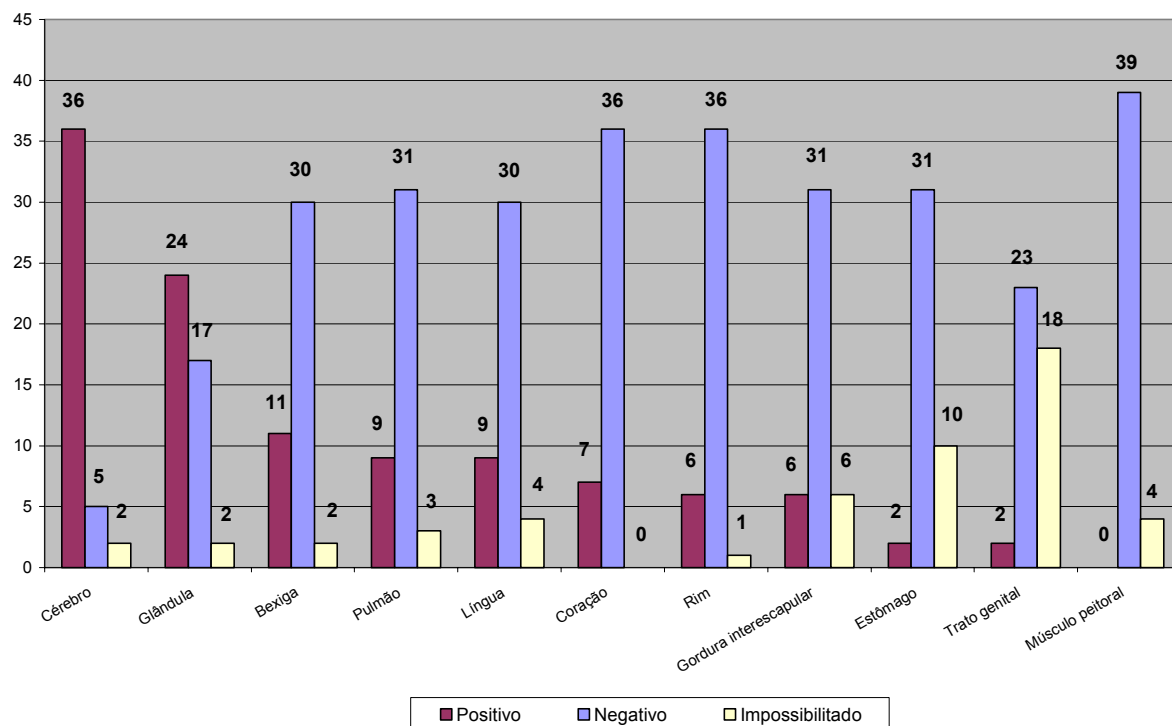


Gráfico 6 – Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), obtidos de morcegos insetívoros com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

No gráfico 7, está ilustrado o resultado da inoculação, em camundongos, de tecidos e órgãos procedentes de morcegos frugívoros.

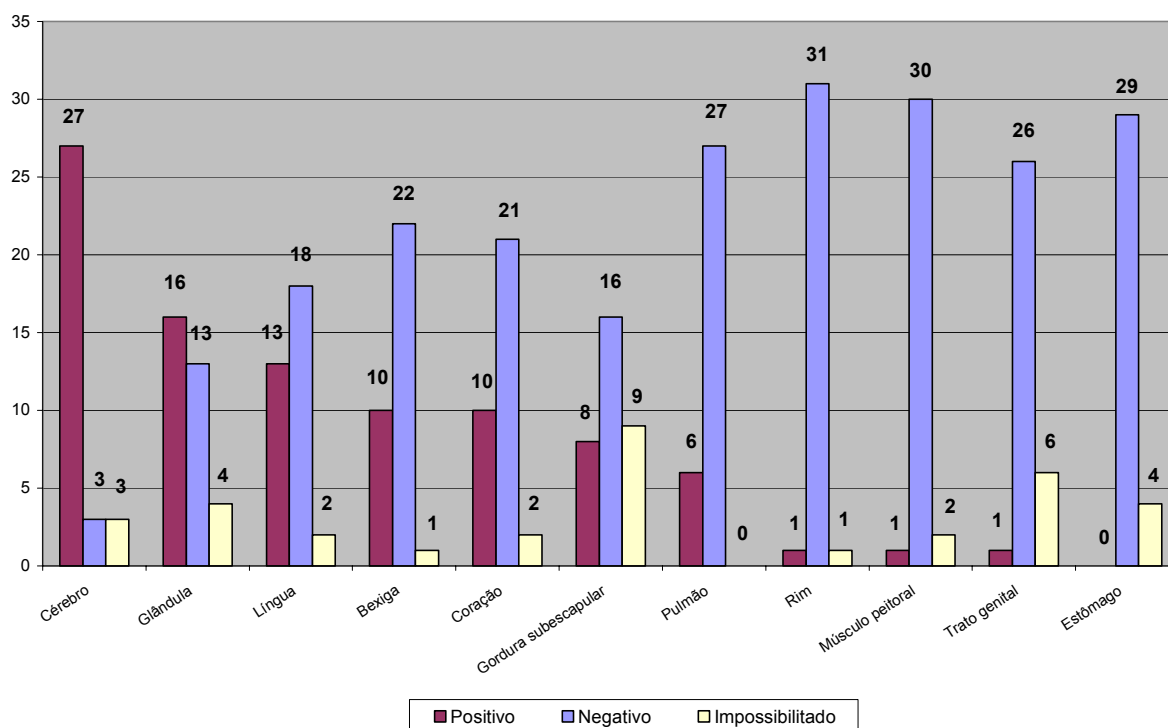


Gráfico 7 – Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC), obtidos de morcegos frugívoros com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

O gráfico 8 apresenta o resultado da inoculação de tecidos e órgãos de morcegos hematófagos em cultura de células N2A.

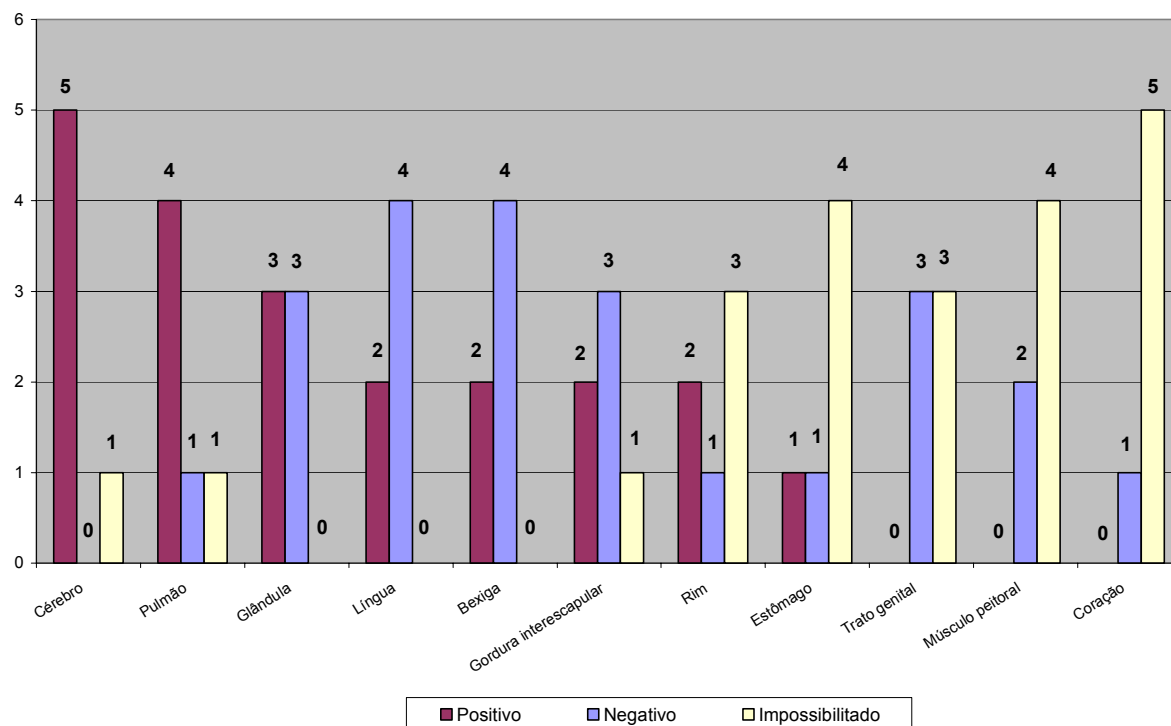


Gráfico 8 - Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), obtidos de morcegos hematófagos com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

No gráfico 9 está ilustrado o resultado da inoculação em cultura de células N2A, de tecidos e órgãos procedentes de morcegos insetívoros.

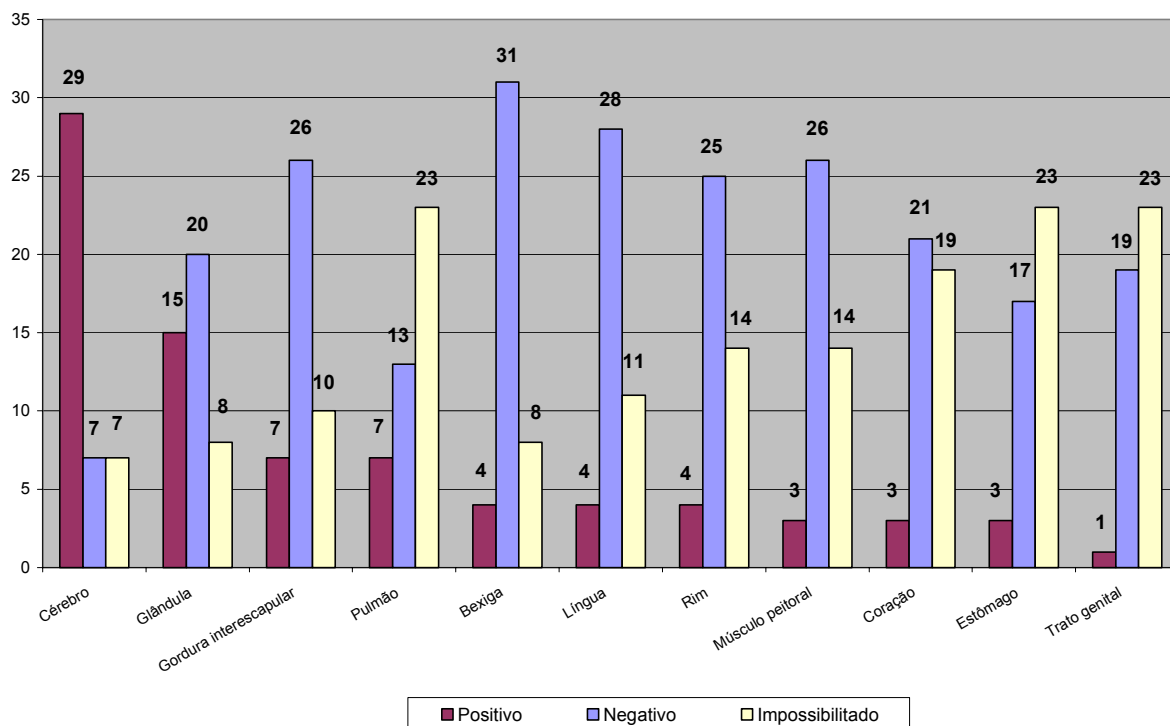


Gráfico 9 – Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), obtidos de morcegos insetívoros com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

No gráfico 10 está apresentado o resultado da inoculação em cultura de células N2A, de tecidos e órgãos colhidos de morcegos frugívoros.

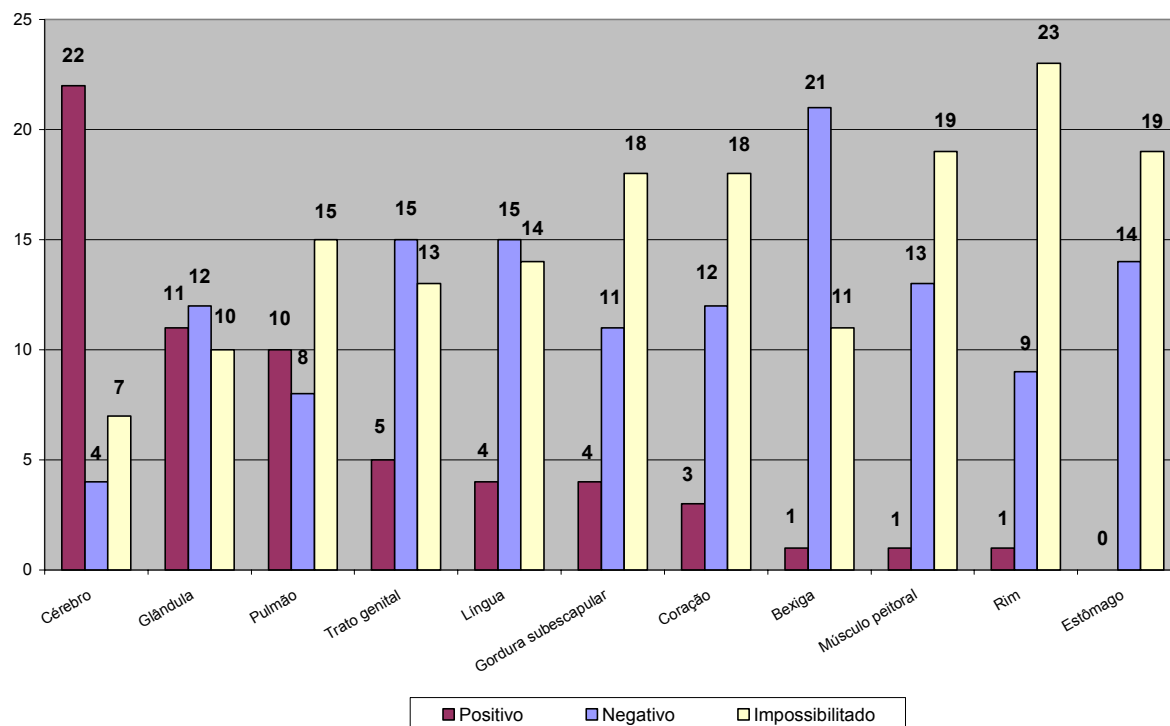


Gráfico 10 – Distribuição dos tecidos e órgãos positivos, negativos e impossibilitados na prova de inoculação em cultura de células N2A (ICC), obtidos de morcegos frugívoros com diagnóstico positivo para raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), Instituto Pasteur de São Paulo, abril de 2002 a novembro de 2003 - São Paulo - 2005

---

**DISCUSSÃO**



## 5 DISCUSSÃO

Dentre os 4.393 morcegos recebidos pela Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo, no período de abril de 2002 a novembro de 2003, 82 (1,87%) reagiram positivamente à prova de IFD. Esta proporção de reagentes positivos não pode ser interpretada como prevalência "real" da raiva em morcegos no Estado de São Paulo, pois, refere-se tão somente à prevalência "aparente" do teste de IFD. De acordo com Baer (1975a), nos levantamentos realizados na década de 1950 e 1960 nos Estados Unidos, a prevalência aparente da raiva em morcegos não hematófagos era variável, porém usualmente inferior a 1%. Ainda de acordo com os estudos da década de 1950 realizados nos Estados Unidos, a "prevalência" era variável conforme o hábito solitário ou gregário dos morcegos, pois, até 25% dos morcegos de hábito solitário foram encontrados positivos, enquanto que menos de 1% dos morcegos capturados de grandes colônias apresentavam a infecção pelo vírus da raiva. No presente estudo, 40,24% dos morcegos positivos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Artibeus* sp; 52,44% positivos nos morcegos insetívoros como *Myotis* sp, *Epitesicus* sp, *Lasiurus* sp, *Nyctinomops* sp, *Tadarida* sp, *Histiotus* sp, *Molossus* sp e *Eumops* sp e 7,32% positivos nos hematófagos. Estes morcegos são de hábito sinantrópico, fato compreensível, pois, os mesmos foram enviados ao Instituto Pasteur para o diagnóstico da raiva, na maioria das vezes com histórico de contato ou agressão às pessoas ou animais domésticos, ou foram capturados para fins de vigilância epidemiológica, de ambientes urbanos ou rurais, de fácil localização e captura.

Conforme o hábito alimentar, os morcegos insetívoros foram os mais numerosos, totalizando 43 ou 52,44% dentre os positivos, fato previsível por serem estes morcegos os de maior densidade demográfica em nosso meio (TADDEI, 1996). Entre os frugívoros, foram encontrados 33 (40,24%) positivos para raiva, sendo 100,00% do gênero *Artibeus* sp, e todos os morcegos hematófagos (6/82) foram identificados como sendo *Desmodus rotundus*. Os morcegos *Artibeus lituratus* e os *Desmodus rotundus*, que foram motivos de contestação no início do século passado, inclusive chamado de

"fantasia tropical" quando da comunicação de Carini (1911) sobre o papel desempenhado pelos morcegos hematófagos na raiva, têm apresentado infecção pelo vírus da raiva com um perfil determinado, identificado com painel de anticorpos monoclonais (Mabs), e a variante do vírus é conhecida por variante 3, ou variante *Desmodus rotundus* (DELPIETRO et al., 1997). Por outro lado, a análise filogenética das amostras de vírus da raiva de *Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris* isoladas do Estado de São Paulo revelou que os vírus possuem semelhança com as amostras de vírus isoladas de morcegos *Desmodus rotundus* (SHOJI et al., 2004). Estudos semelhantes envolvendo amostras de vírus isoladas de morcegos *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata* não têm sido conduzidas na América Latina e nem mesmo no Brasil, dada a pouca oportunidade de diagnosticar raiva nestas espécies de morcegos ou devido à inexistência de amostras isoladas destes morcegos e preservadas nos laboratórios.

Na América Latina, a presença do vírus da raiva em morcegos hematófagos já era conhecida desde o século passado e no Brasil, Torres e Queiroz Lima (1935) relataram o isolamento a partir do morcego *D. ecaudata* e Silva e Souza (1968a), do *D. youngi* procedente do Estado de Alagoas. Apesar da infecção do vírus da raiva nestes morcegos hematófagos ter sido constatada na década de 30 do século passado, Acha e Málaga-Alba (1988, p. 210) afirmaram: "Although there are three species of vampire bats, *Desmodus rotundus*, the common vampire bat, has received prime attention, almost to the exclusion of *Diaemus youngi* and *Diphylla ecaudata*".

E dentre as recomendações apresentadas, pelos mesmos autores (ACHA; MÁLAGA-ALBA, 1988, p. 213), em relação à pesquisa de morcegos hematófagos:

It is evident throughout this book that there is little information regarding the natural history and ecology of the white-winged vampire bat, *Diaemus youngi*, and the hairy-legged vampire, *Diphylla ecaudata*. Both species are known to prey upon domestic animals and occasionally Man.

Mesmo na atualidade, existem controvérsias a respeito do sanguivorismo praticado por estas duas espécies de morcegos hematófagos, alguns afirmam que são exclusivamente ornitófilos, embora

haja relatos de predação em mamíferos domésticos e silvestres (GREENHALL, 1988). No presente estudo, todos os morcegos hematófagos, no total de 415 exemplares, eram *D. rotundus*. O fato é explicável, pois, a legislação do IBAMA e a orientação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2004), dentro do Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros - PNCRH, em execução pelo governo brasileiro, o controle utilizando pasta anticoagulante é realizado apenas na população de *D. rotundus*. Por causa desta recomendação restritiva, os exemplares de morcegos hematófagos que chegam ao laboratório, mesmo sendo de referência nacional, como o do Instituto Pasteur de São Paulo, não incluem as duas espécies a não ser o *D. rotundus*, isto é, continua válida a afirmação de Acha e Málaga-Alba (1988): "... almost to the exclusion of *Diaemus youngi* and *Diphylla ecaudata*". Sendo assim, dificilmente um laboratório de diagnóstico terá oportunidades de encontrar o vírus da raiva nestas espécies, como foram relatados no passado por Torres e Queiroz Lima (1935) e Silva e Souza (1968a) e pode significar a manutenção da lacuna em relação ao conhecimento da epidemiologia da raiva envolvendo os morcegos *D. ecaudata* e *D. youngi*.

O Mokola vírus (MOKV), genótipo III do *Lyssavirus*, foi descrito na literatura como sendo um vírus viscerotrópico, porém, pelos dados da Tabela 3, pode-se depreender que os vírus do genótipo I ou os vírus clássicos de raiva isolados de morcegos do Estado de São Paulo também são viscerotrópicos. No entanto, para fins de isolamento do vírus da raiva, o material mais indicado continua sendo o cérebro, tanto em camundongos como também em cultivo celular. Em seguida, a glândula salivar foi o que apresentou melhor resultado, no sistema camundongo. Porém, em células N2A, o segundo material com maior positividade foi do pulmão. Em muitas oportunidades, não foi possível isolar o vírus em células devido à contaminação bacteriana, mesmo com uso de uma alta concentração de antibióticos, especialmente quando os materiais eram retirados de animais com histórico de terem sido "encontrados mortos". Nos casos de isolamento positivo em células, 96 horas de observação foram suficientes, embora Webster e Casey (1988) tenham encontrado 4 dias como sendo o período

ideal para o isolamento de vírus da raiva, especialmente de amostras com quantidade muito pequena de vírus.

O uso de sistema de cultivo celular para o diagnóstico da raiva tem sido defendido por muitos profissionais e ONGs preocupados com o uso de animais na experimentação e na pesquisa científica, porém, conforme argumentado por Carvalho (2002), a técnica de cultivo celular para fins diagnósticos é mais um procedimento alternativo, indicado para poucos laboratórios, como os de referência nacional. De fato, no presente estudo, de 76 suspensões de cérebros inoculados em camundongos, 68 (89,47%) reagiram positivamente e, se baseado unicamente nesta prova, 8 seriam diagnosticados como negativos ou impossibilitados, ficando sem diagnóstico. Por sua vez, no sistema celular, 56/67 (83,58%) reagiram positivamente e 11 (16,42%) ficariam sem resultado diagnóstico. No caso das glândulas salivares, 42,10% ficariam sem o diagnóstico na inoculação em camundongos e 54,69%, na inoculação em cultivo celular.

No mundo, são poucos os países que utilizam a técnica de ICC como técnica de rotina no diagnóstico da raiva, conforme informado no documento intitulado *World Survey of Rabies No. 35 for the year 1999*: dentro de 193 países membros da OMS, os países em desenvolvimento que relataram o uso da técnica da inoculação em cultura de células, além da IFD e IIC, foram a República Centro Africana, África do Sul, Tunísia, Zimbábue e República Islâmica do Irã. Por outro lado, dentre os países europeus que relataram o uso de células estão: Alemanha, Bélgica, Dinamarca, Espanha, Finlândia, França, Hungria, Irlanda, Suécia e Suíça (WHO, 2002).

No presente estudo não foi encontrado nenhum morcego com ausência de vírus no cérebro e com presença na glândula salivar ou em outros órgãos, como os relatados por Delpietro et al.<sup>7</sup> (1972), apud Baer (1975b, p. 170). Pelos resultados da tabela 8, pode-se perceber que os cérebros de morcegos insetívoros, números 11, 12 e 22 e do frugívoro número 2, apresentaram proporção de mortos inferior que os espécimes da glândula salivar. Porém, o inverso, isto é, a proporção de mortos

---

<sup>7</sup> DELPIETRO, H.; DÍAZ, A. M. O.; FUENZALIDA, E.; BELL, J. F. Determination of rate of rabies attack in bats. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, v. 73, p. 222-230, 1972.

das glândulas salivares foi inferior que a dos cérebros em 11 inoculações. O fato de ter encontrado presença de vírus da raiva em determinado órgão e ausente no SNC pode acontecer na rotina diagnóstica, pois muitos fatores interferem para o resultado de inoculação e na prova de detecção do antígeno. Para Webster e Casey (1988), o resultado negativo na IFD pode ser em consequência de quantidade muito reduzida do vírus presente no tecido cerebral.

A avaliação do período de incubação da raiva em camundongos é difícil, pois, o problema está em poder detectar o momento exato do início dos sinais ou sintomas. Há também casos em que os animais são encontrados mortos no momento da leitura, sem que houvesse alguma manifestação da doença na observação do dia anterior. Para tentar sanar esta dificuldade, foi estudado o período de mortalidade, termo este utilizado por Webster e Casey (1988).

Pela análise estatística realizada com os dados do presente estudo, os períodos de mortalidade encontrados para os cérebros e glândulas salivares de morcegos hematófagos não foram conclusivos, uma vez que o número "n" utilizado está aquém do recomendado e não passou pelo teste de normalidade. A análise de variância com teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer indicou haver significância estatística nas comparações realizadas com os períodos de mortalidade correspondentes às inoculações de suspensões de cérebros de morcegos insetívoros (períodos mínimos) versus glândulas salivares de morcegos insetívoros (períodos máximos) com  $p < 0,001$ ; cérebros de morcegos insetívoros (períodos máximos) versus cérebros de morcegos frugívoros (períodos mínimos) com  $p < 0,01$ ; glândulas salivares de morcegos insetívoros (períodos máximos) versus cérebros de morcegos frugívoros (períodos mínimos) com  $p < 0,001$ ; glândulas salivares de morcegos insetívoros (períodos máximos) versus glândulas salivares de morcegos frugívoros (períodos mínimos) com  $p < 0,01$  e glândulas salivares de morcegos insetívoros (períodos máximos) versus glândulas salivares de morcegos frugívoros (períodos mínimos) com  $p < 0,01$  (Apêndice A). Os resultados encontrados neste experimento corroboram os achados de Webster et al.<sup>8</sup> (1988), apud Webster e

---

<sup>8</sup> WEBSTER, W. A.; CHARLTON, K. M.; CASEY, G. A. *Can. J. Microbiol.*, in press, 1988.

Casey (1988, p. 205) e esta diferença pode ser em conseqüência da carga viral distinta presente no cérebro e na glândula salivar, presença de anticorpos neutralizantes nas suspensões de tecidos utilizados como inóculos ou temperatura ambiente elevada do biotério podem influenciar o início dos sinais clínicos, diminuição da mortalidade e aumenta a freqüência de infecção abortiva nos animais inoculados (WEBSTER; CASEY, 1988).

Os animais inoculados foram observados por um período de 30 dias e todas as amostras de vírus presentes no diferentes tecidos e órgãos causaram a morte dos mesmos dentro desse período, não sendo necessária a observação por um período mais prolongado. Conforme ilustrado na tabela 7, os períodos mínimos de mortalidade encontrados para os materiais do cérebro e da glândula salivar de morcegos de diferentes hábitos alimentares foram inferiores a 21 dias. O encurtamento de 9 dias na observação diária destes animais poderia significar uma economia nos gastos de manutenção e execução desta prova, se comparado com os 30 dias convencionais.

Após a realização da prova de IFD, para alguns morcegos de porte muito pequeno não sobraram materiais do cérebro para a realização da prova de inoculação em camundongos. É inegável que o material mais recomendado para fins de isolamento é o material do cérebro, no entanto, na falta desse material, poderia ser utilizado um *pool* de órgãos para tentar o isolamento do vírus, porém, o resultado esperado é que seja inferior ao do cérebro, em virtude do fator de "diluição" sofrido com o acréscimo de mais órgãos. Neste experimento, do total de 82 morcegos reagentes positivos para a prova de IFD, 76 espécimes cerebrais foram inoculados intracerebralmente em camundongos, com 68/76 (89,47%) de isolamento positivo. Por sua vez, de 67 espécimes inoculados em células N2A, 56 (83,58%) foram positivos. Com a glândula salivar, no entanto, esta positividade em camundongos foi de 44/76 (57,89%) e em células, 29/64, ou seja, uma prevalência aparente de 45,31%.

Os procedimentos adotados neste estudo, de realizar uma triagem com a prova de IFD para, em seguida, submeter os materiais às provas de IIC e ICC contribuíram para a obtenção destes resultados. Para a pesquisa de portadores "sãos" do vírus da raiva, isto é, com ausência do vírus no

cérebro e presença em outros órgãos, deveria partir-se de materiais negativos à IFD e estudo em paralelo de outros órgãos não nervosos pelas técnicas de isolamento, exigindo um número grande de camundongos ou células para o isolamento de vírus. Por sua vez, Iwasaki et al. (2004) estudaram um vírus isolado no Japão, em 1972, de um morcego *Rhinolophus cornutus*, que apresentou características genéticas muito próximas de um lissavírus e de um vesiculovírus, que causa encefalite letal em camundongos através da inoculação intracerebral, porém, esta susceptibilidade foi constatada em camundongos de até 3 semanas de idade. Neste aspecto, o uso de camundongos lactentes passa a ser também de interesse, especialmente em trabalhos à procura de lissavírus emergentes.

---

**CONCLUSÕES**



## 6 CONCLUSÕES

- No Estado de São Paulo, os morcegos capturados de ambientes peridomiciliares (morcegos sinantrópicos) de regiões urbanas ou rurais, e com diagnóstico positivo para raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, predominavam os insetívoros, seguidos de frugívoros e hematófagos. Estes exemplares foram classificados em: *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus* sp; *Myotis nigricans*, *Myotis* sp, *Epitesicus* sp, *Lasiurus ega*, *Lasiurus cinereus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Tadarida brasiliensis*, *Histiotus velatus*, *Molossus rufus*, *Eumops* sp e *Desmodus rotundus*.
- A disseminação do vírus da raiva em diferentes tecidos e órgãos de morcegos hematófagos e não hematófagos, naturalmente infectados do Estado de São Paulo, foi constatada pelas técnicas de IIC e ICC. Os fragmentos do cérebro e da glândula salivar são os mais indicados para o isolamento do vírus da raiva, não obstante as variações observadas nos resultados entre as duas técnicas.
- Os períodos de mortalidade observados com a inoculação em camundongos, de suspensões preparadas a partir de cérebros e glândulas salivares de morcegos do Estado de São Paulo foram variados, embora dentro das variações descritas na literatura. Todos os espécimes positivos foram detectados dentro do período de observação de 30 dias.
- O isolamento do vírus da raiva a partir de diferentes tecidos e órgãos de morcegos, por meio de inoculação em camundongos e em cultivo celular N2A apresentou resultados variados, especialmente motivados por problemas de contaminação bacteriana. Vírus de determinados órgãos foram prontamente isolados em ambos os sistemas, porém, outros foram mais problemáticos em um ou outro sistema.

---

## **REFERÊNCIAS**

REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

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

ACHA, P. N.; MÁLAGA-ALBA, A. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: Greenhall, A.M.; Schmidt, U. eds. **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press Boca Raton, , 1988, p. 207-214.

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

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

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

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

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

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

BAER, G. M. Bovine paralytic rabies and rabies in the vampire bat. In: \_\_\_\_\_ **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975b. v. 2, p. 155-175.

BELL, J. F.; GONZALEZ, M. A.; DIAZ, A. M.; MOORE, G. J. Nonfatal rabies in dogs: experimental studies and results of a survey. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, p. 2049-2058, 1971.

---

<sup>1</sup> Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003, 84 p.

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

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

BIGLER, W. J.; HOFF, G. L.; BUFF, E. E. Chiropteran rabies in Florida: A twenty-year, 1954 to 1973. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v 24, p. 347-352, 1974.

BINGHAM, J. The bat lyssaviruses of Africa. **Sixth SEARG meeting**, Lilongwe/Malawi, 2001, p. 74-79.

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

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

**CANADIAN FOOD AND INSPECTION SERVICE. Countries recognized as rabies free for cats and dogs**. Disponível em: <[http://www.inspection.gc.ca/english/anim/heasan/import/rabies\\_free.shtml](http://www.inspection.gc.ca/english/anim/heasan/import/rabies_free.shtml)>, Acesso em: maio, 2005.

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

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

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

CARVALHO, A. A. B. **Sistema alternativo para o diagnóstico da raiva utilizando células de neuroblastoma murino: testes com amostras de campo isoladas no Brasil**. 2002. 107 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

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

CONSTANTINE, D. G. Transmission of pathogenic microorganisms by vampire bats. In: GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U. **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1988, p. 167-189.

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

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

FLORES CRESPO, R. **Técnicas, substancias y estrategias para el control de murciélagos vampiros**. México, D.F: Organización Panamericana de la Salud, 2003.

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

GOULD, A. R.; HYATT, A. D.; LUNT, R.; KATTENBELT, J. A.; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S. D. Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. **Virus Research**, v. 54, p. 165-187, 1998.

GREENHALL, A. M. Feeding behavior. In: GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U. (Eds.). **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1988, p. 111-131.

HARMANI, N. M. S.; SILVA, M. M. S.; HAYASHI, M. M. Controle de morcegos em áreas urbanas. **Boletim do Instituto Pasteur**, v. 1, n. 2, 37-43, 1996.

HAUPT, H.; REHAAG, H. Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina, transmitida por morcegos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 2, p. 17-47, 1925.

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

IWASAKI, T.; INOUE, S.; TANAKA, K.; SATO, Y.; MORIKAWA, S.; HAYASAKA, D.; MORIYAMA, M.; ONO, T.; KANAI, S.; YAMADA, A.; KURATA, T. Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. **Arch Virol.**, v.149, n. 6, p. 1139-1154, 2004.

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

KING, A. European bat rabies. **Sixth SEARG meeting**, Lilongwe/Malawi, 2001, p. 96-100.

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

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

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

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

LUMIO, J.; HILLBOM, M.; ROINE, R.; KETONEN, L.; HALTIA, M.; VALLE, M.; NEUVONEN, E.; LAHDEVIRTA, J. Human rabies of bat origin in Europe. **Lancet**, v. 15, p. 378-382, 1986.

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

MACHADO, C. G. Reflexões sobre a raiva humana. **Boletim do Instituto Pasteur**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 3-6, 1996.

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

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

MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **FIELDS Virology**. 4<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2001. p. 1245-1278.

MAYERN, F. Hematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Pub. Health**, v. 50, n. 10, p. 469-472, 2003.

MCCOLL, K. A.; TORDO, N.; SETIÉN, A. A. Bat lyssavirus infections. **Rev. Sci Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 19, n. 1, p. 177-196, 2000.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de procedimentos para o controle da raiva dos herbívoros**; Brasília, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - PROGRAMA NACIONAL DE PROFILAXIA DA RAIVA. **Casos de raiva humana notificados, e percentual de casos transmitidos segundo a espécie animal**. Brasília, 2004.

MORENO, J. A.; BAER, G. M. Experimental rabies in the vampire bat. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 2, p. 254-259, 1980.

MÜLLER, T.; COX, J.; PETER, W.; SCHAFER, R.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L. M.; GEUE, J. L.; TJORNEHOJ, K.; FOOKS, A. R. Spill-over of European bat lyssavirus type 1 into a stone marten (*Martes foina*) in Germany. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n. 2, p. 49-54, 2004.

NATIONAL CENTERS FOR INFECTIOUS DISEASES, Rabies. Disponível em:  
<<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/references/referenc.htm>> Acesso em: maio 2005.

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

NILSSON, M. R. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, v. 68, p. 486-494, 1970.

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

OIE. Terrestrial Animal health code. Rabies. , 2004. Disponível em:  
<[http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_chapitre\\_2.2.5.htm#rubrique\\_rage](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_2.2.5.htm#rubrique_rage)>. Acesso em: maio 2005.

PASSOS, E. C.; CARRIERI, M. L.; SILVA, M. M. S.; PEREIRA, R.G.; MELO, J.A.T.S.; MAULE, L.J. Vírus rábico isolado de morcego frugívoro (*Artibeus lituratus*), capturado em 1997 no município d Rio Claro, SP. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.36, n.1, São Paulo, 1999.

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

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

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

POUNDER, D. J. Rabies, lyssaviruses and bats. **Scott. Med. J.**, v. 48, n. 4, p. 99-101, 2003

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

RONSHOLT, L. A new case of European bat lyssavirus (EBL) infection in Danish sheep. **Rabies Bulletin Europe**, v. 2, p. 15, 2002

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



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

SCHNEIDER, L.G. Antigenic variants of rabies virus. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 5, p.101-107, 1982.

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

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

SILVA, N. M.; SILVA, R.A. *Ocorrência do vírus da raiva em morcegos frugívoros Artibeus lituratus lituratus* (Olfers, 1818). In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 14, São Paulo, 1974. Anais. p.102.

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

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

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

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

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

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

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

TADDEI, V.A. Sistemática de Quirópteros. In: **Boletim do Instituto Pasteur**. São Paulo, v. 1, n. 2, p. 3-15, 1996

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

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

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

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

TUTLE, M. D. Introduction to the natural history of vampire bats. In: GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U. **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton, 1988, p. 1-5.

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

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

UIEDA, W.; HARMANI, N. M. S.; SILVA, M. M. S.; BRANDÃO, M. M.; AGUIAR, E. A. C. Morcegos hematófagos: 2. Um indivíduo macho adulto no centro da cidade de São Paulo. In: **SEMINÁRIO NACIONAL DE RAIVA**. v. 1, São Paulo, p. 14, 1992. Abstract

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. California: Academic Press, San Diego, 2000. p. 563-583.

VENTERS, H. D.; HOFFERT, W. R.; SCARTTERDAY, J. E.; HARDY, A. V. Rabies in bats in Florida. **Am. Jour. Publ. Hlth.**, v. 44, p.182-185, 1954.

VIEIRA, C. O. C. Ensaio monográfico sobre os quirópteros do Brasil. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, v. 3, n. 8, p. 219-471, 1942.

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

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

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

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

WILKINSON, L. History. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W. **Rabies**. San Diego: Academic Press; 2002. p.1-21.

WILKINSON, L. The nature of rabies: an historical perspective. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. (Eds.). **Rabies**. Boston: Kluwer Academic publishers; 1988. p. 1-23.

WIMSATT, W. A. Transient behavior, nocturnal activity patterns and feeding efficiency of vampire bat (*Desmodus rotundus*) under natural conditions. **Journal of Mammology**, v. 50, n. 2, p. 233-244, 1969.

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

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

WHO - World Health Organization. **WORLD SURVEY OF RABIES**, no. 35 - For the year, 1999 - Diseases surveillance and control. WHO/EMC/ZDI/98.4, 2002.

WHO - World Health Organization. **Workshop on Genetic and Antigenic Molecular Epidemiology of Lyssaviruses**. Niagara Falls, Canada: World Health Organization, Geneva, 1994

WHO - World Health Organization, **Zoonoses**, Technical Report series. n. 169, Geneva, World Health Organization, 1959.

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

---

## **APÊNDICE A**

## APÊNDICE A

Cérebros e glândulas salivares de morcegos, período de mortalidade , mínimo e máximo, em cam

#	Cer hemat Mín.	Cer hemat Max.G	Sal hemat MinG	Sal hemat Max
1	12	17	10	14
2	11	16	10	10
3	9	13	10	10
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				

Distribuição dos  
períodos máximos e  
mínimos de mortalidade  
em camundongos, após  
inoculação de  
suspensões de cérebros  
e glândulas salivares de  
morcegos hematófagos,  
insetívoros e frugívoros  
- São Paulo - 2005

GraphPad Software, InStat  
guide to choosing and  
interpreting statistical tests,  
1988, GraphPad Software, Inc.  
San Diego California USA,  
www.graphPad.com

cont.

#	CerInset Mín	CerInsetMax	G SalInsetMin	G SalInsetMax
1	15	17	17	21
2	13	14	13	19
3	11	11	10	14
4	10	11	19	19
5	10	12	14	17
6	16	18	8	14
7	12	19	25	25
8	8	18	14	25
9	11	14	7	9

10	11	17	13	25
11	15	15	25	26
12	11	15	10	11
13	17	24	17	31
14	15	17	13	13
15	7	13	10	14
16	13	14	11	13
17	13	15	10	17
18	12	12	12	16
19	12	13	11	13
20	19	27	26	26
21	20	25	17	21
22	18	21	20	27

Distribuição dos períodos máximos e mínimos de mortalidade em camundongos, após inoculação de suspensões de cérebros e glândulas salivares de morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros - São Paulo - 2005

#	CerFrugMin	CerFrugMax	G SalFrugMin	G SalFrugMax
1	14	16	11	12
2	13	17	13	13
3	10	11	14	20
4	9	11	10	15
5	10	12	10	10
6	7	10	11	13
7	10	11	10	11
8	11	13	10	12
9	8	12	12	15
10	8	11	11	11
11	11	13	12	17
12	12	14	21	21
13	9	10	17	27
14	13	15	17	17
15	10	13	15	21
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				

GraphPad Software, InStat guide to choosing and interpreting statistical tests, 1988, GraphPad Software, Inc. San Diego California USA, www.graphPad.com

Cérebros e glândulas salivares de morcegos, período de mortalidade , mínimo e máximo, em cam

Col. title	Cer hemat Min.	Cer hemat Max.	G Sal hemat Min	G Sal hemat Max
Mean	10.6666666667	15.3333333333	10	11.3333333333
Standard deviation (SD)	1.528	2.082	0.000	2.309
Sample size (N)	3	3	3	3
Std. error of mean(SEM)	0.8819	1.202	0.000	1.333
Lower 95% conf. limit	6.872	10.162	10.000	5.596
Upper 95% conf. limit	14.462	20.505	10.000	17.071
Minimum	9.000	13.000	10.000	10.000
Median (50th percentile)	11.000	16.000	10.000	10.000
Maximum	12.000	17.000	10.000	14.000

Normality test KS

Normality test P value Too few values Too few values Too few values Too few values

Passed normality test?

Col. title	CerInset Min	CerInsetMax	G SalInsetMin	G SalInsetMax
Mean	13.1363636364	16.4545454545	14.6363636364	18.9090909091
Standard deviation (SD)	3.413	4.480	5.517	6.117
Sample size (N)	22	22	22	22

Std. error of mean(SEM)0.7276

Lower 95% conf. limit 11.623

Upper 95% conf. limit 14.650

Minimum 7.000

Median (50th percentile)12.500

Maximum 20.000

Normality test KS

Normality test P value >0.10

Passed normality test? Yes

Col. title	CerFrugMin	CerFrugMax	G SalFrugMin	G SalFrugMax
Mean	10.3333333333	12.6	12.9333333333	15.6666666667

Estadística descritiva dos períodos de mortalidade em camundongos, após inoculação de suspensões de cérebros e glândulas salivares de morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros - São Paulo - 2005

GraphPad Software, InStat guide to choosing and interpreting statistical tests, 1988, GraphPad Software, Inc. San Diego California USA, www.graphpad.com

cont.



Standard deviation (SD)	2.131	3.283	4.821
Sample size (N)	15	15	15
Std. error of mean (SEM)	0.5503	0.8478	1.245
Lower 95% conf. limit	11.420	11.115	12.997
Upper 95% conf. limit	13.780	14.752	18.336
Minimum	10.000	10.000	10.000
Median (50th percentile)	12.000	12.000	15.000
Maximum	17.000	21.000	27.000
Normality test KS	0.1736	0.2119	0.1766
Normality test P value	>0.10	>0.10	>0.10
Passed normality test?	Yes	Yes	Yes

Estatística descritiva dos períodos de mortalidade em camundongos, após inoculação de suspensões de cérebros e glândulas salivares de morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros - São Paulo - 2005

GraphPad Software, InStat guide to choosing and interpreting statistical tests, 1988, GraphPad Software, Inc. San Diego California USA, www.graphpad.com

Cérebros e glândulas salivares de morcegos, período de mortalidade , mínimo e máximo, em cam

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.  
 Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.707 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
Cer hemat Min. vs Cer hemat Max.	-4.667	1.888	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs G Sal hemat Min	0.6667	0.2697	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs G Sal hemat Max	-0.6667	0.2697	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs CerInset Min	-2.470	1.326	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs CerInsetMax	-5.788	3.107	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs G SalInsetMin	-3.970	2.131	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs G SalInsetMax	-8.242	4.424	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs CerFrugMin	0.3333	0.1741	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs CerFrugMax	-1.933	1.010	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs G SalFrugMin	-2.267	1.184	ns	P>0.05
Cer hemat Min. vs G SalFrugMax	-5.000	2.612	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs G Sal hemat Min	5.333	2.158	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs G Sal hemat Max	4.000	1.618	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs CerInset Min	2.197	1.179	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs CerInsetMax	-1.121	0.6018	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs G SalInsetMin	0.6970	0.3741	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs G SalInsetMax	-3.576	1.919	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs CerFrugMin	5.000	2.612	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs CerFrugMax	2.733	1.428	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs G SalFrugMin	2.400	1.254	ns	P>0.05
Cer hemat Max. vs G SalFrugMax	-0.3333	0.1741	ns	P>0.05
G Sal hemat Min vs G Sal hemat Max	-1.333	0.5395	ns	P>0.05

One-way Anova test with Tukey-Kramer Multiple Comparison Test performed on mortality periods data, using GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com - São Paulo - 2005

cont.

G Sal hemat Min vs CerInset Min	-3.136	1.684	ns	P>0.05
G Sal hemat Min vs CerInsetMax	-6.455	3.465	ns	P>0.05
G Sal hemat Min vs G SalInsetMin	-4.636	2.489	ns	P>0.05
G Sal hemat Min vs G SalInsetMax	-8.909	4.782	*	P<0.05
G Sal hemat Min vs CerFrugMin	-0.3333	0.1741	ns	P>0.05
G Sal hemat Min vs CerFrugMax	-2.600	1.358	ns	P>0.05
G Sal hemat Min vs G SalFrugMin	-2.933	1.532	ns	P>0.05
G Sal hemat Min vs G SalFrugMax	-5.667	2.960	ns	P>0.05
G Sal hemat Max vs CerInset Min	-1.803	0.9678	ns	P>0.05
G Sal hemat Max vs CerInsetMax	-5.121	2.749	ns	P>0.05
G Sal hemat Max vs G SalInsetMin	-3.303	1.773	ns	P>0.05
G Sal hemat Max vs G SalInsetMax	-7.576	4.066	ns	P>0.05
G Sal hemat Max vs CerFrugMin	1.000	0.5223	ns	P>0.05
G Sal hemat Max vs CerFrugMax	-1.267	0.6616	ns	P>0.05
G Sal hemat Max vs G SalFrugMin	-1.600	0.8358	ns	P>0.05
G Sal hemat Max vs G SalFrugMax	-4.333	2.264	ns	P>0.05
CerInset Min vs CerInsetMax	-3.318	3.636	ns	P>0.05
CerInset Min vs G SalInsetMin	-1.500	1.644	ns	P>0.05
CerInset Min vs G SalInsetMax	-5.773	6.325	***	P<0.001
CerInset Min vs CerFrugMin	2.803	2.765	ns	P>0.05
CerInset Min vs CerFrugMax	0.5364	0.5292	ns	P>0.05
CerInset Min vs G SalFrugMin	0.2030	0.2003	ns	P>0.05
CerInset Min vs G SalFrugMax	-2.530	2.496	ns	P>0.05
CerInsetMax vs G SalInsetMin	1.818	1.992	ns	P>0.05
CerInsetMax vs G SalInsetMax	-2.455	2.689	ns	P>0.05
CerInsetMax vs CerFrugMin	6.121	6.039	**	P<0.01
CerInsetMax vs CerFrugMax	3.855	3.803	ns	P>0.05
CerInsetMax vs G SalFrugMin	3.521	3.474	ns	P>0.05
CerInsetMax vs G SalFrugMax	0.7879	0.7773	ns	P>0.05
G SalInsetMin vs G SalInsetMax	-4.273	4.682	ns	P>0.05
G SalInsetMin vs CerFrugMin	4.303	4.245	ns	P>0.05
G SalInsetMin vs CerFrugMax	2.036	2.009	ns	P>0.05
G SalInsetMin vs G SalFrugMin	1.703	1.680	ns	P>0.05
G SalInsetMin vs G SalFrugMax	-1.030	1.017	ns	P>0.05
G SalInsetMax vs CerFrugMin	8.576	8.461	***	P<0.001
G SalInsetMax vs CerFrugMax	6.309	6.225	**	P<0.01
G SalInsetMax vs G SalFrugMin	5.976	5.896	**	P<0.01
G SalInsetMax vs G SalFrugMax	3.242	3.199	ns	P>0.05
CerFrugMin vs CerFrugMax	-2.267	2.051	ns	P>0.05
CerFrugMin vs G SalFrugMin	-2.600	2.352	ns	P>0.05

One-way Anova test with Tukey-  
Kramer Multiple Comparison Test  
performed on mortality periods data,  
using GraphPad InStat version 3.00 for  
Windows 95, GraphPad Software, San  
Diego California USA, www.  
graphpad.com - São Paulo - 2005

cont.

CerFrugMin vs G SalFrugMax	-5.333	4.825	*	P<0.05
CerFrugMax vs G SalFrugMin	-0.3333	0.3016	ns	P>0.05
CerFrugMax vs G SalFrugMax	-3.067	2.775	ns	P>0.05
G SalFrugMin vs G SalFrugMax	-2.733	2.473	ns	P>0.05

Mean 95% Confidence Interval

Difference	Difference	From	To
Cer hemat Min. - Cer hemat Max.	-4.667	-16.301	6.967
Cer hemat Min. - G Sal hemat Min	0.6667	-10.967	12.301
Cer hemat Min. - G Sal hemat Max	-0.6667	-12.301	10.967
Cer hemat Min. - CerInset Min	-2.470	-11.239	6.300
Cer hemat Min. - CerInsetMax	-5.788	-14.557	2.982
Cer hemat Min. - G SalInsetMin	-3.970	-12.739	4.800
Cer hemat Min. - G SalInsetMax	-8.242	-17.012	0.5271
Cer hemat Min. - CerFrugMin	0.3333	-8.678	9.345
Cer hemat Min. - CerFrugMax	-1.933	-10.945	7.078
Cer hemat Min. - G SalFrugMin	-2.267	-11.278	6.745
Cer hemat Min. - G SalFrugMax	-5.000	-14.012	4.012
Cer hemat Max. - G Sal hemat Min	5.333	-6.301	16.967
Cer hemat Max. - G Sal hemat Max	4.000	-7.634	15.634
Cer hemat Max. - CerInset Min	2.197	-6.573	10.966
Cer hemat Max. - CerInsetMax	-1.121	-9.891	7.648
Cer hemat Max. - G SalInsetMin	0.6970	-8.073	9.466
Cer hemat Max. - G SalInsetMax	-3.576	-12.345	5.194
Cer hemat Max. - CerFrugMin	5.000	-4.012	14.012
Cer hemat Max. - CerFrugMax	2.733	-6.278	11.745
Cer hemat Max. - G SalFrugMin	2.400	-6.612	11.412
Cer hemat Max. - G SalFrugMax	-0.3333	-9.345	8.678
G Sal hemat Min - G Sal hemat Max	-1.333	-12.967	10.301
G Sal hemat Min - CerInset Min	-3.136	-11.906	5.633
G Sal hemat Min - CerInsetMax	-6.455	-15.224	2.315
G Sal hemat Min - G SalInsetMin	-4.636	-13.406	4.133
G Sal hemat Min - G SalInsetMax	-8.909	-17.679	-0.1396
G Sal hemat Min - CerFrugMin	-0.3333	-9.345	8.678
G Sal hemat Min - CerFrugMax	-2.600	-11.612	6.412
G Sal hemat Min - G SalFrugMin	-2.933	-11.945	6.078
G Sal hemat Min - G SalFrugMax	-5.667	-14.678	3.345
G Sal hemat Max - CerInset Min	-1.803	-10.573	6.966
G Sal hemat Max - CerInsetMax	-5.121	-13.891	3.648

One-way Anova test with Tukey-Kramer Multiple Comparison Test performed on mortality periods data, using GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com - São Paulo - 2005

cont.

G Sal hemat Max - G SalInsetMin	-3.303	-12.073	5.466
G Sal hemat Max - G SalInsetMax	-7.576	-16.345	1.194
G Sal hemat Max - CerFrugMin	1.000	-8.012	10.012
G Sal hemat Max - CerFrugMax	-1.267	-10.278	7.745
G Sal hemat Max - G SalFrugMin	-1.600	-10.612	7.412
G Sal hemat Max - G SalFrugMax	-4.333	-13.345	4.678
CerInset Min - CerInsetMax	-3.318	-7.614	0.9780
CerInset Min - G SalInsetMin	-1.500	-5.796	2.796
CerInset Min - G SalInsetMax	-5.773	-10.069	-1.477
CerInset Min - CerFrugMin	2.803	-1.968	7.574
CerInset Min - CerFrugMax	0.5364	-4.235	5.307
CerInset Min - G SalFrugMin	0.2030	-4.568	4.974
CerInset Min - G SalFrugMax	-2.530	-7.301	2.241
CerInsetMax - G SalInsetMin	1.818	-2.478	6.114
CerInsetMax - G SalInsetMax	-2.455	-6.751	1.842
CerInsetMax - CerFrugMin	6.121	1.350	10.892
CerInsetMax - CerFrugMax	3.855	-0.9166	8.626
CerInsetMax - G SalFrugMin	3.521	-1.250	8.292
CerInsetMax - G SalFrugMax	0.7879	-3.983	5.559
G SalInsetMin - G SalInsetMax	-4.273	-8.569	0.02342
G SalInsetMin - CerFrugMin	4.303	-0.4681	9.074
G SalInsetMin - CerFrugMax	2.036	-2.735	6.807
G SalInsetMin - G SalFrugMin	1.703	-3.068	6.474
G SalInsetMin - G SalFrugMax	-1.030	-5.801	3.741
G SalInsetMax - CerFrugMin	8.576	3.805	13.347
G SalInsetMax - CerFrugMax	6.309	1.538	11.080
G SalInsetMax - G SalFrugMin	5.976	1.205	10.747
G SalInsetMax - G SalFrugMax	3.242	-1.529	8.014
CerFrugMin - CerFrugMax	-2.267	-7.470	2.936
CerFrugMin - G SalFrugMin	-2.600	-7.803	2.603
CerFrugMin - G SalFrugMax	-5.333	-10.536	-0.1304
CerFrugMax - G SalFrugMin	-0.3333	-5.536	4.870
CerFrugMax - G SalFrugMax	-3.067	-8.270	2.136
G SalFrugMin - G SalFrugMax	-2.733	-7.936	2.470

One-way Anova test with Tukey-Kramer Multiple Comparison Test performed on mortality periods data, using GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com - São Paulo - 2005

cont.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test cannot be performed because at least one column's standard deviation is zero.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Cer hemat Min.	0.1523	>0.10	Yes
Cer hemat Max.	0.1727	>0.10	Yes
G Sal hemat Min	0.1823	>0.10	Yes
G Sal hemat Max	0.1585	>0.10	Yes
CerFrugMin	0.1654	>0.10	Yes
CerFrugMax	0.1736	>0.10	Yes
G SalFrugMin	0.2119	>0.10	Yes
G SalFrugMax	0.1766	>0.10	Yes

One-way Anova test with Tukey-Kramer Multiple Comparison Test performed on mortality periods data, using GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com - São Paulo - 2005

cont.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	11	1060.2	96.386
Residuals (within columns)	148	2712.2	18.325
Total	159	3772.4	

$F = 5.260 = (MStreatment/MSresidual)$

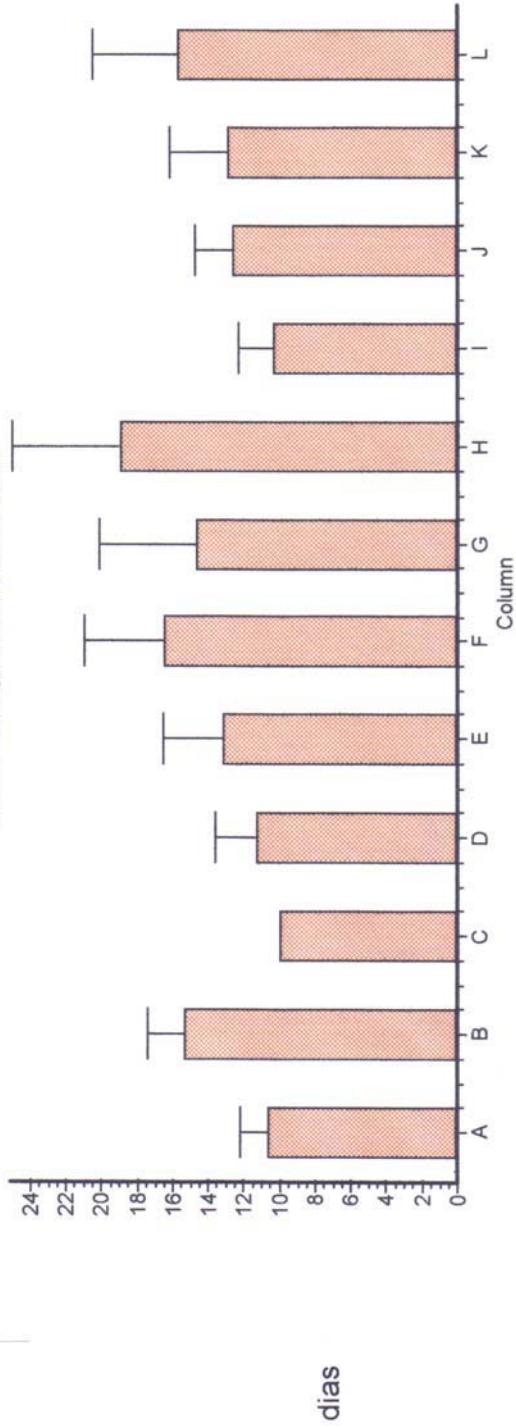
## Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Cer hemat Min.	3	10.667	1.528	0.8819	11.000
Cer hemat Max.	3	15.333	2.082	1.202	16.000
G Sal hemat Min	3	10.000	0.000	0.000	10.000
G Sal hemat Max	3	11.333	2.309	1.333	10.000
CerInset Min	22	13.136	3.413	0.7276	12.500
CerInsetMax	22	16.455	4.480	0.9551	15.000
G SalInsetMin	22	14.636	5.517	1.176	13.000
G SalInsetMax	22	18.909	6.117	1.304	18.000
CerFrugMin	15	10.333	2.024	0.5225	10.000
CerFrugMax	15	12.600	2.131	0.5503	12.000
G SalFrugMin	15	12.933	3.283	0.8478	12.000
G SalFrugMax	15	15.667	4.821	1.245	15.000

One-way Anova test with Tukey-Kramer Multiple Comparison Test performed on mortality periods data, using GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com - São Paulo - 2005

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	To
Cer hemat Min.	9.000	12.000	6.872	14.462
Cer hemat Max.	13.000	17.000	10.162	20.505
G Sal hemat Min	10.000	10.000	10.000	10.000
G Sal hemat Max	10.000	14.000	5.596	17.071
CerInset Min	7.000	20.000	11.623	14.650
CerInsetMax	11.000	27.000	14.468	18.441
G SalInsetMin	7.000	26.000	12.190	17.083
G SalInsetMax	9.000	31.000	16.196	21.622
CerFrugMin	7.000	14.000	9.213	11.454
CerFrugMax	10.000	17.000	11.420	13.780
G SalFrugMin	10.000	21.000	11.115	14.752
G SalFrugMax	10.000	27.000	12.997	18.336

Cérebros e glândulas salivares de morcegos, período de mortalidade , mínimo e máximo, em cam  
Mean and Standard Deviation



- A = período mínimo de mortalidade, cérebros de morcegos hematófagos
- B = período máximo de mortalidade, cérebros de morcegos hematófagos
- C = período mínimo de mortalidade, glândulas salivares de morcegos hematófagos
- D = período máximo de mortalidade, glândulas salivares de morcegos hematófagos
- E = período mínimo de mortalidade, cérebros de morcegos insetívoros
- F = período máximo de mortalidade, cérebros de morcegos insetívoros
- G = período mínimo de mortalidade, glândulas salivares de morcegos insetívoros
- H = período máximo de mortalidade, glândulas salivares de morcegos insetívoros
- I = período mínimo de mortalidade, cérebros de morcegos frugívoros
- J = período máximo de mortalidade, cérebros de morcegos frugívoros
- K = período mínimo de mortalidade, glândulas salivares de morcegos frugívoros
- L = período máximo de mortalidade, glândulas salivares de morcegos frugívoros

GraphPad Software, InStat guide to choosing and interpreting statistical tests, 1988, GraphPad Software, Inc. San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)



# 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](#)