

## EPIDEMIOLOGIA DA RAIVA EM QUIRÓPTEROS E OS AVANÇOS EM BIOLOGIA MOLECULAR

Rodrigo Costa da Silva<sup>1,\*</sup>  
Helio Langoni<sup>1</sup>

### RESUMO

A raiva é uma zoonose mundialmente distribuída que acomete o sistema nervoso central (SNC) e terminações nervosas periféricas levando a morte. Transmitido por meio da mordedura de animais infectados, o vírus da raiva pertence ao gênero *Lyssavirus* que apresenta onze espécies diferentes, a maioria delas isoladas de quirópteros. Os quirópteros apresentam grande importância na manutenção do vírus da raiva na natureza, sendo os hematófagos os responsáveis pela ocorrência de vários surtos humanos no Brasil e América Latina. Várias técnicas moleculares e suas combinações foram desenvolvidas e hoje permitem uma melhor avaliação das modificações genéticas do vírus e que associadas as variantes fenotípicas respondem várias discussões epidemiológicas. A epidemiologia clássica e molecular comprovam que a variabilidade genética do vírus rábico nas Américas e em todo o mundo é o resultado desta ação e crescimento desordenado da civilização, permitindo que animais silvestres convivam mais estreitamente com a população humana, exposta a novos riscos.

**Palavras-chave:** vírus da raiva, zoonose, ação do homem, quirópteros, técnicas moleculares.

## EPIDEMIOLOGY OF RABIES IN CHIROPTERANS AND ADVANCES IN MOLECULAR BIOLOGY

### ABSTRACT

Rabies, a worldwide zoonosis, affects central nervous system (CNS) and peripheral nervous terminations resulting in death. Rabies virus is transmitted by bites from infected animals, belongs to *Lyssavirus* genus that presents eleven different species, most of them isolated from chiropterans. Chiropterans present high importance on the maintenance of the rabies virus in nature. The vampire bats are responsible for the occurrence of several human outbreaks in Brazil and Latin America. Many molecular techniques and their combinations were developed and, nowadays, allow a better evaluation of the genetic modifications of the virus and that, associated to the phenotypic variants, answer many epidemiological discussions. Classic and molecular epidemiology prove that the genetic variability of the rabies virus in the Americas and the rest of the world is a result of this human action and disordered development of the civilization, allowing that wild animals have a closed relationship with human population, exposed to new risks.

**Key words:** rabies virus, zoonosis, human action, chiropterans, molecular techniques.

---

<sup>1</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

\* Autor correspondente: Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil. Distrito de Rubião Júnior, s/n. 18618-000 Botucatu, SP, Brasil. Email: [silva\\_rcd@yahoo.com.br](mailto:silva_rcd@yahoo.com.br) (R.C. Da Silva)

## EPIDEMIOLOGÍA DE LA RABIA EN QUIRÓPTEROS Y AVANZOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

### RESÚMEN

La rabia es una zoonosis distribuida por todo el mundo que acomete el sistema nervioso central (SNC) y terminaciones periféricas causando la muerte. Transmitido a través de la mordedura de animales infectados, el virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus* que presenta once especies diferentes, la mayoría de ellas aisladas de quirópteros. Los quirópteros presentan gran importancia en la manutención del virus de la rabia en la naturaleza, siendo los hematófagos los responsables por la ocurrencia de varios surtos en Brasil y América Latina. Varias técnicas moleculares y combinaciones fueron desarrolladas y, hoy, permiten una mejor evaluación de las modificaciones genéticas del virus y, que asociadas a las variantes fenotípicas, responden varias discusiones epidemiológicas. La epidemiología clásica y molecular han demostrado que la variabilidad genética del virus rábico en las Américas y en todo el mundo es el resultado de esta acción y crecimiento no ordenado de la civilización, permitiendo que animales silvestres convivan más estrechamente con la población humana, expuesta a nuevos riesgos.

**Palabras-clave:** virus de la rabia, zoonosis, acción del hombre, quirópteros, técnicas moleculares.

### INTRODUÇÃO

A raiva é uma infecção viral aguda do sistema nervoso central (SNC), causada por um vírus RNA transmitido na saliva pelas mordeduras dos mamíferos. A raiva humana caracteriza-se como uma importante doença mundial (1,2). No mundo, os cães são tidos como os mais importantes transmissores da raiva, porém nos Estados Unidos e Canadá, os animais selvagens como morcegos, raposas e guaxinins lideram o quadro de transmissores. Esta enfermidade ocorre em duas diferentes formas epidemiológicas: a raiva urbana, com o cão doméstico como o principal reservatório e transmissor, e a raiva selvagem, com diferentes espécies silvestres atuando como reservatórios e/ou transmissores. Um terceiro ciclo, o aéreo, vem apresentando grande importância na manutenção do vírus na natureza, caracterizado pela participação dos morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros. Nos dois primeiros ciclos, a raiva é endêmica na maior parte dos países da América do Sul, adquirindo um aspecto preocupante em relação ao ciclo aéreo (3,4). Há um período de incubação longo e variável na raiva humana e animal, normalmente de 30 a 90 dias, às vezes podendo chegar até um ano.

### ETIOLOGIA

O vírus da raiva é um vírus RNA, fita simples, não segmentado, neurotrópico, pertencente a família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus*. A proteína N dos *Lyssavirus* é uma proteína fosforilada de 450 ou 451 longos aminoácidos, que é sintetizada em grandes quantidades durante a infecção celular. Durante a morfogenese, a proteína N se liga fortemente ao RNA genômico protegendo-o da ação de ribonucleases. No vírion maduro, a proteína N constitui o maior componente do nucleocapsídeo helicoidal interno. Nos Rhabdovirus, está envolvida na regulação de transcrição e replicação. Também desenvolve

importante papel na resposta de células T helper, em particular contra desafio com *Lyssavirus* antigenicamente distantes da cepa vacinal (5,6).

O gênero *Lyssavirus* inclui 11 espécies conhecidas (Tabela 1), e 11 genótipos identificados até o momento, consistindo no vírus clássico da raiva (RABV, genótipo 1), Lagos bat virus (LBV, genótipo 2), Mokola virus (MOKV, genótipo 3), Duvenhage virus (DUVV, genótipo 4), European bat lyssavirus (EBLV-1, genótipo 5), European bat lyssavirus (EBLV-2, genótipo 6), e Australian bat lyssavirus (ABLV, genótipo 7). Adicionalmente, quatro novos vírus isolados de morcegos insetívoros foram confirmados se tratar de novas espécies: Aravan virus (ARAV), Khujand virus (KHUV), Irkut virus (IRKV) e West Caucasian bat virus (WCBV) (7).

Tabela 1. Classificação dos *Lyssavirus*.

Espécies	Abreviação <sup>a</sup>	Soro-tipo	Genó-tipo	Vetor/reservatórios	Distribuição
Lyssavirus (vírus da raiva)	RABV	I	I	Carnívoros(mundo) morcegos (Américas)	Mundial (exceto algumas ilhas)
Lagos-Bat-Virus	LBV	II	II	Morcegos frugívoros (Megachiroptera)	África
Mokola-Virus	MOKV	III	III	?	África Subsaariana
Duvenhage Virus	DUVV	IV	IV	Morcegos insetívoros	Sudeste africano
European Bat Lyssavirus 1	EBLV 1		V	Morcego insetívoro ( <i>Eptesicus serotinus</i> )	Europa
European Bat Lyssavirus 2	EBLV 2		VI	Morcegos insetívoros ( <i>Myotis</i> sp.)	Europa
Australian Bat Lyssavirus	ABLV		VII	Morcegos frugívoros/insetívoros (Megachiroptera/Microchiroptera)	Austrália
Aravan virus	ARAV	?		Morcegos insetívoros	Ásia Central
Khujand virus	KHUV	?		Morcegos insetívoros	Ásia Central
Irkut virus	IRKV	?		Morcegos insetívoros	Leste da Sibéria
West Caucasian bat virus	WCBV	?		Morcegos insetívoros	Região Caucásica

Fonte: [http://www.who-rabies-bulletin-org/About\\_Rabies/classification.aspx](http://www.who-rabies-bulletin-org/About_Rabies/classification.aspx)

## EPIDEMIOLOGIA

O gênero *Lyssavirus* se apresenta amplamente distribuído pelo mundo, com vários genótipos sendo caracterizados em diferentes locais e diferentes espécies animais. LBV foi isolado de morcegos frugívoros (*Eidolon helvum*) na Nigéria em 1956 e, em 1974 de outro morcego (*Micropteropus pusillus*) na África Central, apresentando alta patogenicidade (8,9), MOKV, de musaranhos (*Crocidura* sp.) e um criança na Nigéria em 1968, e em 1971 e gatos no Zimbábue. DUVV foi isolado de humano que morreu após ser mordido por morcego na África do Sul em 1970, e de morcegos *Miniopterus* sp. em 1981. EBLV-1 foi isolado de morcegos (*Eptesicus serotinus*) na Alemanha em 1968, Polônia em 1985, Dinamarca,

Holanda e Espanha em 1987, e França em 1989. Já EBLV-2 foi isolado de humano na Rússia em 1985, e de morcegos na Holanda, Suíça e Reino Unido. O último genótipo identificado foi o WCBV a partir de morcego insetívoro, *Miniopterus schreibersi*, em 2002, em Krasnodar, no Cáucaso (7,10).

Deste modo, observa-se a importância do ciclo aéreo na manutenção dos *Lyssavirus* na natureza. A ordem Chiroptera é constituída por cerca de 1120 espécies de morcegos, ou 20% do total de espécies conhecidas de toda a classe Mammalia. Este grupo está distribuído por quase todo o mundo, com exceção das regiões polares e de ilhas muito afastadas dos continentes (11). Possui 18 famílias, nas quais se distribuem 168 gêneros e 986 espécies. No Brasil há cerca de nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies, sendo que o vírus da raiva já foi isolado de 41 (19%) espécies, pertencentes a 25 gêneros de três famílias (Phyllostomidae 43,9%, Vespertilionidae 29,3% e Molossidae 26,8%). Essa porcentagem é pequena em relação à observada nos Estados Unidos com 39 espécies identificadas e 77% destas com isolamento do vírus (12). No início do século passado (1911), Antonio Carini, então Diretor do Instituto Pasteur de São Paulo, levantou a hipótese de serem os morcegos hematófagos os transmissores do vírus da raiva aos herbívoros (13), a partir de 4000 bovinos e 1000 cavalos e jumentos mortos por raiva parálitica no Estado de Santa Catarina, no período de 1906 a 1908. Morcegos foram observados interagindo com os animais e tentando mordê-los durante o dia, sendo confirmado por Haupt & Rehaag (14), com o primeiro isolamento do vírus de material nervoso do morcego *Phyllostoma superciliatum*. Além disso, Pawan (15) relatou casos de raiva em humanos na ilha de Trinidad, transmitida por morcegos, e isolando o vírus das espécies *Artibeus planirostris trinitalis*, *Desmodus rotundus* e *Hemiderma*, além de ter conseguido a infecção experimental de *Desmodus* e *Artibeus* com o vírus da raiva.

As três espécies de morcegos hematófagos, *D. rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*, distribuem-se do Norte do México até a Argentina, regiões com temperatura mínima de até 10°C. Os morcegos hematófagos estão presentes somente na América Latina e evidências fósseis indicam que eles têm estado na América desde o período Pleistoceno, há aproximadamente 2,5 milhões de anos. O vírus rábico pode ser mantido entre os morcegos hematófagos, nas Américas, por um longo tempo (4,16). O ataque de morcegos hematófagos a seres humanos tem sido relatado desde os tempos da colonização do continente americano pelos espanhóis. Nessa época, o solo possuía a sua cobertura vegetal virgem e, certamente, os morcegos hematófagos tinham na fauna silvestre a sua fonte de alimento, sendo que a raiva era fator limitante de algumas espécies desse conjunto. O desmatamento para a formação de fazendas e a introdução de animais domésticos de grande porte, como os bovinos e os equinos, propiciaram aos morcegos hematófagos uma fonte de alimento mais fácil, numerosa e num espaço aberto, o que facilitou o acesso desses animais às suas novas vítimas (2,13,16).

O período de incubação da raiva é extremamente variável, desde semanas a períodos prolongados acima de um ano. Nos quirópteros, pelo fato destes animais apresentarem taxa metabólica reduzida e possuírem características de hipotermia, o período de incubação pode ser prolongado ou pode influenciar outras fases da infecção. Há relatos de eliminação do vírus pela saliva antes de até 12 dias do aparecimento dos sintomas, em *Tadarida brasiliensis mexicana*, e de 24 dias, em um *E. fuscus* (17).

### **Impacto econômico e de saúde pública**

Os morcegos hematófagos são importantes transmissores do vírus da raiva aos herbívoros, acometendo o rebanho e causando sérios problemas para a indústria de produtos animais e para a saúde pública, uma vez que esta ocorrência gera contatos entre o homem e o animal raivoso, contato que ocorre principalmente quando animais em incubação ou doentes são sacrificados ou quando são manipulados na cavidade oral, durante a avaliação clínica (1).

Delpietro et al. (18) obtiveram 4/87 (4,6%) isolamentos positivos de amostras de glândulas salivares de bovinos e de 1/62 (1,6%) de saliva, sendo que todos os quatro isolamentos foram relacionados a variante antigênica de morcego hematófago de vírus rábico a partir da utilização de anticorpos monoclonais. Com isso, verifica-se a importância do papel dos morcegos na manutenção do vírus no ciclo rural, visto que estes mamíferos se tornam os disseminadores da infecção dentro da sua espécie e entre outras espécies.

Em algumas áreas endêmicas os morcegos são a principal fonte de infecção de vírus da raiva, em particular para bovinos, com uma crescente importância na transmissão da doença ao homem, superados somente pelos cães na América Latina. Os morcegos podem ser infectados também devido aos seus hábitos de socialização em grupo como o ato de lamberem-se uns aos outros, e por brigas. A capacidade dos morcegos de viver em ambientes urbanos e de se abrigar em habitações humanas aumenta a probabilidade de contato (19).

A predação de morcegos, principalmente por felinos, é outro risco de transmissão da raiva humana e um importante elo entre o ciclo urbano e o ciclo rural da raiva, ao qual deve ser dada máxima atenção (1).

A raiva é observada também em carnívoros silvestres, além dos domésticos (20-22). Este fato foi observado por Favoretto et al. (23) em saguis, e por Sato et al. (22), Carnielli et al. (24) e Favoretto et al. (25) em canídeos silvestres, todos na região Nordeste. Carnielli et al. (24) observaram que há dois ciclos distintos entre os canídeos no Brasil, sendo um representado pelos canídeos domésticos e outro pelos silvestres, e que na região Nordeste, os vírus isolados parecem ser específicos da região e das espécies locais. Assim, a importância epidemiológica da raiva na vida silvestre torna-se evidente nesta região. No estado do Ceará, período de 1990 a 2005, um total de 173 casos de raiva foram registrados em *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), 25 em *Callithrix j. jacchus* (saguis) e seis em *Procyon cancrivorus* (guaxinim, mão-pelada). Neste mesmo período, 13/40 (32,5%) casos humanos foram registrados com animais silvestres como fontes de infecção (23,25).

De suma importância é saber a situação da raiva dos animais domésticos e humanos em uma dada região e verificar se existe alguma relação com os morcegos hematófagos e não-hematófagos. O ataque de *D. rotundus* a presas não-habituais decorre de alteração de seu comportamento alimentar e/ou do aprendizado dos animais jovens, atacando mais frequentemente bovinos, suínos e equinos (19). Gonçalves et al. (26) relataram 403 pessoas agredidas por *D. rotundus* no Estado da Bahia, com cinco mortes causadas pela raiva, onde todas as agressões estiveram relacionadas à frequência do transporte bovino para diferentes regiões evitando-se o período da seca e áreas áridas na Região Nordeste do Brasil, o que aumentou para 53,0% as chances de agressão de animais e humanos pelos morcegos, em busca de fontes de alimento. De Serres et al. (27) observaram que a raiva humana adquirida em ataques de morcegos dentro dos domicílios, durante a noite é rara em condições normais, porém não deve ser descartada principalmente em áreas com a ocorrência de surtos.

Morcegos em situações atípicas e com alterações de comportamento são altamente suspeitos de raiva. Já foram relatados casos positivos para as seguintes situações atípicas: atividade alimentar durante o dia, agressividade, presença em momentos e locais não habituais, estado de paralisia e incapacidade de vôo. Por outro lado, morcegos capturados em seus abrigos diurnos e aparentemente sadios também foram diagnosticados positivos, alertando para a necessidade de pesquisas do vírus da raiva também em indivíduos sem sintomatologia aparente. Contudo, a incidência de raiva em indivíduos clinicamente normais é menor que 1,0% e frequentemente de 0,0% (19). Além disso, a participação dos morcegos frugívoros e insetívoros na polinização de flores e frutos, além do equilíbrio ecológico da população de insetos, são muito importantes uma vez que permitem a disseminação de sementes e consomem diariamente grande quantidade dos mesmos, reduzindo o impacto

ecológico e econômico negativo (20). Porém estas espécies também podem albergar o vírus (28-30).

Na América Latina, raiva em morcegos não-hematófagos já foi assinalada em mais de 50 espécies (12,31), acometendo um total de 49,1% (424/863) morcegos não-hematófagos. No Brasil, estudos concentram-se no morcego hematófago *D. rotundus*, devido ao seu papel na raiva dos herbívoros. O maior número de relatos sobre a ocorrência de raiva no Brasil é em morcegos hematófagos, seguido de insetívoros, fitófagos e onívoros. A maioria destes relatos refere-se a diagnósticos isolados e geralmente sem dados complementares sobre as circunstâncias em que o morcego doente foi encontrado, ou em situações atípicas ao comportamento dos quirópteros (12,28,31). Em termos de números absolutos, a maioria dos quirópteros enviados para exame laboratorial provém de espécies coloniais, devido aparentemente a sua presença em ambientes urbanos e pela facilidade em se amostrar grandes colônias. Além disso, espécies solitárias são tipicamente migratórias, relativamente incomuns e difíceis de serem capturadas (18,28-31). Deste modo, com a identificação de aumento no número de morcegos apresentando esta zoonose em áreas urbanas, a controvérsia sobre o risco de interação social entre morcegos e o homem é crescente (12).

Em vigilância epidemiológica na região de Botucatu, SP, no período de 1992 a 2000, Souza et al. (32) encontraram uma baixa taxa de infecção em quirópteros, com 0,2% (3/1480) morcegos positivos para imunofluorescência direta (IFD) e prova biológica (PB), onde 0,3% (2/585) eram insetívoros (*Molossus molossus* e *T. brasiliensis*) e 0,1% (1/895) hematófago (*D. rotundus*). Na mesma região, em 2003, o Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, diagnosticou morcego frugívoro, *A. lituratus*, positivo na IFD, PB e hemi-nested RT-PCR, no centro urbano de Botucatu, durante o dia, após colidir com a janela de um estabelecimento comercial. O vírus foi detectado em outros órgãos como rim direito e o baço, pela IFD (28). Em 2006, dois novos *A. lituratus* e dois *Myotis* spp. na IFD e PB, apresentando variante 3, de *D. rotundus* (29). Por outro lado, a circulação do vírus em morcegos hematófagos parece também estar presente na região, com soropositividade de 7,4% dentre os 204 exemplares de *D. rotundus* examinados sorologicamente para anticorpos soroneutralizantes antivírus rábico (33). Todo este impacto se origina no rápido e não planejado crescimento urbano, além da destruição e esgotamento das fontes naturais de alimento levando a uma conseqüente colonização de novos nichos ecológicos pelos morcegos, se aproximando ainda mais do homem, em busca de novas fontes de alimento (2), onde com a construção de rodovias como a Rodovia Castelo Branco, no Estado de São Paulo, e surgimento de muitos aterros, são formadas várias áreas de escoamento de água constituídas de tubulações propiciando abrigos para as colônias de morcegos, além da presença de cavernas (32).

Kobayashi et al. (34) revelaram a existência de várias variantes regionais associadas com morcegos hematófagos no Brasil, apresentando padrões de distribuição associados às variações climáticas em montanhas e rios, o que afeta a ecologia dos morcegos. Nas regiões de topografia acidentada, pela existência de uma maior diversidade de abrigos naturais de morcegos, que se somam aos abrigos artificiais, resultantes da atividade humana, esses animais ocorrem em maior quantidade, o que tem levado determinadas regiões a apresentarem maior incidência da doença, como é o caso do Vale do Paraíba, de Sorocaba, do Vale do Ribeira e de Campinas (13), assim como referente ao surto em 15 humanos, com casos concomitantes em animais domésticos e silvestres, ocorrido no município de Augusto Corrêa, Estado do Pará, região amazônica brasileira (35), apontando o *D. rotundus* como espécie transmissora.

Almeida et al. (36) observaram dois morcegos *Nyctinomops macrotis* positivos na IFD e PB, em São Paulo, Estado de São Paulo, entre 1988 e 1992, sem apresentarem nenhum sinal clínico, sendo então considerados transmissores assintomáticos. No interior do Estado, Passos

et al. (37) registraram uma epizootia em Ribeirão Preto, no ano de 1995, com média de 4,8 casos, em todos os meses do ano, com 58 casos confirmados, sendo 54 cães, três gatos e um morcego frugívoro (*A. lituratus*), encontrado morto em uma praça. Cunha et al. (38) identificaram 1,3% (98/7393) morcegos infectados, sendo 88,8% (87/98) destes na zona urbana. Maior frequência foi observada em *A. lituratus* (33,7%). *Eptesicus* e *Myotis* foram as espécies positivas mais frequentes (24,5%) da família Vespertilionidae. Enquanto isso as espécies *Molossus molossus* e *M. rufus* apresentaram 14,3% positividade. Queiroz et al. (31) identificaram 4,9% (518/10.579) amostras cerebrais positivas de animais suspeitos. Os casos em cães corresponderam a 67% (346/518) do total e ocorreram entre 1993 a 1997. Dentre as demais amostras positivas, 16% (84/518) foram detectados em bovinos e 9,7% (50/518) em morcegos. Dentre os morcegos encontrados vivos 50% (13/26) apresentavam algum sinal clínico de raiva, como alteração de comportamento (voar durante o dia), dificuldade de locomoção e agressividade. Em 12% (6/50) dos casos, houve algum tipo de agressão a pessoas e animais ou contato direto do morcego com pessoas. Albas et al. (39) tipificou 18 amostras de vírus rábico provenientes de morcegos não hematófagos de várias espécies provenientes da região de Presidente Prudente, SP. Destas amostras, 82,3% (15/18) foram definidas como variante 3 (*Desmodus rotundus*) e 16,7% (3/18) como variante 4 (*Tadarida brasiliensis*). Scheffer et al. (40) detectaram 1,9% (83/4393) morcegos positivos no Estado de São Paulo, pertencentes a dez gêneros, com predomínio de insetívoros.

As espécies de morcegos que ocorrem em coabitação geralmente não mantêm contato físico, ocupando espaços separados no interior do abrigo. Porém, Constantine (41) alertou que podem ocorrer interações interespecíficas, por meio de mordidas, que podem promover a transmissão do vírus rábico. A transmissão por aerossóis é possível, mas até hoje ocorreu somente em poucas cavernas dos Estados Unidos, com amplas colônias de morcegos, cobertos com extrema umidade, alta temperatura e pouca ventilação (42).

Apesar de a raiva ser considerada uma doença fatal, há relatos de recuperação da doença, principalmente quando da indução de coma e resposta imune nativa crônica (43). A excreção do vírus rábico na saliva dos mamíferos que permanecem saudáveis por um longo período de tempo é o mais importante critério para se considerar o estado de portador da raiva (44).

A infecção do cérebro pelo vírus rábico resulta em alterações comportamentais devido a infecção dos neurônios em áreas límbicas, o que facilita a transmissão pela mordedura. Por outro lado, Brookes et al. (45) observaram que as ovelhas são suscetíveis à infecção com EBLV, porém há variabilidade na patogênese incluindo a neuroinvasividade que varia de acordo com a via de infecção, sugerindo que a transmissão animal-animal entre espécies de vírus rábico variante morcego para um hospedeiro mamífero terrestre pode ser limitada, e nem sempre resultar em encefalite fatal, apesar das severas e amplamente disseminadas alterações inflamatórias cerebrais promovidas pelos vírus EBLV-1 e EBLV-2, comparados ao CVS (46). A vasta maioria dos casos de raiva é transmitida pela mordedura. Exposições que não envolvam mordeduras incluem contaminação de uma ferida aberta, abrasões, cortes, ou membrana mucosa pela saliva ou de tecido do SNC de um animal infectado. A transmissão para o homem pela inalação de vírus rábico aerossolizado em cavernas contendo milhares de morcegos ou em acidentes de laboratórios tem sido observada, além de transplantes de córneas e órgãos contendo o vírus rábico (47).

A raiva se manifesta com um quadro furioso ou paralítico. Como furioso, o animal torna-se agressivo, atacando e mordendo outros animais ou pessoas que encontra. Como paralítica, há a perda do controle muscular levando a paralisia e morte, sem agressão, na maioria dos casos. Cães e gatos normalmente apresentam quadros furiosos, enquanto os morcegos tornam-se paralíticos (1).

No Brasil, em 1980, 64,3% dos casos humanos foram registrados na zona urbana, diminuindo para cerca de 37,0% até 1990. Analisando-se as taxas da zona rural e da zona urbana, a primeira apresentou em 1990, valores seis vezes mais altos que a segunda. Os casos registrados nas capitais dos Estados reduziram-se a dois, em 1987, e a três, em 1988, tendo aumentado nos dois anos seguintes devido, a um surto na cidade de Maceió, Estado de Alagoas, com cinco casos registrados, totalizando oito casos em 1990. Durante na mesma década, o ciclo urbano da enfermidade se mostrou ser o mais importante, com 83,2% do total de casos humanos sendo transmitidos por cães, e os quirópteros logo após com 4,8%. Esse problema vinha aumentando desde 1985, chegando a 15,1% (11 casos) transmitidos por quirópteros (48). 2005 foi o ano com maior frequência de casos (55 casos) de raiva humana transmitida por morcegos nas Américas, com 42 casos no Brasil, 7 casos no Peru, três casos na Colômbia, dois casos no Equador, e um caso na Bolívia, além de um adicional de cinco casos transmitidos por espécies de morcegos não hematófagos no México (49). Dos casos no Brasil, 17 foram registrados no Estado do Pará e 24 no Estado do Maranhão.

Segundo dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica, referentes ao período de 1983 e 1996, de 18 casos humanos de raiva no Estado de São Paulo, 11,0% foram transmitidos por quirópteros, 6,0% por quirópteros ou cães e 83,0% por cães. Tal fato comprova a baixa taxa de transmissão do vírus rábico do quiróptero para o homem, sendo que o cão, mesmo com a implantação das campanhas de vacinação em 100,0% dos municípios, ainda contribuiu para casuística da enfermidade no homem nas décadas de 80 e 90 (50).

Nos Estados Unidos, desde 1980, dos 37 casos de raiva humana, 12 casos foram importados com transmissão a partir de cães, e 25 casos foram autóctones com transmissão a partir morcegos em 22 dos 25 casos, onde a maioria dos casos é associada aos morcegos *Lasiurus noctivagans* e *Pipistrellus subflavis* (47). Em 2006, os animais silvestres desempenharam papel importante na manutenção do vírus nos EUA com os guaxinins apresentaram-se 37,7% infectados, seguidos por morcegos, jaritataca, raposas, gatos, bovinos e, em último, cães, com três casos de raiva humana transmitida por morcegos (51). No Estado de Massachusetts, no período de 1985 a 2006, 38,2% guaxinins dentre 7138 analisados foram positivos, e somente 5,3% morcegos (21). No Canadá, desde 1924 tem-se registrado somente 22 casos de raiva humana, sendo em 1985 e 2000 dois casos transmitidos por morcegos (47). Dentre os casos registrados entre 1957 e 2000, 76,0% eram homens e 40,0% com idade variando entre 10 a 29 anos de idade, com incubação mediana de sete semanas (<10 semanas para 72,0% dos casos) (52). Casos estes levam a um custo elevado seja por profilaxia pós-exposição que, para o período de 1998 a 2002, foi estimado no sul da Califórnia em média de US\$ 3.688, entre custos diretos e indiretos (53). No oeste europeu, a raiva em animais domésticos e carnívoros selvagens tem ocorrido raramente. Somente a Alemanha relatou baixo número de raposas infectadas em 2005. Porém, morcegos infectados foram observados em quatro países, além de um caso humano no Reino Unido e outro por transplante na Alemanha (54).

Vários casos diagnosticados positivos, com indivíduos afetados neurologicamente, porém sem haver indícios de mordeduras, tem levado a busca de informações mais precisas sobre participação de animais infectados no quadro. Porém, a maioria destes indivíduos tinha um histórico de mordedura que foi relatado pelos familiares ou amigos, não sendo indicativo de mordeduras não detectadas. Portanto, tais relatos têm sido interpretados amplamente como evidências de que a maioria da transmissão de raiva a partir de morcegos para o homem se dá por mordeduras não detectadas. Com isso, a combinação de hipóteses de mordeduras não detectadas, e relatos de que a maior parte dos casos de raiva nos Estados Unidos é transmitida pelos morcegos, tem levado a manchetes sensacionalistas que aumentam desproporcionalmente o risco percebido da população, redução a tolerância aos morcegos como aliados benéficos (20,21,35).

## DIAGNÓSTICO

### Diagnóstico tradicional

Um diagnóstico rápido da infecção por *Lyssavirus* deve ser realizado no animal suspeito após exposição humana ou animal. Métodos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como imunofluorescência direta, prova biológica em camundongos e pesquisa citológica de corpúsculos de Negri, permitem um diagnóstico rápido da infecção, porém com sensibilidades variadas. A detecção direta do antígeno pela prova de imunofluorescência direta (IFD) é o método de triagem diagnóstica mais amplamente utilizado, e com maior rapidez, sensibilidade e especificidade (16,55). Porém, a IFD possui uma sensibilidade reduzida para a análise de tecidos cerebrais em estado de decomposição (56). A pesquisa citológica pelo método de Sellers não necessita de recursos materiais de alto custo para sua realização, porém possuem a menor sensibilidade dentre as três técnicas, além de requisitar treinamento técnico especializado para visualização dos corpúsculos. Os resultados são normalmente confirmados pela inoculação intracerebral, de suspensão cerebral suspeita, em camundongos lactentes (PB), ou pelo isolamento viral em células de neuroblastoma murino. Atualmente, já se dispõem no Brasil de laboratórios capacitados a realizar estudos de caracterização de cepas por meio de painel de anticorpos monoclonais e de iniciar pesquisas com técnicas de biologia molecular para estudos epidemiológicos. Esta rede de laboratórios é credenciada junto ao Instituto Pasteur, com sede em São Paulo, e ao Centro de Controle de Doenças (CDC), com sede em Atlanta, EUA.

Para o diagnóstico no homem, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética do cérebro não permitem mostrar anormalidades específicas na raiva. Similarmente, a eletroencefalografia normalmente mostra somente anormalidades não específicas, não sendo útil para o diagnóstico. O vírus da raiva pode ser diagnosticado sorologicamente, baseado na presença de anticorpos soroneutralizantes séricos contra o vírus em pacientes não vacinados previamente, mas estes anticorpos normalmente não estão presentes até a segunda semana da enfermidade e podem não atingir níveis detectáveis até o fim da vida. O diagnóstico por meio de biópsias de pele colhidas da região da nuca pode demonstrar a presença do antígeno viral em pequenos nervos adjacentes aos folículos pilosos. Outro método diagnóstico, porém menos confiável, é a detecção do vírus a partir de impressões da córnea em lâmina (47), podendo também ser isolado da saliva e glândulas salivares, principalmente no caso dos animais de produção (18,40).

Estudos com imunoistoquímica realizados anterior ao desenvolvimento da doença clínica mostraram evidências de infecção de fibras musculares extrafusas e fibrócitos ocasionais no sítio de inoculação. Apesar de incerto, a infecção das fibras musculares pode ser uma fase patogênica crítica para o vírus ganhar acesso ao sistema nervoso periférico. O vírus da raiva se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina, na junção neuromuscular, e estudos recentes utilizando co-culturas músculo-nervo indicam que a junção neuromuscular é o maior sítio de entrada nos neurônios (45,57).

As condições de envio e recebimento dos materiais são de imprescindível importância para o diagnóstico correto da enfermidade, visto que as técnicas diminuem sua sensibilidade e especificidade, em razão do estado de decomposição do material analisado. Para a IFD, materiais enviados até 48h a 25-29°C, a eficiência diagnóstica é mantida, porém na PB, a eficiência só é garantida até 24h, considerando-se a mesma temperatura, como observado por Albas et al. (58).

No Brasil, nas décadas de 60 e 70, vários pesquisadores estudaram e isolaram o vírus da raiva em quirópteros, a partir de vários órgãos, tais como pulmão, coração, rim, bexiga, útero, etc, observando condições atípicas de seus hospedeiros, como vôos diurnos (59). Porém foi somente na década de 80 que por meio de inoculação experimental de morcegos hematófagos, via intramuscular e subcutânea, foi verificado que os morcegos hematófagos reagem ao vírus da raiva como os outros mamíferos, com período de incubação variável, com excreção de vírus pela saliva, não apresentam o estado de “portador são” e não se recuperam após apresentarem sintomatologia de raiva ou eliminarem vírus pela saliva (17).

### Avanços em biologia molecular

Mais recentemente, a detecção do RNA viral pela técnica de transcriptase reversa - reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) tem sido proposta com uma alternativa mais rápida e sensível (6,60). A comprovação do material genético do agente, RNA ou DNA, é de grande importância, em virtude de grande parte das amostras disponibilizadas para o diagnóstico provirem de animais mortos a diversos períodos de tempo e sob as condições de temperatura mais extrema (61). A detecção do material genético conclui a presença da infecção por determinado agente, não garantido a manifestação da doença, tendo de ser esta manifestação comprovada pela avaliação clínica do animal juntamente com alterações anatomopatológicas e métodos diagnósticos “in vivo”.

Os padrões de evolução viral, tão evidenciados pelas alterações nas sequências de nucleotídeos, refletem o trajeto independente da transmissão do vírus indicativo da população viral isolada, pela geografia ou hospedeiro animal (62), podendo a diversidade em uma área geográfica estar associada com os fatores de seleção de hospedeiro (35,63). A heterogeneidade genética, evolução rápida e diversidade antigênica consequente, se confirmadas, oferecerá a oportunidade significativa do vírus rábico para colonizar novos nichos ecológicos, novos vetores e evadir a imunidade do hospedeiro induzida pelas vacinas anti-rábica atuais (5).

Descrita por Kary Mullis, em 1985 (61), a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular, que obteve maior impacto na última década do século XX. Este é um sistema extremamente sensível que permite a amplificação enzimática e detecção das seqüências de ácidos nucléicos específicos da cadeia de DNA. Consiste em ciclos repetitivos de três etapas, considerando-se o binômio tempo-temperatura, onde seqüências de nucleotídeos específicas e complementares as fitas do DNA, oligonucleotídeos com 8-15 bases, ao serem adicionadas a reação, e a temperatura adequada, promovem a extensão da fita de DNA, sendo a reação catalisada por uma enzima, em geral a *Taq* polimerase, originada da bactéria *Thermus aquaticus*. Em algumas técnicas, há a combinação da utilização de tipos de oligonucleotídeos, sondas e/ou endonucleases de restrição.

Atualmente, existem várias técnicas utilizadas para o diagnóstico biomolecular, sendo a mais utilizada para a pesquisa de vírus RNA a RT-PCR, geralmente associada com a utilização de anticorpos monoclonais, a RFLP-PCR (polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição) e/ou o sequenciamento genético, para a sua caracterização. A utilização da PCR e outras técnicas de amplificação de ácidos nucléicos não é recomendada para a rotina diagnóstica anti-morrem da raiva (64).

Para o diagnóstico de vírus RNA se faz necessário a conversão do RNA para DNA, em virtude da baixa estabilidade e fácil destruição do RNA. Para tal, utiliza-se a enzima transcriptase reversa (RT). Porém, além da RT-PCR, podem ser utilizadas outras técnicas variadas da PCR, como é o caso da hemi-nested RT-PCR (hnRT-PCR) (28,60,65), nested RT-PCR (66), PCR-ELISA (56,67), RT-PCR para cepa-específica (ssRT-PCR) (61,68), RFLP-

PCR (44,68,69), realtime RT-PCR (70,71), hibridização *Southern blotting* (60) e sequenciamento com análise de filogenia (32).

Os métodos baseados na PCR têm uma vantagem adicional sobre os métodos diagnósticos padrões, pois esta gera um produto que pode ser posteriormente analisado pelo sequenciamento. Os dados resultantes podem então ser utilizados para análises filogenéticas que permitem uma caracterização altamente acurada de isolamentos do vírus. A hemi-nested RT-PCR que utiliza uma mistura de primers capazes de detectar o genótipo 1 e os relacionados à raiva. Tanto a RT-PCR tradicional quanto a hnRT-PCR oferecem um maior nível de sensibilidade do que a IFD para tecidos normais ou em decomposição (65,71,72), como na utilização em amostras de homem exumado (73). Mais recentemente, um método utilizando PCR-ELISA foi descrito o qual pode amplificar e distinguir vírus dos genótipos 1, 5 e 6 (56).

A análise do gene N tem sido preferencial na escolha de genes alvo para a amplificação em provas biomoleculares, apesar de recentemente Carnieli et al. (63) e Kobayashi et al. (74) utilizarem o gene G (glicoproteína) como alvo, ambas utilizadas com fins filogenéticos. Esta preferência se dá por várias razões. Primeira, a amplificação do gene N utilizando a PCR como uma simples técnica diagnóstica pode ser expandida para permitir um método de tipagem precisa baseada na sequência de nucleotídeos. Segunda, a sequência N de isolamentos representativos de todos os seis genótipos, relacionados à raiva, de *Lyssavirus* está acessível e foi mostrado proporcionar suficiente informação para análise de isolamentos para um dos distintos genótipos (5,6,34,35,75,76).

Várias amostras podem ser utilizadas para o diagnóstico pós-mortem (77) e anti-mortem da raiva, por provas biomoleculares. Dentre elas tem-se o material cerebral (28,58), fluido cerebrospinal, saliva (78), glândulas salivares (18,40,79), gordura interescapular, swabes orofaríngeos (66) e tonsilas (44), córneas e folículos pilosos (80).

A RT-PCR apresenta uma sensibilidade maior que a IFD quando diretamente comparadas utilizando tecidos conservados em más condições (72). Convencionalmente, a hibridização *Southern blotting* pode levar mais de 48 horas para obter o resultado, enquanto o PCR-ELISA pode ser completado dentro de 10 horas. Além disso, produz sensibilidade 100 vezes maior do que a hibridização. Mediante a isso, Black et al. (56), utilizando oligonucleotídeos específicos para os genótipos 1, 5 e 6, conseguiram detectar pela RT-PCR todos os isolamentos testados referentes a estes genótipos, e negativo para os demais genótipos, em um total de 92 isolamentos. Ao realizar a PCR-ELISA, com sondas específicas, BB4 (genótipo 5) e BB5 (genótipo 6), conseguiram discriminar os genótipos 5 e 6, de todos os outros e dentre eles próprios. Portanto, o PCR-ELISA quando utilizando sondas e primers específicos, permite a discriminação entre cepas de diferentes genótipos. Assim, poderia ser utilizado para avaliar o genótipo viral responsável pela infecção no homem, animal terrestre ou morcego.

Whitby et al. (67) verificaram que o PCR-ELISA, utilizando produtos amplificados da hnRT-PCR, foi dez vezes mais sensível que amplificados pela RT-PCR em amplificar um fragmento de 586 pb em diluição correspondente a 0,002 TCID<sub>50</sub>/mL (dose infectante média em cultivo tecidual/mL). Além disso, encontraram que o PCR-ELISA foi 100 vezes mais sensível que hnRT-PCR e a hibridização *Southern blotting* para um isolamento representativo de genótipo 1, podendo ser concluído em 10 horas.

### **Novos horizontes com a epidemiologia molecular**

A epidemiologia molecular baseada na RT-PCR é uma importante ferramenta para a classificação de doenças nos animais, incluindo a causada pelo vírus da raiva, e proporciona um melhor entendimento dos relacionamentos epidemiológicos (62).

O continente americano apresenta uma elevada diversidade genética, especialmente o Brasil (34,35,69,76). Um exemplo foi a determinação no Brasil, por sequenciamento, de 24 variantes genéticas circulantes entre bovinos e morcegos hematófagos, no período de 1987 a 2006, a maior parte delas isoladas de áreas as margens de rios (32), fato que permite analisar as modificações ecológicas e de prevalência nos animais acometidos. Kobayashi et al. (69) determinaram nove variantes maiores de vírus isolados a partir de morcegos no Brasil, onde uma destas variantes assemelhou-se ao vírus isolado do morcego *Lasiurus* spp. de diferentes regiões da América, sugerindo migrações e adaptações ambientais e de morcegos reservatórios. Deste modo, a raiva animal é derivada de várias variantes de vírus rábico definidas regionalmente de acordo principalmente com a distribuição das populações de morcegos hematófagos, que vivem em colônias com variação migratória limitada. Além disso, a transmissão do vírus relacionado a morcego hematófago parece ocorrer mais em regiões planas limitadas por regiões montanhosas (12,75).

No México, Velasco-Villa et al. (76) observaram por análise filogenética que vírus relacionados às espécies *L. cinereus*, *Histiotus montanus*, e outras espécies do gênero *Lasiurus*, se encontram circulantes, porém a maioria dos casos humanos é associada ao vírus de morcego hematófago. Favoretto et al. (25) identificaram no Estado do Ceará cinco potenciais ciclos, apesar da homogeneidade antigênica, apresentando a emergência de uma variante responsável por um ciclo epidêmico em cachorro-do-mato (*C. thous*).

Outras técnicas permitem a distinção entre as variantes do vírus, como a ssRT-PCR e a RFLP-PCR. Deste modo, Ito et al. (68) discriminaram 27 isolados de vírus rábico relacionado a morcegos hematófagos (VRRV) e relacionados a cães (DRRV) com o sequenciamento de 1396 nucleotídeos do gene N, sendo verificada grande importância da utilização de enzimas de restrição na identificação de reservatórios do vírus rábico de isolamentos a campo no Brasil e do envolvimento de múltiplas espécies animais tornando-se envolvidas nos ciclos de transmissão do vírus rábico.

Warner et al. (44) conseguiram pela RFLP-PCR distinguir o isolamento de tonsila dos isolamentos de saliva de mesmo animal, analisando 39 sítios variáveis representando 668 nucleotídeos ou 5,5% do genoma. Esta observação suporta a hipótese de que o vírus sequestrado na tonsila pode estar sob pressão imune diferente do vírus presente no cérebro.

David et al. (62) demonstraram variabilidade genética do vírus em Israel a partir de três isolamentos humanos e 223 cérebros animais, classificando-os em cinco variantes, de acordo com GenBank, pela RT-PCR e análise de sequências. Desta forma, são necessários diagnósticos capazes não só de apresentarem resultados positivos ou negativos para a infecção, como também de identificarem os reservatórios (4). Kobayashi et al. (74) observaram baixa variabilidade genotípica das populações de vírus da raiva em diferentes hospedeiros no Brasil, porém a diversidade pode ser melhor observada entre os carvívoros silvestres principalmente na região nordeste (22,25).

A combinação entre as técnicas de PCR podem aumentar a sensibilidade dos diagnósticos. Isto foi verificado por Hughes et al. (70) na análise de isolados dos vírus arquivados. Os autores realizaram a realtime PCR, pelo sistema TaqMan, onde obtiveram 44/62 (71%) dos isolamentos tipados corretamente. Com isso, observaram que a TaqMan PCR para detectar o vírus rábico foi tão sensível quanto a PCR convencional, mas apresentou um limite de detecção consideravelmente reduzido quando comparado ao limite de detecção da hnRT-PCR. Assim, a sensibilidade do método pode ser aumentada ao nível da hnRT-PCR pela utilização de produto da primeira RT-PCR com uma amostra para a TaqMan PCR.

A RFLP-PCR, ssRT-PCR com oligonucleotídeos específicos para as cepas, e a utilização de painéis de anticorpos monoclonais permitem não só a identificação do vírus rábico, como também a caracterização genética desta, sendo uma contribuição grandiosa não

só do ponto de vista de epidemiologia clássica e molecular, como para a melhora dos programas de controle de saúde pública (3,4).

Fraser et al. (10) analisaram, pela nested RT-PCR de um cérebro de morcego insetívoro na Austrália, a sequência de nucleotídeos dos produtos amplificados de amostras de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina, e mostraram que o vírus isolado do morcego tinha 75,0% de homologia com LBV, 75,0% com EBLV-2, e 79,0% com o vírus rábico da vacina Pasteur. Ao nível de aminoácidos, o vírus foi 85,0% homólogo com EBLV-2 e LBV, 89,0% com DUVV, e 93,0% com EBLV-1, mostrando assim que o vírus isolado apresentava um relacionamento bem estreito com EBLV. Com posterior avaliação com painel de anticorpos monoclonais, concluiu-se tratar de um novo genótipo *Lyssavirus*, se encaixando como o sétimo genótipo *Lyssavirus*, e primeiro do continente oceânico.

Arai et al. (8) propuseram um novo genótipo de *Lyssavirus*, em virtude de um isolamento viral a partir do material cerebral de um morcego *M. blythii* na Ásia Central, positivo para IFD. As sequências de 1.350 nucleotídeos e de 450 aminoácidos do gene N, do isolado Aravan, foram comparadas com 26 *Lyssavirus* representativos pertencentes aos sete genótipos conhecidos. A identidade da sequência de nucleotídeos do vírus Aravan com os genótipos 4, 5, 6 e 7 foi de 77,0 a 78,0%, com o genótipo 1, de 75,0 a 77,0% e com os genótipos 2 e 3, de 72,0 a 74,0%. Enquanto isso, a sequência de aminoácidos do mesmo vírus estudado, demonstrou 92,0% de identidade com os genótipos 4, 5 e 7; 89,0% com o genótipo 6; e de 81,0 a 85,0% com os genótipos 2 e 3. Atualmente, ARAV é considerado uma nova espécie assim como outros três vírus isolados também de morcegos insetívoros (KHUV, IRKV e WCBV), segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Todos foram isolados no continente asiático, totalizando 11 espécies conhecidas (Tabela 1) (81).

A possibilidade de diagnóstico, em pacientes humanos vivos foi observada por Crepin et al. (78). Estes autores conseguiram obter uma sensibilidade de 29,7% (11/37) amostras de saliva positivas para o vírus rábico, e 9,1% (2/22) de fluido cerebrospinal, pela RT-PCR. Realizaram também IFD de biópsia da região da nuca, na tentativa de verificação de partículas virais nos folículos pilosos, e observaram alta sensibilidade (86,0%). Portanto, a RT-PCR realizada com amostras de saliva é importante para o diagnóstico precoce da enfermidade.

Nos Estados Unidos, a maioria das espécies de morcegos são protegidas por organizações governamentais e não-governamentais (66), assim como na União Europeia (82). Em virtude disso, inquéritos epidemiológicos com o sacrifício de animais para a posterior utilização do cérebro para diagnóstico rábico são proibidos. Echevarría et al. (66) verificaram 27,3% (9/33) de animais positivos para swabs orofaríngeos e negativos para o cérebro, isto é, o vírus foi incapaz de alcançar as glândulas salivares pelo eixo axonal do cérebro, e a infecção nestes animais não permitiu o padrão clássico da patogênese da raiva, 12,1% (4/33) dos animais foram positivos tanto para cérebro como swabs orofaríngeos. Observaram ainda que somente 15,2% (5/33) dos morcegos foram positivos somente para a RT-PCR de cérebro, enquanto que 39,4% (13/33) foram positivos somente para swabs orofaríngeos.

Os métodos para identificação antigênica e genética de amostras de raiva isoladas nas Américas tem contribuído efetivamente para o desenvolvimento de programas de saúde, tão bem como o reconhecimento de possíveis reservatórios silvestres da raiva urbana (25,79). Assim, o controle da disseminação do vírus da raiva em morcegos, outros animais silvestres e domésticos, e no homem, apresenta atualmente ampla possibilidade de ferramentas não somente direcionadas para vacinação e prevenção, como também para a análise de filogeografia e a ecologia das potenciais espécies reservatório, para se obter um melhor entendimento sobre a epizootiologia, evolução e diversidade do vírus rábico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vírus rábico encontra-se amplamente distribuído pelo mundo e acomete várias espécies animais, incluindo o homem, porém as espécies silvestres são suas principais fontes de infecção. Dentre estas, destacam-se os quirópteros, responsáveis pela ocorrência de alguns surtos no Brasil. A ação desordenada do homem destruindo a natureza e promovendo a urbanização de áreas selvagens consiste no fator mais importante que favorece a ocorrência de novos surtos. Esta ação permite que os quirópteros passem a procurar novos abrigos e fontes de alimento, nos grandes centros urbanos, contribuindo para a disseminação do vírus e ocorrência de variabilidade genética. O quiróptero pode se infectar e não apresentar sinais clínicos da raiva, transmitindo o vírus por meio de mordeduras e lambeduras, fato que associado a ação destrutiva do homem culminam em novos riscos a saúde da população humana e animal no mundo.

## REFERÊNCIAS

1. Acha PN, Szyfres B. Rabies. In: Zoonoses and communicable diseases common to man and animals [scientific and technical publications]. 2nd ed. Washington: Pan American Health Organization; 2003. p.351-83.
2. Dantas-Torres F. Bats and their role in human rabies epidemiology in the Americas. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2008;14:193-202.
3. Mattos CA, Mattos CC, Smith JS, Miller ET, Papo S, Utrera A, et al. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. *J Clin Microbiol*. 1996;34: 1553-8.
4. Ito M, Arai YT, Itou T, Sakai T, Ito FH, Takasaki T, et al. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology*. 2001;284:214-22.
5. Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*. 1995;209:526-37.
6. Bourhy H, Kissi B, Audry L, Smreczak M, Sadkowska-Todys M, Kulonen K, et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J Gen Virol*. 1999;80:2545-57.
7. World Health Organization. Rabies Bulletin Europe. Rabies information system of the WHO collaboration centre for rabies surveillance and research. Geneva; 2010 [cited 2010 Jul 01]. Available from: <<http://www.who-rabies-bulletin.org/default.aspx>>.
8. Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythii*), Kyrgyzstan. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:333-7.
9. Markotter W, Kuzmin IV, Rupprecht CE, Nel LH. Lagos bat virus virulence in mice inoculated by the peripheral route. *Epidemiol Infect*. 2009 Jan 15; 137:1155-62. doi:10.1017/S0950268808001945.
10. Fraser GC, Hooper PT, Lunt RA, Gould AR, Gleeson LJ, Hyatt AD, et al. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. *Emerg Infect Dis*. 1996; 2:327-31.
11. Taddei VA. Sistemática de quirópteros. *Bol Inst Pasteur*. 1996;1:3-15.

12. Sodré MM, Gama AR, Almeida MF. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52:75-81.
13. Gonçalves CA. Controle de populações de morcegos hematófagos no Estado de São Paulo. *Bol Inst Pasteur*. 1996;1(2):45-9.
14. Haupt H, Rehaag H. Raiva epizootica nos rebanhos de Santa Catarina, transmitida por morcegos. *Bol Soc Bras Med Vet*. 1925;2:17-47.
15. Pawan JL. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus*, Wagner, 1804). *Ann Trop Med Parasitol*. 1936;30:101-30.
16. Mayen F. Haematophagous 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 Public Health*. 2003;50:469-72.
17. Kotait I. Infecção de morcegos pelo vírus da raiva. *Bol Inst Pasteur*. 1996;1(2):51-8.
18. Delpietro HA, Larghi OP, Russo RG. Virus isolation from saliva and salivary glands of cattle naturally infected with paralytic rabies. *Prev Vet Med*. 2001;48:223-8.
19. Uieda W, Hayashi MM, Gomes LH, Silva MMS. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. *Bol Inst Pasteur*. 1996;1(2):17-35.
20. Olnhausen LR, Gannon MR. An evaluation of bat rabies prevention in the United States, based on an analysis from Pennsylvania. *Acta Chiropterol*. 2004;6(1):163-8.
21. Wang X, Werner BG, Konomi R, Hennigan D, Fadden D, Caten E, et al. Animal rabies in Massachusetts, 1985–2006. *J Wildl Dis*. 2009;45(2):375-87.
22. Sato G, Kobayashi Y, Shoji Y, Sato T, Ito T, Ito FH, et al. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. *Arch Virol*. 2006;151:2243-51.
23. Favoretto SR, De Mattos CC, Morais NB, Araujo FAA, De Mattos CA. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:1062-5.
24. Carnieli Jr. P, Brandão PE, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI, Machado LM, et al. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. *Virus Res*. 2006;120(1-2):113-20.
25. Favoretto SR, Mattos CC, Morais NB, Carrieri ML, Rolim BN, Silva LM, et al. Rabies Virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceará State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(12):1978-1.
26. Gonçalves MAS, Sá-Neto RJ, Brazil TK. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(5):461-4.
27. De Serres G, Skowronski DM, Mimault P, Ouakki M, Maranda-Aubut R, Duval B. Bats in the bedroom, bats in the belfry: reanalysis of the rationale for rabies postexposure prophylaxis. *Clin Infect Dis*. 2009;48(11):1493-9.

28. Langoni H, Lima K, Menozzi BD, Silva RC. Rabies in the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* from Botucatu, Southeastern Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005;11(1):84-7.
29. Langoni H, Hoffmann JL, Menozzi BD, Silva RC. Morcegos não-hematófagos na cadeia epidemiológica de transmissão da raiva. *Vet Zootec*. 2007;14:43-6.
30. Tomaz LAG, Zortéa M, Souza AM, Jayme VS. Isolamento do vírus rábico no morcego *Carollia perspicillata* em Niquelândia, Goiás. *Chiropt Neotrop*. 2007;13(1):309-12.
31. Queiroz LH, Carvalho C, Buso DS, Ferrari CIL, Pedro WA. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(1):9-14.
32. Souza LC, Langoni H, Silva RC, Lucheis SB. Vigilância epidemiológica da raiva na região de Botucatu-SP: importância dos quirópteros na manutenção do vírus na natureza. *Ars Vet*. 2005;21(1):62-8.
33. Langoni H, Souza LC, Zetun CB, Silva TCC, Hoffmann JL, Silva RC. Serological survey for rabies in serum samples from vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2008;14:651-9.
34. Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Itou T, Carvalho AAB, et al. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Vet Res*. 2008 Nov 5; 4:44. doi:10.1186/1746-6148-4-44.
35. Barbosa TFS, Medeiros DBA, Rosa EST, Casseb LMN, Medeiros R, Pereira AS, et al. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. *Virology*. 2008;370:228-36.
36. Almeida MF, Aguiar EAC, Martorelli LFA, Silva MMS. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. *Rev Saude Publica*. 1994;28(5):341-4.
37. Passos ADC, Silva AAMCC, Ferreira AHC, Silva JM, Monteiro ME, Santiago RC. Epizootia de raiva na área urbana de Ribeirão Preto, SP, Brazil. *Cad Saude Publica*. 1998;14(4):735-40.
38. Cunha EMS, Silva LHQ, Lara MCCSH, Nassar AFC, Albas A, Sodré MM, et al. Bat rabies in the northwestern regions of the state of São Paulo, Brazil: 1997-2002. *Rev Saude Publica*. 2006;40(6):1082-6.
39. Albas A, Souza EAN, Lourenço RA, Favoretto SR, Sodré MM. Perfil antig nico do vírus da raiva isolado de diferentes espécies de morcegos não hematófagos da Região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(1):15-7.
40. Scheffer KC, Carrieri ML, Albas A, Santos HCP, Kotait I, Ito FH. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2007;41:389-95.

41. Constantine DG. Bats in relation to the health, welfare, and economy of man. In: Wimsatt WA, editor. *Biology of bats*. New York: Academic Press; 1970. v.2, p.319-449.
42. Messenger SL, Smith JS, Rupprecht CE. Emerging epidemiology of bat-associated cryptic cases of rabies in humans in the United States. *Emerg Infect Dis*. 2002;35:738-47.
43. Willoughby Jr. RE, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2508-14.
44. Warner CK, Schurr TG, Fekadu M. Molecular characterization of carrier rabies isolates. *Virus Res*. 1996;41:133-40.
45. Brookes SM, Klopfleisch R, Müller T, Healy DM, Teifke JP, Lange E, et al. Susceptibility of sheep to European bat lyssavirus type-1 and -2 infection: A clinical pathogenesis study. *Vet Microbiol*. 2007;125:210-23.
46. Hicks DJ, Nuñez A, Healy DM, Brookes SM, Johnson N, Fooks AR. Comparative pathological study of the murine brain after experimental infection with classical rabies virus and European bat lyssaviruses. *J Comp Pathol*. 2009;140:113-26.
47. Jackson AC. Rabies. *Can J Neurol Sci*. 2000;27:278-83.
48. Schneider MC, Almeida GA, Souza LM, Moraes NB, Diaz RC. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. *Rev Saúde Pública*. 1996;30(2):196-203.
49. Schneider MC, Romijn PC, Uieda W, Tamayo H, Silva DF, Belotto A, et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? *Rev Panam Salud Publica*. 2009;25(3):260-9.
50. Takaoka NY. Considerações sobre a raiva humana transmitida por quirópteros no Estado de São Paulo. *Bol Inst Pasteur*. 1996;1(2):59-61.
51. Blanton JD, Hanlon CA, Rupprecht CE. Rabies surveillance in the United States during 2006. *J Am Vet Med Assoc*. 2007;231(4):540-56.
52. De Serres G, Dallaire F, Côte M, Skowronski DM. Bat rabies in the United States and Canada from 1950 through 2007: human cases with and without bat contact. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1329-37.
53. Shwiff SA, Sterner RT, Jay MT, Parikh S, Bellomy A, Meltzer MI, et al. Direct and indirect costs of rabies exposure: a retrospective study in Southern California (1998–2002). *J Wildl Dis*. 2007;43(2):251-7.
54. Wandeler AI. The rabies situation in Western Europe. *Dev Biol*. 2008;131:19-25.
55. Whitfield SG, Fekadu M, Shaddock JH, Niezgodá M, Warner CK, Messenger SL, [The Rabies Working Group]. A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. *J Virol Methods*. 2001;95:145-51.

56. Black EM, Mcelhinney LM, Lowings JP, Smith J, Johnstone P, Heaton PR. Molecular methods to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat lyssaviruses. *J Virol Methods*. 2000;87:123-31.
57. Jackson AC. Rabies virus infection: as update. *J Neurovirol*. 2003;9:253-8.
58. Albas A, Ferrari CIL, Da Silva LHQ, Bernardi F, Ito FH. 1999. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(1):19-22.
59. Uieda W, Harmani NMS, Silva MMS. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Rev Saude Publica*. 1995;29(5):393-7.
60. Heaton PR, Mcelhinney LM, Lowings JP. Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. *J Virol Methods*. 1999;81:63-9.
61. Nadin-Davis SA. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. *J Virol Methods*. 1998;75:1-8.
62. David D, Yakobson B, Smith JS, Stram Y. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other middle- and near-eastern countries. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):755-62.
63. Carnieli Jr. P, Fahl WO, Brandão PE, Oliveira RN, Macedo CI, Durymanova E, et al. Comparative analysis of rabies virus isolates from Brazilian canids and bats based on the G gene and G-L intergenic region. *Arch Virol*. 2010;155(6):941-8.
64. World Health Organization. WHO expert consultation on rabies: first report. Geneva: World Health Organization; 2005. Technical report series, 931.
65. Araújo DB, Langoni H, Almeida MF, Megid J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. *BMC Res Notes*. 2008 Jun 4;1:17. doi:10.1186/1756-0500-1-17.
66. Echevarría JE, Avellón A, Juste J, Vera M, Ibáñez C. Screening of active Lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3678-83.
67. Whitby JE, Heaton PR, Whitby HE, O'sullivan E, Johnstone P. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* 1997;69:63-72.
68. Ito M, Itou T, Shoji Y, Sakai T, Ito FH, Arai YT, et al. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain -specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Virol*. 2003;26:317-20.
69. Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha EMS, Silva MV, et al. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Arch Virol*. 2007;152:1995-2004.

70. Hughes GJ, Smith JS, Hanlon CA, Rupprecht CE. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):299-306.
71. Black EM, Lowings JP, Smith J, Heaton PR, Mcelhinney LM. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. *J Virol Methods.* 2002;105:25-35.
72. Lopes MC, Venditti LLR, Queiroz LH. Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *J Virol Methods.* 2010;164:19-23.
73. Favoretto SR, Martorelli LFA, Elkhoury MR, Zargo AM, Durigon EL. Rabies Virus detection and phylogenetic studies in samples from an exhumed human. *Clin Infect Dis.* 2005;41:413-4.
74. Kobayashi Y, Suzuki Y, Itou T, Carvalho AAB, Carvalho AA, Cunha EMS, et al. Low genetic diversities of rabies virus populations within different hosts in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010;16:278-83.
75. Kobayashi Y, Ogawa A, Sato G, Sato T, Itou T, Samara SI, et al. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *J Vet Med Sci.* 2006;68(10):1097-100.
76. Velasco-Villa A, Orciari LA, Juárez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, et al. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1697-710.
77. Oliveira R, Takaoka N, Brandao P, Carnieli Jr. P, Macedo C, Castilho J, et al. Postmortem confirmation of human rabies source. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(5):867-9.
78. Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):1117-21.
79. Silva MLCR, Lima FS, Gomes AAB, Azevedo SS, Alves CJ, Bernardi F, et al. Isolation of rabies virus from the parotid salivary glands of foxes (*Pseudalopex vetulus*) from Paraíba State, Northeastern Brazil. *Braz J Microbiol.* 2009;40:446-9.
80. Zaidman GW, Billingsley A. Corneal impression test for the diagnosis of acute rabies encephalitis. *Ophthalmology.* 1998;105:249-51.
81. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2009 release. 2009 [cited 2010 Oct. 01]. Available from: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>.
82. Council of the European Communities. Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and wild fauna and flora. *Off J Counc Eur Commun.* 1992:7-50.

**Recebido em: 28/10/2009**

**Aceito em: 02/12/2010**