



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

JAMES RODRIGUES DE SOUZA

PESQUISA DO VÍRUS DA RAIVA EM QUIRÓPTEROS NO ESTADO DE RORAIMA
PELO MÉTODO DE RT-PCR

Boa Vista
2011

JAMES RODRIGUES DE SOUZA

PESQUISA DO VÍRUS DA RAIVA EM QUIRÓPTEROS NO ESTADO DE RORAIMA
PELO MÉTODO DE RT-PCR

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção

Orientador: Prof. Dr. Pablo Oscar Amézaga Acosta.

Boa Vista - RR
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

S729p Souza, James Rodrigues de.

Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros no Estado de Roraima pelo método RT-PCR/ James Rodrigues de Souza. - Boa Vista, 2011.

53 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Oscar Amézaga Acosta.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

1 – Vírus rábico. 2 – Quirópteros. 3 – RT-PCR F. 4 – Roraima. I – Título. II – Acosta, Pablo Oscar Amézaga. (orientador)

CDU – 614(811.4)

JAMES RODRIGUES DE SOUZA

PESQUISA DO VÍRUS DA RAIVA EM QUIRÓPTEROS NO ESTADO DE RORAIMA
PELO MÉTODO DE RT-PCR

Dissertação apresentada como pré-Requisito para conclusão do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Bioprospecção. Defendida em 31 de agosto de 2011 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Pablo Acosta
Orientador/ Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr^a Susi Missel Pacheco
Instituto Souver

Prof. Dr^a Fabiana Granja
Universidade Federal de Roraima

Dr Paulo Sérgio Ribeiro Mattos
EMBRAPA - Roraima

AGRADECIMENTOS

Á Deus, meu senhor de infinita misericórdia, agradeço a todas as barreiras enfrentadas ao longo dessa jornada, porque com sua generosidade as superei.

Aos meus amados e queridos pais, Adaildo Rodrigues dos Santos e Marcina Xavier dos Santos - *in memória* - pela vida e por todo o amor que dedicam a mim.

Aos meus irmãos, sobrinhos e filhos da alma, razão da minha existência e a alegria dos meus dias.

Ao meu orientador Dr. Pablo Acosta, agradeço todo apoio e a oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

A Dr^a Susi Missel Pacheco pela valiosa colaboração na realização desse trabalho.

Ao Dr. Felipe Naveka e Vitor Souza, Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz- AM, pela oportunidade de aprendizado a respeito das técnicas de biologia molecular.

A Mayara Cardoso e Eduardo por compartilhar o aprendizado nas atividades de laboratório.

A secretaria de Saúde, Agência Sanitária de Defesa Animal do estado de Roraima, aos Distritos Sanitários Yanomami e do Leste, pelo envio das amostras utilizadas neste estudo.

Aos amigos Joel Lima, Rosangela, Francisco e Cecília Bessa que foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

A coordenação do Pronat, professores e demais colaboradores, que contribuíram para mais essa jornada da minha vida.

A todos meu muito obrigado.

“que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor !”

Chico Xavier

RESUMO

A raiva é uma enfermidade infectocontagiosa causada por um *Lyssavirus*, que acomete os mamíferos, inclusive o homem, está presente em todos os continentes com exceção da Antártida. Os cães ainda são considerados os principais responsáveis pela manutenção e transmissão da raiva para o homem. Porém, nos últimos anos os morcegos hematófagos e não hematófagos têm ganhado destaque como potenciais transmissores de raiva para animais e humanos nas Américas. Em 2010, o Brasil registrou três casos de raiva humana, sendo um causado por agressão de morcego. Recentemente, várias epidemias de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos foram relatados na região Amazônica. No estado de Roraima até a presente data não há registro de casos de raiva humana. O presente estudo teve o objetivo de detectar a presença e circulação do vírus rábico em quirópteros no estado de Roraima, bem como identificar as espécies de morcegos envolvidas na pesquisa. A técnica Transcriptase Reversa seguida da reação em Cadeia pela Polimerase foi utilizada para a detecção do vírus rábico, utilizando tecido cerebral de morcegos que foram coletados pelas equipes de vigilância epidemiológica e ambiental, da Secretaria de Saúde e Agência de Defesa Sanitária de Roraima. Os morcegos foram identificados utilizando chaves dicotômicas disponíveis para morcegos do Brasil e de outros países sul americanos. No total foram analisadas 94 amostras de morcegos, as quais apresentaram resultados negativos para raiva pela técnica da RT-PCR, no entanto, não é possível afirmar que o vírus rábico não circule em Roraima. Por outro lado, o presente estudo identificou 19 espécies de morcegos distribuídas em seis famílias, sendo uma família (*Vespertilionidae*) e cinco espécies de quirópteros (*Diaemus youngi*, *Noctilio albiventris*, *Myotis nigricans*, *Eptesicus diminutus* e *Cynomops planirostris*) ainda sem relato de ocorrência para Roraima. Morcegos hematófagos foram identificados em cinco municípios. Ressaltando que este trabalho foi um passo inicial e que novos estudos precisam ser desenvolvidos, aprimorando as estratégias de coletas a fim de monitorar a presença do vírus da raiva no Estado.

Palavras chaves: Vírus rábico; Quirópteros; RT-PCR; Roraima.

ABSTRACT

Rabies is an infectious disease that affects mammals, including human beings. Present on all continents except Antarctica. It is caused by a Lyssavirus. Dogs are considered responsible for the maintenance and transmission of rabies to humans. But in recent years the bats have become a potential source of transmitting rabies to animals and human beings in the Americas. In 2010, Brazil recorded three cases of human rabies. One of them was caused by an attack of bat. Recently, several outbreaks of human rabies transmitted by vampire bats were reported in the Amazon region, so far, in the state of Roraima there is no record of cases of human rabies. This study is aimed to detect the presence and circulation of rabies virus in bats in the state of Roraima, as well as to identify the species involved, it includes, also, the necessity of strengthen the network of epidemiological and environmental surveillance of rabies. The technique followed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for virus research involving brain tissue of bats that were collected by teams of environmental and epidemiological surveillance, belonging to the Department of Health and the health protection agency of Roraima. Species of Bats were identified using dichotomous keys available for bats in Brazil and other Latin American countries. In total of 94 bat samples were analysed. The samples tested were negative for rabies. It can not be said, however, that the rabies virus does not circulate in Roraima. This research identified 19 species of bats distributed in six family. On the other hand, the research points to a richness and abundance of species of bats. This study identified one family (Vespertilionidae) and five species of bats (*Diaemus youngi*, *Noctilio albiventris*, *Myotis nigricans*, *Eptesicus diminutus* e *Cynomops planirostris*) not yet reported to the State. Vampire bats were identified in five municipalities. Considering the epidemiological and environmental importance of bats for ecosystems, this study is contributing to the increase of knowledge about both environmental surveillance of rabies and diversity of bats.

Keywords: rabies virus; Chiroptera; RT-PCR, Roraima.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração esquemática do vírus rábico.....	16
Figura 2- Esquema ilustrativo do genoma do vírus da raiva.....	17
Figura 3- Classificação dos <i>Lyssavirus</i> , genótipos, reservatórios e distribuição geográfica.....	18
Figura 4 - Esquema ilustrativo da replicação e tradução do vírus da raiva.....	19
Figura 5 –Número de casos de raiva humana transmitida por morcego hematófago na América Latina entre 2004 e 2005.....	20
Figura 6 - Casa típica das populações do interior da Amazônia Legal mostrando a vulnerabilidade aos ataques de morcegos.....	23
Figura 7 - Agressão por <i>Desmodus rotundus</i> no pavilhão auditivo de uma criança, Município de Alto Alegre-Roraima.....	24
Figura 8 - Agressão por <i>Desmodus rotundus</i> em suínos, Município de Alto Alegre-Roraima.....	24
Figura 9 - Esquema do ciclo epidemiológico da raiva.....	25
Figura 10 - Mapa do Brasil e Roraima com a localização dos municípios onde foram coletadas as amostras de morcegos.....	31
Figura 11 - Corte na área cefálica e retirada da região occipital dos morcegos (A); retirada de fragmentos de tecido cerebral dos morcegos (B); Armazenamento de fragmentos de tecido cerebral dos morcegos em recipiente Plástico estéril (C).....	33
Figura 12- Primers utilizados na RT-PCR para identificação do vírus da raiva.....	35
Figura 13- Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos da amplificação da RT-PCR para CP (vírus controle) Controle positivo; CCN- Cérebro de camundongo normal; CN-Controle negativo com Água livre de DNase e RNase PM-Padrão de peso molecular.....	36
Figura 14- Resultado do BLAST da sequência nucleotídica do seguimento do Vírus padrão da raiva com outras sequências obtidas no GenBank.....	36
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos da amplificação dos CP -Controle positivo CCN-Cérebro de camundongo normal; CN-Controle negativo com Água livre de DNase e RNase e amostras 48,49,50,48a,49b; PM-Padrão de peso molecular 100 pb.....	39

Figura 16- Famílias e espécies de quirópteros coletados em Roraima no período de julho de 2010 a julho de 2011.....	42
---	----

LISTA DE SIGLAS

μL	microlitro
μM	micromolar
ABLV	<i>Australian bat lyssavirus</i>
ARAV	<i>Vírus aravan</i>
CCN	Cérebro de camundongo normal
cDNA	DNA complementar
CVS	<i>Challenger Virus Standard</i>
Da	dáltons
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfato
DUVV	<i>Vírus duvenhage</i>
EBLV-1	<i>European bat lyssavirus</i> tipo-1
EBLV-2	<i>European bat lyssavirus</i> tipo-2
EDTA	Etilenodiamino ácido tetra acético
I.C.	Intracerebral
IFD	Imunofluorescência direta
IRKV	<i>Vírus irkut</i>
KHUV	<i>Vírus khujand</i>
Kb	kilobase
L	RNA-polimerase
LBV	<i>Vírus lagos bat</i>
M	proteína matriz
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
μm	micrômetros
mM	milimolar
MOKV	<i>Vírus mokola</i>
N	nucleoproteína
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
Pb	pares de bases
PB	prova biológica
PM	peso molecular
rpm	rotações por minuto
RNP	ribonucleocapsídeo
RT-PCR	Transcrição Reversa-Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase
SNC	sistema nervoso central
VR	Vírus da raiva
WCBV	<i>Vírus west caucasian bat</i>

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Sequência nucleotídica obtida do CVS (amostra do vírus padrão) alinhamento com Cepa do vírus da raiva CVS-N2c, genoma completo.

ANEXO 2- Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de amplificação dos CP-Control Positivo; CCN-Cérebro de camundongo normal; CN-Control negativo com água livre de DNase e RNase e Amostras 51-93; PM (padrão de peso molecular 100pb).

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ANEXOS	
LISTA DE SIGLAS	
1	INTRODUÇÃO 14
1.1	Raiva: Breve Histórico..... 14
1.2	Vírus da raiva..... 15
1.3	Patogenia da raiva..... 18
1.4	Aspectos da bioecologia dos quirópteros..... 20
1.5	Epidemiologia..... 21
1.5.1	Distribuição Geográfica..... 21
1.5.2	Circulação da Raiva no Brasil..... 22
1.5.3	Hospedeiros..... 24
1.5.4	Ciclo de transmissão..... 25
1.5.5	Profilaxia e controle..... 27
1.5.6	Diagnóstico..... 27
2	OBJETIVOS 29
2.1	Objetivo geral..... 29
2.2	Objetivos específicos..... 29
3	MATERIAIS E MÉTODOS 30
3.1	Área de estudo..... 30
3.2	As amostras..... 31
3.3	Identificação dos quirópteros..... 32
3.4	Coleta e armazenamento do tecido cerebral..... 32
3.5	Extração do RNA..... 32
3.6	Transcrição Reversa..... 34
3.7	Reação em Cadeia da Polimerase..... 34
3.8	Eletroforese em gel de agarose..... 35
3.9	Caracterização da cepa do vírus controle..... 35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
4.1	Pesquisa do vírus rábico em quirópteros..... 38
4.2	Identificação dos quirópteros..... 40
5	CONCLUSÕES 44
	REFERÊNCIAS 45
	ANEXOS 51

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma infecção viral aguda do sistema nervoso central (SNC), causada por um vírus RNA, transmitida na saliva pela mordedura de mamíferos contaminados pelo vírus rábico (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002). Apesar da disponibilidade de vacinas efetivas e seguras para a proteção de humanos e animais, a raiva continua sendo um problema de saúde pública, pois é uma doença letal (BRASIL, 2010).

Para que seja realizado um controle eficiente dessa doença nos países endêmicos com essa doença, além da imunização devem ser realizados exames laboratoriais para detecção do vírus rábico circulante, a identificação de seus reservatórios, bem como a distribuição espacial dos casos de raiva em animais, sendo estas informações fundamentais para a prevenção da raiva humana (VELASCO-VILLA et al., 2006).

O diagnóstico molecular da raiva utilizando a técnica da Transcrição Reversa Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), oferece resultado rápido, com alta sensibilidade e especificidade (FOOKS et al., 2009).

Neste contexto, este trabalho objetivou identificar as espécies de morcegos que ocorrem no Estado e detectar a presença do vírus rábico nestes mamíferos.

1.1 RAIVA: breve histórico

A raiva é uma doença conhecida em animais e humanos desde a antiguidade, relacionada quase sempre a fenômenos sobrenaturais cujos relatos datam do século X antes de Cristo (a.C). A raiva em mamíferos domésticos foi descrita por Demócrito cerca de 500 anos a.C., e comprovada por Aristóteles 322 anos a.C. que, verificou os sintomas da raiva em um cão sadio mordido por um cão doente. No relato, após alguns dias o animal sadio apresentava sintomas semelhantes aquele que o mordeu, e então dizia que o cão ficava “louco”. Além disso, Aristóteles levantou a hipótese da possível transmissão da raiva de animais doentes para o ser

humano. (REZENDE et al., 1997; HINRICHSEN; NOVA; RENGELL, 2005). Galeno no ano 200 a.C., realizou em humanos a remoção cirúrgica das áreas lesionadas, causadas pelas mordeduras de cães acometidos pela raiva, a fim de prevenir o desenvolvimento da doença. No entanto, somente no ano 100 a.C, o médico romano Cornélio Celsus, descreveu essa encefalite, denominando-a de hidrofobia, e afirmou que existia um vínculo de transmissão entre cães e seres humanos. Apenas em 1804 Zinke, demonstrou que a transmissão da raiva ocorria por meio da saliva de um animal doente no momento da mordida (REZENDE et al., 1997; HINRICHSEN; NOVA; RENGELL, 2005).

Outros cientistas desenvolveram trabalhos a respeito da raiva, porém deve-se ao cientista Louis Pasteur e seus colaboradores, Roux, Chamberland e Thuillier, os créditos da descoberta da vacina antirábica. O início dessa importante descoberta deu-se em 1881, quando Pasteur e sua equipe observaram que o sistema nervoso central era o principal local de replicação do vírus (HINRICHSEN; NOVA; RENGELL, 2005). Posteriormente estudos desenvolvidos por Roux mostraram que havia uma redução gradativa da virulência na medula espinhal de animais raivosos quando esta era exposta ao ar seco para ser desidratada (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

A partir destes conhecimentos Pasteur desenvolveu um método prático de vacinação, com injeções subcutâneas de suspensão de fragmentos da medula espinhal infectada, secos por tempo suficiente para perderem a virulência, e que foi inicialmente aplicada em cães (BRASIL, 2008). Cinco anos mais tarde, em 1885, Pasteur propôs um tratamento preventivo da raiva para humanos, constituindo um dos primeiros processos de imunização registrados na história da medicina. (ACHA; SZYFRS, 2003). Contudo, a identificação do agente etiológico da raiva foi descoberto por Remlinger em 1903 ao sugerir como sendo de natureza viral (REZENDE et al., 1997).

1.2 Vírus da Raiva

O vírus da raiva pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae e ao gênero *Lyssavirus* (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

O gênero *Lyssavirus* é um vírus envelopado (figura 1) com diâmetro de 45 a 100 nm e comprimento de 100 a 430 nm. Morfologicamente possui a forma cilíndrica semelhante a um projétil, com uma extremidade arredondada e outra mais plana, sendo dividido em duas unidades estruturais: uma central formada pelo ribonucleocapsídeo, no qual é encontrado o material genético, e um envelope de natureza lipoprotéica, onde estão inseridas as glicoproteínas- G e proteína Matriz- M (TORDO, 1996; FAUQUET et al., 2005).

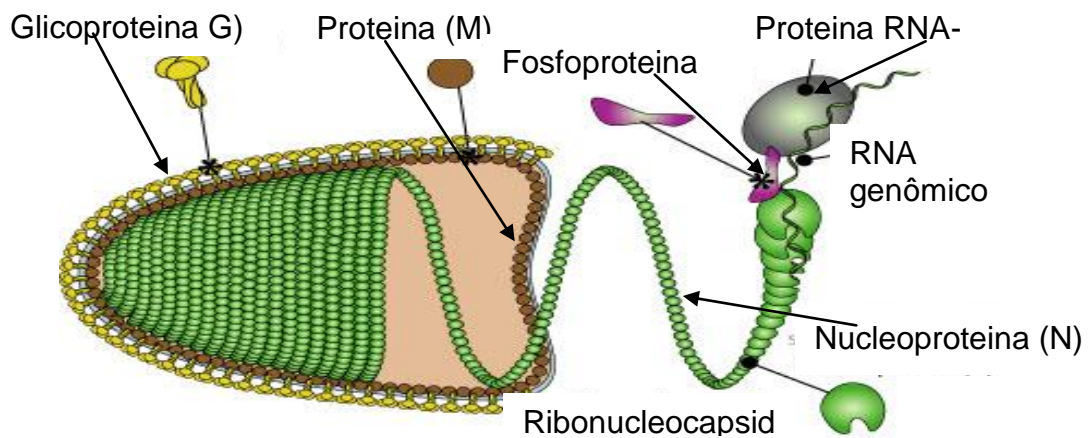


Figura 1 – Ilustração esquemática do vírus rábico.

Fonte: Fauquet et al. (2005).

O nucleocapsídeo deste *Lyssavirus* consiste em um conjunto de proteínas: nucleoproteína - N, que se encontra agregado às proteínas RNA-polimerase - L e fosfoproteína - P (FAUQUET et al., 2005).

O genoma viral (figura 2) é constituído por uma cadeia de RNA de fita simples de polaridade negativa, com tamanho de 12 Kb e que codifica as proteínas na seguinte ordem: N, P, M, G e L (TORDO, 1996; WUNNER, 2007).

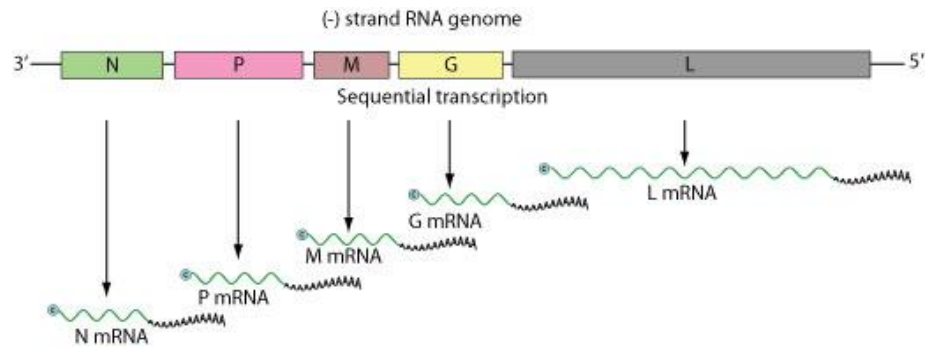


Figura 2 – Esquema ilustrativo do genoma do vírus da raiva

Fonte: Fauquet et al. (2005).

A proteína N está situada no interior do nucleocapsídeo intimamente ligada ao RNA viral, protegendo-o da ação das ribonucleases (TORDO, 1996), é a proteína mais conservada dentre aquelas presentes em *Lyssavirus* e possui importante papel na regulação da transcrição do mRNA (TORDO, 1996; MORIMOTO et al., 1999; MARSTON et al., 2007).

Considerada a menos conservada dentre as proteínas dos *Lyssavirus* a proteína P desenvolve um papel importante na replicação viral e no transporte axonal do vírus (TORDO, 1996).

A função da proteína M é preencher o espaço entre o ribonucleocapsídeo e o envelope (SOKOL; STANCEK; KOPROWSKI, 1971).

A adsorção do vírus a célula hospedeira é mediada pela proteína G, que também tem importante papel na indução de anticorpos neutralizantes (MEBASTSION; KONIG; CONZELMANN, 1996; WUNNER, 2007).

A proteína L é responsável pelas atividades enzimáticas necessárias à transcrição e replicação do RNA viral (TORDO, 1996) e necessita interagir com a proteína P para tornar-se ativa (MARSTON et al., 2007).

As espécies de *Lyssavirus* atualmente são classificadas em sete genótipos (figura 3), agrupados em dois filogrupos, genética e imunologicamente distintos (BRADANE et. al., 2001). Segundo Kuzmin et al. (2003), o filogrupo I inclui o vírus da raiva (RABV, genótipo 1), o vírus *Duvenhage* (DUVV genótipo 4), o *European bat Lyssavirus* tipo 1 e 2 (EBLV-1, genótipo 5 e EBLV-2, genótipo 6) e o *Australian bat*

Lyssavírus (ABLV, genótipo 7) e o filo grupo II inclui o *Lago bat vírus* (LBV, genótipo 2) e o vírus *Mokola* (MOKV, genótipo 3), além destes já foram isolados quatro outros *Lyssavirus* (figura 3) em morcegos na Ásia Central, Leste da Sibéria e região Caucasiana, que ainda precisam ser caracterizados como novos genótipos, são eles: Vírus *Aravan* (ARAV), Vírus *Khujand* (KHUV), Vírus *Irkut* (IRKV) e Vírus *West Caucasian bat* (WCBV) (KUZMIN et al., 2005; WHO, 2005).

Nome do vírus	Abreviação	Genótipo	Reservatório	Distribuição
<i>Lyssavirus</i> (Vírus da Raiva)	RABV	I	Carnívoros Morcegos (Américas)	Mundial (exceto algumas ilhas)
<i>Lagos-Bat-virus</i>	LBV	II	Morcegos frugívoros	África
<i>Mokola-Virus</i>	MOKV	III	?	África
<i>Duvenhage Virus</i>	DUVV	IV	Morcegos insetívoros	África
<i>European Bat-Lyssavirus 1</i>	EBLV 1	V	Morcegos insetívoros	Europa
<i>European Bat-Lyssavirus 2</i>	EBLV 2	VI	Morcegos insetívoros	Europa
<i>Australian Bat – Lyssavirus</i>	ABLV	VII	Morcegos insetívoros e frugívoros	Austrália
<i>Aravan Virus</i>	ARAV	?	Morcegos insetívoros	Ásia Central
<i>Khujand Virus</i>	KHUV	?	Morcegos Insetívoros	Ásia Central
<i>Irkut Virus</i>	IRKV	?	Morcegos Insetívoros	Leste da Sibéria
<i>West Caucasian Bat-Virus</i>	WEBV	?	Morcegos Insetívoros	Região Caucasiana

Figura 3 – Classificação dos *Lyssavirus*, genótipos, reservatórios e distribuição geográfica.

Fonte: adaptado de Kuzmin et al., (2005); WHO (2005).

1.3 Patogenia da Raiva

A raiva é uma antropozoonose caracterizada por um quadro de encefalite aguda, que leva as vítimas ao óbito em quase 100% dos casos e representa um

grande problema de saúde pública, que pode conduzir a prejuízos econômicos na pecuária (BRASIL, 2008).

A transmissão da raiva ocorre por meio da mordedura do animal infectado com o vírus rábico. Porém Collier (2000) adverte que a pele íntegra é uma barreira importante ao vírus, no entanto, as mucosas são permeáveis, mesmo quando intactas.

Após a penetração do vírus rábico no organismo (figura 4) ocorre o desencadeamento de diversos eventos a nível celular tais como: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem e brotamento viral (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDA, 2002).

Após a ligação do vírion à célula do hospedeiro, este é envolvido pela célula por endocitose, segue-se à liberação do genoma viral no citoplasma e o primeiro evento que ocorre é a transcrição dos seus genes, produzindo cinco RNAm seguido da síntese de seu genoma complementar de fita positiva 5'- 3' (BRADANE et. al., 2001; POISSON et. al., 2001).

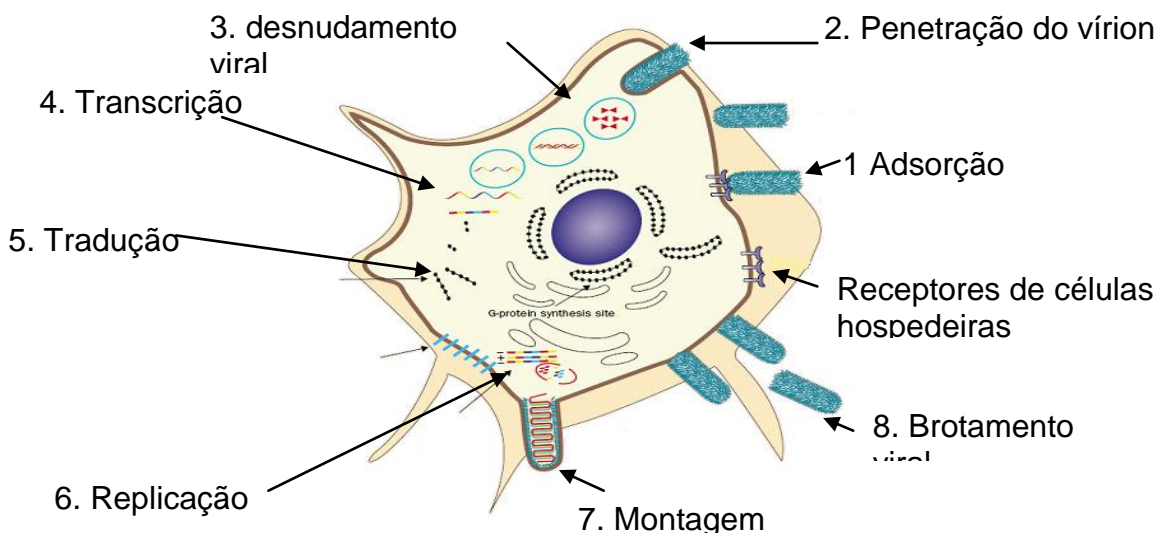


Figura 4– Esquema ilustrativo da replicação e tradução do vírus da raiva

Fonte: Rupprecht; Halon; Hemachudha (2002).

Segundo Fekadu e Shaddock (1984) a capacidade de disseminação do vírus rábico para os diferentes tecidos está relacionada, principalmente com a cepa viral e o grau de suscetibilidade do hospedeiro e tropismo desse vírus pelo sistema nervoso. Faber et al., (2004) afirmam que estes apresentam diferentes potenciais de neuroinvasividade, e que as cepas do vírus rábico adaptadas aos cultivos celulares e amostras de “vírus de rua” (como são chamadas amostras de vírus isoladas de cães) podem apresentar potenciais patogênicos diferentes, e que o vírus da raiva isolado de morcego é menos neuroinvasivo do que o vírus de rua.

O período de incubação é variável, desde dias até um ano, com média de 45 dias no homem e de 10 dias a dois meses no cão. Frequentemente está intrinsecamente ligado a: localização e a gravidade da mordedura, proximidade de troncos nervosos e a quantidade de partículas virais inoculadas (BAER; LENTZ, 1991; BRASIL, 2008).

1.4 Aspectos da bioecologia de quirópteros

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera com cerca de 1.150 espécies no mundo ((SIMMONS, 2005). Para o continente Americano é relatada a ocorrência de cerca de 300 espécies, inclusive as três únicas espécies hematófagas (*Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*), as quais são exclusivas da região neotropical americana, registradas desde o México até a Argentina (ALBERICO et al., 2000).

Nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies de quirópteros vivem no Brasil (REIS et al., 2007). Estes números indicam que o Brasil abriga cerca de 15% das espécies de morcegos do planeta, sendo o segundo país com o maior número de espécies após a Colômbia, com 178 espécies (ALBERICO et al., 2000).

Essa diversidade de espécies de quirópteros está relacionada aos distintos hábitos alimentares (frugívoros, polinívoros, nectarívoros, folívoros, insetívoros, onívoros e hematófagos), habitats nos quais são encontrados e estratégias comportamentais e reprodutivas (KOTAIT et al., 2007). O período de gestação da maioria das espécies é de 60 a 180 dias, embora a espécie *Desmodus rotundus*

possa chegar até sete meses devido as diferentes estratégias reprodutivas adotadas pela espécie (PACHECO; MARQUES; SBERÁRD, 2008).

Os quirópteros são os únicos mamíferos com capacidade de voo verdadeiro. Possuem hábitos crepusculares ou noturnos e um sistema de ecolocalização, por meio do qual emitem sons de alta frequência para orientarem-se no espaço e localizarem suas presas, obstáculos ou fontes de alimento (KOTAIT et al., 2007).

Os morcegos desempenham uma importante função na natureza, em cada tipo de ecossistemas, pois interagem com um grande número de organismos, e promovem a dispersão de sementes e, portanto, são reflorestadores, atuando também como agentes polinizadores da flora brasileira (MELLO; PASSOS, 2008), e podem ser presas ou predadores (KUNZ; FENTON, 2003).

Contudo, os quirópteros possuem também um importante papel epidemiológico no ciclo de transmissão do vírus rábico, em especial nas áreas rurais (SCHNEIDER et al., 2009).

Pesquisas realizadas no Brasil mostraram que 36 espécies de morcegos das famílias Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae foram encontradas positivas para raiva (KOTAIT et al., 2007). Este fato demonstra que não são apenas os morcegos hematófagos responsáveis pela transmissão do vírus rábico (SODRÉ; GAMA; ALMEIDA, 2010).

1.5 Epidemiologia

1.5.1 Distribuição geográfica da raiva

A raiva tem distribuição mundial, ocorre nos cinco continentes, com exceção apenas da Antártida e alguns países, como por exemplo: Japão, Reino Unido e Noruega que são considerados livres da raiva (WHO, 2010).

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 55.000 óbitos devido a raiva ocorra no mundo a cada ano, principalmente nas áreas rurais dos continentes Asiático e Africano. Na América Latina a incidência anual da raiva por 100.000 habitantes varia entre 0 e 0,9 na América do Sul; 0 e 0,10 na América Central e

entre 0 e 0,06 nas Ilhas do Caribe, e na maioria dos casos os cães são as principais fontes de infecção (WHO, 2010).

De acordo com Kotait et al., (2007) de 2004 a 2005 os morcegos hematófagos foram os principais transmissores de raiva humana na América Latina, com 46 e 52 casos respectivamente e o maior número de casos (64) foi registrado no Brasil (figura 5).

PAÍS	2004	2005	TOTAL
Brasil	22	42	64
Equador	0	2	2
Peru	8	7	15
Colômbia	14	0	14
Venezuela	2	0	2
Bolívia	0	1	1
TOTAL	46	52	98

Figura 5- Número de casos de raiva humana transmitida por morcego hematófago na América Latina entre 2004 e 2005.

Fonte:Kotait et al. (2007)

1.5.2 Circulação da raiva no Brasil

A Raiva no Brasil tem sido notificada predominantemente na área rural em herbívoros, sendo esta doença considerada endêmica em graus diferenciados, de acordo com a região. No período de 1986 a 2010, foram registrados 65.894 casos de raiva em herbívoros no território brasileiro, sendo 96% dos casos ocorridos em bovinos (BRASIL, 2011). Quanto ao número de casos de raiva em humanos, este vem diminuindo no Brasil desde a década de 1980.

No período de 1986 a 2010, ocorreram 769 óbitos, sendo os cães e os morcegos as principais fontes de infecção. A grande maioria desses casos ocorreu entre os anos de 1986 a 1993. Em 1994 houve o incremento da vacinação antirábica anual em cães e gatos, que possibilitou a redução dos casos dessa enfermidade no

país, passando então de 173 para 17 casos por ano (BRASIL, 2010). Em 2010 três casos de raiva humana foram registrados no Brasil, sendo dois no estado do Ceará transmitido por cão e um no Rio Grande do Norte que teve a fonte de infecção o morcego (BRASIL, 2010).

Apesar da redução dos números de casos de raiva humana nos últimos anos, os registros de ataques de morcegos têm sido freqüentes em diversas regiões brasileiras e na Amazônia Legal de acordo com Rosa et al. (2006) vivem pessoas em condições de extrema pobreza, abrigadas em moradias vulneráveis, que permitem a entrada oportunista de morcegos hematófagos (figura 6)



Figura 6 - Casa típica das populações do interior da Amazônia Legal, mostrando a vulnerabilidade aos ataques de morcegos.

Em Roraima não existem registros de casos de raiva humana, porém, há diversas notificações de ataques em comunidades indígenas, ribeirinhas e assentamentos agrícolas por *Desmodus rotundus* (figura 7) e (figura 8). Essas agressões segundo o relatório da Secretaria Estadual de Saúde de Roraima são mais frequentes nos meses de agosto a dezembro (RORAIMA, 2010).

Até a presente data não há registro oficial de casos de raiva em humanos em Roraima (RORAIMA, 2010), no entanto, no período de 2005 a 2010 foram

registrados 10 casos de raiva em herbívoros, sendo os bovinos e os equinos os animais afetados. (BRASIL, 2011).



Figura 7 – Agressão por *Desmodus rotundus* no pavilhão auditivo de uma criança, município de Alto Alegre - Roraima.



Figura 8 – Agressão por *Desmodus rotundus* em suínos, município de Alto Alegre – Roraima.

1.5.3 Hospedeiros

Tanto os animais domésticos quanto os silvestres podem servir como fonte de infecção do vírus rábico. Entre os primeiros, as espécies caninas assumem o papel

mais importante na cadeia de transmissão, e outros animais tais como: felinos, suínos e herbívoros também podem ser fonte secundária de contágio. Entre os animais selvagens, vários deles exercem um papel importante na transmissão, entre os quais as espécies de quirópteros, canídeos e felídeos (REZENDE et al., 1997).

Em algumas localidades do mundo, geralmente nos países em desenvolvimento, os cães assumem o papel mais importante na cadeia de transmissão da raiva, por outro lado nos países desenvolvidos os mamíferos silvestres, principalmente quirópteros, primatas, canídeos e felídeos, tem sido reportados como os responsáveis pela transmissão dessa doença (WHO, 2010).

Pesquisando o vírus rábico em animais silvestres no território Brasileiro, Dantas-Torres (2008) identificou quirópteros não hematófagos, marsupiais e canídeos como reservatórios do vírus da raiva ampliando assim o rol das fontes de infecção dessa enfermidade para o país.

1.5.4 Ciclo de Transmissão

O ciclo epidemiológico de transmissão do vírus rábico pode ser dividido didaticamente em: ciclo urbano, rural, silvestre terrestre e silvestre aéreo (figura 9). Na natureza, estes ciclos estão ocasionalmente inter-relacionados. (TAKAOKA, 2003; VELASCO-VILLA et al., 2006).



Figura 9 – Esquema do ciclo epidemiológico da raiva.

Fonte: Takaoka et al. (2003)

O ciclo urbano da raiva é mantido principalmente por cães domésticos, e a transmissão ocorre de cão para cão, sendo o vírus mantido nesta espécie, embora outros animais domésticos sejam freqüentemente infectados, como é o caso dos gatos. Os cães ainda são os principais transmissores de raiva para o homem, e desta forma, este ciclo urbano constitui um grave problema de saúde pública, devido ao estreito relacionamento entre as pessoas e esses animais (BELOTTO et al, 2005).

O ciclo rural é mantido no campo por morcegos hematófagos, que são os reservatórios do vírus rábico neste ambiente, transmitindo-o para diferentes espécies de animais domésticos, como: eqüinos, bovinos, caprinos, suínos e outros (FERNANDES, 2001).

O ciclo silvestre terrestre é o mais frequente nos países desenvolvidos, particularmente nas regiões em que a raiva urbana está sob controle, e nesse caso os animais geralmente envolvidos são os primatas e os carnívoros (WADA et al., 2004). O ciclo silvestre aéreo da raiva ocorre entre as diferentes espécies de morcegos (hematófagos e não hematófagos), e por serem capazes de voar longas distâncias e de transpor grandes barreiras geográficas o que contribuem para a disseminação do vírus rábico (WADA et al., 2004).

1.5.5 Profilaxia e Controle

Atendendo as recomendações da Organização Mundial de Saúde o Ministério da Saúde tem promovido campanhas anuais de vacinação antirábica para cães e gatos em todo o território brasileiro, estabelecendo metas de cobertura vacinal em 80% para todos os municípios (BRASIL, 2010)

Os herbívoros também são vacinados anualmente no Brasil, principalmente nas áreas consideradas endêmicas para raiva, além disso, também é realizado o controle das populações de morcegos hematófagos utilizando o método da pasta de warfarina (SCHNEIDER et al., 1996), cujo método baseia-se na captura do morcego hematófago para em seguida, aplicar a pasta de warfarina no dorso do animal. Essa pasta tem rápida absorção cutânea e provoca hemorragia no morcego. A

contaminação na colônia ocorre devido ao hábito que os morcegos possuem de realizar a higienização da pele lambendo uns aos outros.

1.5.6 Diagnóstico

No Brasil o diagnóstico da raiva é confirmado por exames laboratoriais (MARQUES; KOTAIT, 2001), O tecido cerebral deve, preferencialmente, mantido resfriado ou congelado. No caso de animais silvestres, estes devem ser encaminhando inteiro para identificação específica (BRASIL, 2008). Outros tipos de tecidos biológicos também podem ser utilizados para o diagnóstico *postmortem* e *antemortem* da raiva, por exemplo: saliva, glândulas salivares, sangue, gordura interescapular, secreções orofaríngeas, córneas e folículos pilosos (VELASCO-VILA et al., 2006; SILVA et al., 2009).

Entre as técnicas de rotina, consideradas como padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde para o diagnóstico do vírus rábico estão imunofluorescência direta (IFD) e o isolamento viral em cultivo celular ou a inoculação intracerebral em camundongo (IIC) (BRASIL, 2008).

A IFD baseia-se no exame microscópico de impressões de fragmento de tecido nervoso que receberá anticorpos específicos conjugados à fluoresceína e submetidos à luz ultravioleta, sendo um método rápido, sensível e específico, porém a sensibilidade deste teste depende do estado de conservação da amostra, e da experiência do profissional que realiza o diagnóstico (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007). Frequentemente a inoculação intracerebral em camundongos (IIC) é realizada em casos de positividade após o diagnóstico por IFD ou em casos de dúvida de falso positivo ou negativo. O desempenho do IIC pode estar condicionado ao processo de autólise da amostra de tecido cerebral (KOPROWSKY, 1996; PEIXOTO et al., 2000; VIEIRA et al., 2010). Nos últimos anos as técnicas de biologia molecular têm contribuído para tornar os testes mais rápidos e os diagnósticos mais precisos, porém no caso do vírus rábico estas técnicas ainda são pouco empregadas. Além disso, a OMS não recomenda a utilização dessas técnicas nas rotinas de diagnóstico *postmortem*, orientando apenas o diagnóstico padrão (BRASIL, 2010)

Monitorar a circulação do vírus rábico em Roraima é uma necessidade observada pelas autoridades sanitárias desde o ano de 2007, preocupadas com os constantes ataques de morcegos a humanos. A partir deste fato, a Fundação de Ciência e Tecnologia de Roraima (FEMACT-RR), lançou um edital para seleção de projetos de pesquisa, que contemplassem a pesquisa do vírus rábico em morcegos (RORAIMA, 2007). A pesquisa foi apoiada pela FEMACT-RR e pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Roraima (LBM-UFRR) que dispõe de infra-estrutura para desenvolver o diagnóstico da raiva utilizando a RT-PCR, técnica que atende em um primeiro momento as necessidades de investigação desse vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Pesquisar a presença do vírus rábico em quirópteros no estado de Roraima.

2.2 Objetivos específicos

Identificar a presença do vírus rábico em quirópteros utilizando a técnica da RT-PCR;

Identificar os quirópteros amostrados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em parceria com Divisão de Vigilância em Saúde - Secretaria de Saúde do Estado de Roraima, Distrito Sanitário Indígena Yanomami, Distrito Sanitário Indígena do Leste de Roraima e Agência de Defesa Sanitária Animal do estado de Roraima. Estas Instituições no âmbito das suas respectivas responsabilidades, de vigilância epidemiológica e ambiental, desenvolvem atividades de controle da Raiva no estado de Roraima e têm o interesse no desenvolvimento de pesquisas que possam subsidiar os trabalhos desenvolvidos nas diferentes áreas de interesse na saúde pública.

3.1 Área de Estudo

O estado de Roraima possui 15 municípios com área física de 225.116,1 km² situado no extremo norte da Amazônia brasileira, entre as coordenadas 05°16' N e 1°25' S e 58°55' W e 64°48' W. Faz fronteira internacional com a República Cooperativista da Guiana e República Bolivariana da Venezuela; seus limites com o território nacional são os estados do Amazonas e Pará (IBGE, 2010). A fitofisionomia do estado pode ser dividida em três grandes sistemas ecológicos: floresta, campinas-campinaranas e savanas ou cerrados (BARBOSA; SOUZA; XAUD, 2005).

Foram realizadas 13 coletas distribuídas nos seguintes municípios: Alto Alegre (coleta 1- Surucucu – N 02°50'20.5" e W 063°38'51.0"; coleta 2- Paapiú - N 02°39'31.0" e W 063°09'38.0"; coleta 3 - Xitei - N 02°36'42.0" e W 063°52'40.0"); Amajari (coleta 4- Auaris- N 04°00'51.0" e W 064°30'26.0"; coleta 5- Fazenda – N 02°26'37.7" e W 060°55'05.5" 02); Boa Vista (coleta 6- Comunidade Truarú - N 03° 16' 0.07" W 060°40'29.4"; coleta 7- Monte Cristo - N 02°49'51.4" e W 060°41'21.0" ; coleta 8- garapé do Preto- N 01°43'44.3" e W 060°28'58.0" ; coleta 9- Centro- N 02°48'19.6" e W 060°43' 33.3"); Cantá (coleta 10- fazenda -N 02°35'12.7" e W 060°35' 45.3"); Caracarai (coleta 11- fazenda – sem coordenada); Rorainópolis (coleta 12- fazenda - N 00°56'35.4" e W 060°25' 59.5") e Uiramutã (coleta 13-N 04°35'36.2" e W 060°10' 25.4") (figura 10).

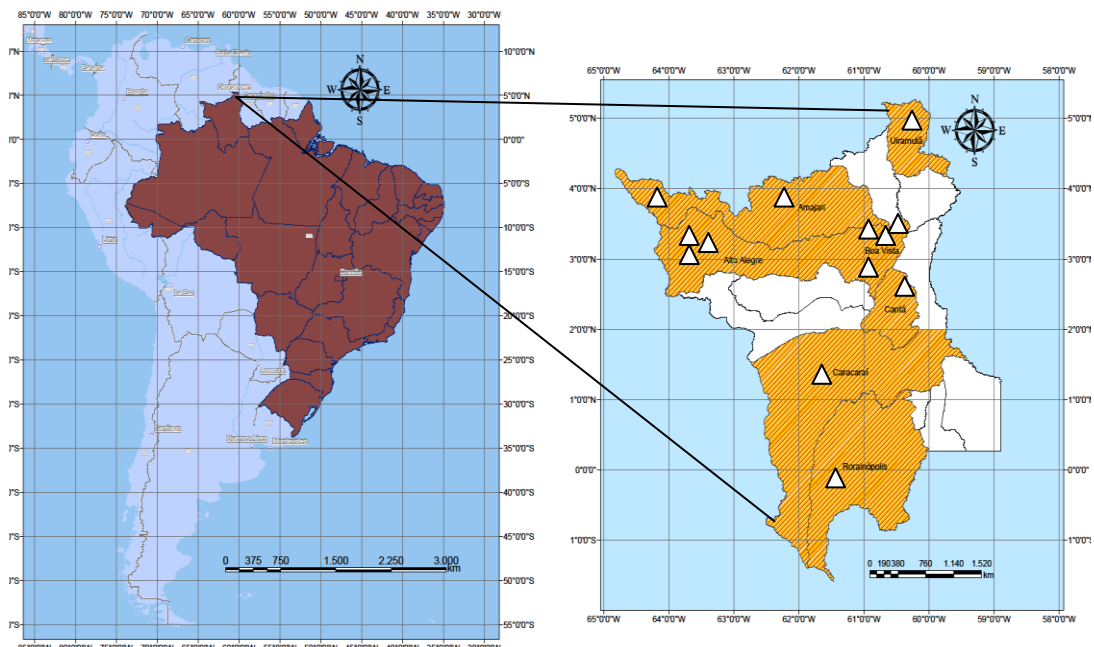


Figura 10 – Mapa do Brasil e Roraima com a localização dos municípios onde foram coletadas as amostras de morcegos.

Fonte: SIPAM (2007).

3.2 As amostras

No total foram enviados pelas instituições parceiras deste estudo 94 quirópteros ao LBM-UFRR para serem submetidas ao diagnóstico da raiva

Atualmente as instituições que realizam vigilância e controle da raiva no Brasil dispõem de um serviço de informação de agressões por morcegos em todos os municípios brasileiros. Trata-se de uma rede de informação epidemiológica do Sistema Único de Saúde- SUS, de notificação compulsória e que deve ser divulgado para outras instituições afins. As amostras que serviram de base para este estudo foram coletadas a partir das notificações de agressões por morcegos em Roraima, e registradas na rede de informações do SUS, e do serviço estadual de defesa sanitária animal. As coletas foram realizadas mediante o emprego de dez redes de neblinas a partir do pôr-do-sol até as 22 horas. Após a captura os quirópteros foram acondicionados individualmente em sacos de tecido e mantidos vivos até o deslocamento para Boa Vista, quando foram mortos com éter, e em seguida

separados em sacos plásticos e conservados em caixa térmica com gelo até a chegada ao LBM-UFRR.

As amostras utilizadas neste estudo epidemiológico podem ser classificadas como não probabilística e por conveniência conforme indicação de Thrusfield (2004). Os motivos para a escolha desse tipo amostragem foram: o espaço de tempo limitado para a realização dos estudos e a limitação de recursos financeiros. Desta forma procurou-se otimizar os recursos humanos e materiais disponíveis no estado de Roraima. De acordo com Thrusfield (2004), quando se desenvolve pesquisa com animais de vida livre, o cálculo do número mínimo amostral é um grande desafio, principalmente, quando existe um vazio de informações sobre a estimativa populacional e a prevalência da doença no meio silvestre.

3.3 Identificação dos quirópteros

Os morcegos foram identificados utilizando as chaves dicotômicas propostas por Vizotto; Taddei (1973); Barquez; Giannini; Mares (1993); Charles-Dominiqué; Brosset; Jouard (2001); Gregorin; Taddei (2002) e confirmação por especialista na ordem.

3.4 Coleta e armazenamento do tecido cerebral

O procedimento foi realizado conforme o método padrão e seguindo as normas de biossegurança, no qual foi realizado um corte transversal na porção occipital do crânio dos morcegos mediante o uso de uma tesoura. Procedeu-se, a seguir, a abertura da caixa craniana e a retirada do tecido cerebral com o auxílio de uma pinça. Este tecido foi fragmentado e macerado com uma lâmina de bisturi descartável, e posteriormente, armazenado em um microtubo de 2 mL e mantido a temperatura de - 80°C até o momento da extração do RNA (figura 11).

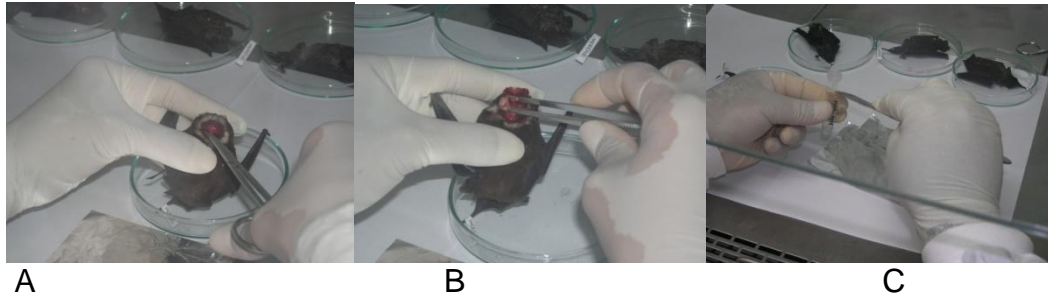


Figura 11 – Corte na área cefálica e retirada da região occipital e parietal dos morcegos (A); Retirada de fragmentos de tecido cerebral dos morcegos (B). Armazenamento de fragmentos de tecido cerebral dos morcegos em recipiente plástico estéril (C).

3.5 Extração do RNA

A extração do RNA foi realizada com tiocianato de guanidina (TRIzol®/Invitrogen™) segundo recomendações do fabricante.

Foi utilizado para a extração do RNA, aproximadamente 50mg do tecido cerebral misturado com 1 mL de tiocianato de guanidina em um tubo de 2,5 ml. Em seguida foi homogeneizado em agitador por aproximadamente 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 200µL de clorofórmio e homogeneizado em agitador, permanecendo em repouso a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Na sequência a solução foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm na temperatura de 4°C para separação das fases aquosa e orgânica. Após esta centrifugação, transferiu-se a fase aquosa, cerca de 650µL, para outro microtubo de 1,5 mL, e se acrescentou 500µL de álcool isopropanol. Foi realizada uma nova homogeneização e colocado a temperatura ambiente por 10 minutos para precipitação do RNA. A mistura foi novamente centrifugada por 10 minutos a 12.000 rpm na temperatura de 4°C e o sobrenadante foi removido e acrescentando-se 1 mL de etanol a 75% gelado para lavagem do RNA. Após nova homogeneização foi centrifugado por 5 minutos a 7.500 rpm a temperatura de 4°C. Finalizada esta etapa, foi removido o sobrenadante e os tubos foram secos na cabine de fluxo laminar por 1 hora, e o RNA foi ressuspensão em 30µL de água livre de RNase e DNase, homogeneizado em agitador e armazenado a -80°C até o uso.

3.6 Transcrição Reversa – RT

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA) foi inicialmente realizada a reação de transcrição reversa, cuja mistura continha 2,5 µL do RNA extraído (controle positivo (CP) ou controle negativo (CN) ou da amostra de tecido cerebral de morcego), 5µL do tampão 5X (250mM Tris-HCl [pH 8,3], 50mM MgCl₂, 500mM KCL, 20 mM DTT), 0,8mM dNTP (Amresco), 0,5mM DTT, 0,252 µM do Primer 304 (Invitrogen) (fig 12), 0,252 µM do Primer 504(Invitrogen), 0.2 U da transcriptase reversa AMV (Finnzymes)), 5U de inibidor de RNase (BioLabs) e água livre de DNase/ RNase (Invitrogen) até um volume de 25 µL. A mistura foi submetida a uma temperatura de 42°C durante 40 minutos e armazenada a – 20⁰ C até o momento do uso na PCR.

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A amplificação do produto da RT foi realizada pelo método da Reação em cadeia pela polimerase cuja mistura da reação continha: 5 µL do cDNA, 5µL do tampão 10X (10M KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris-HCl [pH 8,8], 2,0 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100), 0,8mM dNTP (Amresco), 0,252 µM do Primer 304 (Invitrogen), 0,252 µM do Primer 504 (Invitrogen), 1,5 mM MgSO₄, 0,75U da Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água livre de DNase/ RNase (Invitrogen) até um volume de 50 µL. A mistura foi submetida a temperatura de 94⁰ C durante 1 minuto, seguida de 40 ciclos, a temperatura de 94°C a 30 segundos, 37°C, durante 30 segundos, 72°C por 1,30 minutos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos e armazenada a – 20⁰ C

Como controle positivo (CP) foi utilizado CVS – Challenger Virus Standard, (vírus padrão) fornecido pelo Instituto Pasteur. Foram utilizados dois controles negativos no procedimento: uma solução de cérebro de camundongo normal, sadio, (CCN), e outro utilizando somente água livre de DNase e RNase (CN), estes controles foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados para as amostras analisadas.

O par de iniciadores (figura 12) utilizado neste estudo amplifica um segmento de 248 pb , baseado na especificidade para a região conservada do gene N conforme indicado por Orciari et al.(2001).

Primer	Sequência	Sentido	Gene
304	5'- TTGACGAAGATCTTGCTCAT- 3'	anti-sense	N
504	5'- TATACTCGAATCATGATGAATG GAGGTCGACT-3'	sense	N

Figura 12 - Primes utilizados na RT-PCR para identificação do vírus da raiva.

Fonte: Orciari et al.(2001).

3.8 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram visualizados usando a eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE 0,5 X (Tris Borato EDTA) corado com brometo de etídio, visualizado mediante a utilização de fotodocumentador.

As amostras e os controles foram colocados para migrar juntamente com um marcador de peso molecular durante 40 minutos a uma voltagem de 110 Volts.

3.9 Caracterização da cepa do vírus controle

As amostras do controle positivo foram caracterizadas no sentido de assegurar a respeito da manutenção de sua positividade e desenvolver o aprendizado das principais técnicas de biologia molecular que são empregadas na identificação do vírus rábico e seus genótipos. A amostra de CVS fornecida pelo Instituto Pasteur, foi submetida a extração do RNA e realizada RT-PCR, conforme

descrito nos itens 3.5, 3.6, 3.7 e realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, para visualização do produto da amplificação dessa reação, observando-se a banda de 248 pb característica do vírus da raiva para essas condições (figura 13).

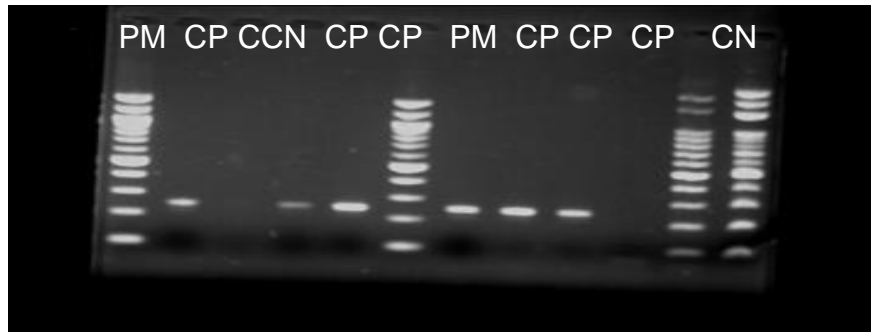


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos da amplificação da RT-PCR para CP (vírus controle) Controle Positivo; CCN - Cérebro de camundongo normal; CN-Controlle negativo com água livre de DNase e RNase; PM (padrão de peso molecular 100 pb).

Posteriormente foi realizado o sequenciamento de um segmento do cDNA do CVS, para verificar se a sequência obtida se correspondia efetivamente com o vírus da raiva, essa etapa foi realizada no Instituto Leonidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AM).

Acesso GenBank	Descrição	Máxima identidade
HQ891318.1	Rabies virus strain B2c, complete genome	100%
HQ829841.1	Rabies virus isolate ptzn nucleoprotein (N) gene, complete CDs	100%
HM535790.1	Rabies virus strain CVS-N2c, complete genome	100%
GQ918139.1	Rabies virus strain CVS-11, complete genome	100%
GU992321.1	Rabies virus strain CVS nucleoprotein (N) gene, complete cds	100%

Figura 14- Resultado do BLAST da sequência nucleotídica do segmento do vírus padrão da raiva com outras sequências obtidas no GenBank (2011).

A amostra foi amplificada com os primers anteriormente descritos na PCR, sendo o produto purificado com o kit GFX (Amersham) de acordo com as recomendações do fabricante e em seguida, a reação de sequenciamento foi realizada com o kit BigDye terminator V3.1 (Applied Biosystems), sendo as sequências determinadas pelo sequenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems). A sequência nucleotídica produzida foi submetida a uma análise de BLAST, apresentando 100% de similaridade com outras sequências nucleotídicas do vírus da raiva disponíveis na base de dados pública do GenBank (fig 14 e anexo 01)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Pesquisa do vírus rábico em quirópteros

As técnicas diagnósticas rotineiramente utilizadas para detecção do vírus rábicos são: imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (IIC) (VIEIRA et al.,2010). Para a realização da IIC, um fragmento do tecido cerebral do animal suspeito de raiva é macerado e preparada uma solução que será inoculada em camundongos com 21 dias de idade. Os camundongos são observados por um período de 21 dias, com a finalidade de verificar a manifestação clínica da raiva. O isolamento do vírus rábico em cultivo celular é obtido em quatro dias. Esta técnica é uma alternativa para substituir a utilização de camundongos. Embora a IFD seja um método de execução rápida, o resultado negativo não é conclusivo, devendo esperar a conclusão da IIC para fechar o diagnóstico. O desempenho da IIC também está condicionado ao estado de autólise da amostra do tecido cerebral (KOPROWSKY, 1996; PEIXOTO et al., 2000; VIEIRA et al., 2010).

A aplicação de técnicas de biologia molecular, ao longo das três últimas décadas, tem contribuído para o desenvolvimento de testes mais ágeis na detecção do vírus da raiva. A detecção do RNA viral, pelo método da RT-PCR, tem sido proposta por alguns autores, como uma alternativa mais rápida e sensível para a detecção do vírus rábico (BOURHY et al., 1999; HEALTON, 1997; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002). Dantas Junior et al. (2004) demonstraram que a técnica de RT-PCR é uma metodologia extremamente valiosa e que pode ser utilizada na rotina em laboratórios para o diagnóstico do vírus rábico.

A OMS ainda não recomenda a utilização de técnicas moleculares na rotina do diagnóstico *postmortem* da raiva, orientando que sejam apenas complementares ao diagnóstico convencional. Contudo, diante dos resultados promissores que os métodos moleculares vêm apresentando, novos horizontes apontam para a capacidade desta técnica, ultrapassar a sensibilidade das técnicas tradicionais, podendo fornecer um diagnóstico específico e preciso no *antemortem* (DANTAS JÚNIOR et al., 2004; FOOKS et al., 2009). Para o desenvolvimento da presente pesquisa foi escolhida a técnica de RT-PCR por ser um método prático e rápido para diagnosticar o vírus da raiva.

As amostras coletadas no presente estudo foram submetidas ao diagnóstico da raiva pela técnica de RT-PCR. O resultado foi negativo para todas as amostras testadas (figura 15 e anexo 02), no entanto apesar deste resultado não é possível afirmar que o vírus rábico não esteja circulando em quirópteros no estado de Roraima.

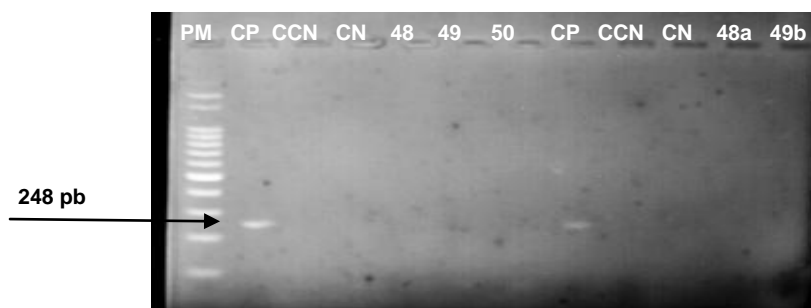


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de amplificação dos CP- Controle Positivo; CCN-Cérebro de camundongo normal; CN-Controlé negativo com água livre de DNase e RNase e Amostras 48,49,50,48a,49b; PM (padrão de peso molecular 100 pb).

A captura de morcegos durante o forrageamento ou a saída dos abrigos com redes de neblina, com a finalidade de avaliar a circulação do vírus rábico, é uma atividade que implica em um grande esforço amostral ou seja, um número grande de indivíduos precisam ser coletados. Porém, existe a limitação legal para o número de espécies silvestres coletadas na natureza, por serem animais protegidos por lei (BRASIL, 2008). Salienta-se que a recomendação do Ministério da Saúde é a avaliação da circulação do vírus rábico através da demanda espontânea (BRASIL, 2010).

O índice de positividade do vírus rábico em morcegos, no Brasil, tem sido observado quando as amostras são coletadas em locais com histórico de agressões a humanos, ou encontrados caídos no chão e com comportamento suspeito, sinais que podem ser alusivos à raiva em quirópteros. Os morcegos analisados no presente estudo não apresentaram comportamento suspeito, mas foram coletados em locais onde ocorreram casos de agressões a humanos e animais domésticos. Conforme Cunha et al. (2006), ao analisarem 7.393 amostras de morcegos

provenientes do estado de São Paulo, com características suspeitas constatarem um índice de positividade de 1,3% utilizando as técnicas de IFD e IIC.

Por outro lado, estudos realizados com amostras reduzidas de quirópteros apresentaram resultados positivos, distinguindo dos resultados apresentados no presente estudo. Vieira et al. (2010), por exemplo, analisaram 199 morcegos hematófagos, capturados em saída de caverna no Rio de Janeiro, e constataram um índice de positividade para raiva de 3,5%, utilizando a técnica de RT-PCR. Corroborando com esta informação Queiroz et al. (2009) relatam a positividade entre 0 e 3% para raiva em uma pequena amostra de morcegos capturados nas mesmas condições na região noroeste do estado de São Paulo, utilizando para o diagnóstico do vírus rábico a técnica de IFD e IIC.

Considerando a importância epidemiológica da raiva, este estudo contribuiu para o aumento do conhecimento sobre as espécies de morcegos hematófagos e não hematófagos de Roraima, embora esta pesquisa não tenha detectado nenhuma amostra positiva, o estado dispõe de uma importante ferramenta, a RT-PCR, para diagnosticar o vírus rábico, ressaltando que este trabalho foi um passo inicial e que novos estudos precisam ser desenvolvidos, aprimorando as estratégias de coletas, conforme indicado por Queiroz et al. (2009), a fim de monitorar a presença do vírus da raiva no Estado.

4.2 Identificação dos quirópteros

Foram identificados 94 quirópteros, pertencentes a seis famílias (Phyllostomidae, Noctilionidae, Vespertilionidae, Molossidae, Mormoopidae e Emballonuridae) e 19 espécies (figura 16), com diferentes hábitos alimentares. Considerando a compilação atualizada das espécies de morcegos para a Amazônia Brasileira realizada por Bernad; Tavares; Sampaio (2011), Roraima possui o relato da presença de 42 espécies de quirópteros distribuído em 5 famílias (Phyllostomidae, Noctilionidae, Emballonuridae, Molossidae e Mormoopidae), das quais a família Phyllostomidae é a mais representativa.

No presente estudo, a família Vespertilionidae, até então sem relato para Roraima, foi identificada com duas espécies, *Myotis nigricans* e *Eptesicus diminutos*.

Algumas espécies foram capturadas, mas não foram coletadas, podendo destacar uma espécie pertencente ao gênero *Glossophaga* e outra da família Emballonuridae, *Rhynchonycteris naso*. Das 19 espécies identificadas neste estudo, 12 foram coincidentes com a compilação de Bernad; Tavares; Sampaio (2011) e as outras cinco espécies (*Diaemus Youngi*, *Noctilio albiventris*, *Myotis nigricans*, *Eptesicus diminutus* e *Cynomops planirostris*) foram identificadas como novas ocorrências para o estado de Roraima. *Sturnira sp* e *Glossophaga sp* necessitam de mais dados para uma identificação mais precisa.

Distintamente do que ocorre em outras áreas urbanas do país, Boa Vista possui quatro espécies sem registro para zonas antropizadas ou consideradas raras como: *Noctillio albiventris*, *Artibeus planirostris*, *Eptesicus diminutus* e *Cynomops planirostris* (PACHECO et al., 2010).

A estimativa do índice de diversidade de espécie, Shanon-Weiner no conjunto de todas as coletas foi de H' : 0,9755, que neste estudo foi calculado com o auxílio do Software Diversidade de Espécies - DivEs v2.0 Service Pack 2 de acordo com Rodrigues (2007), no entanto, é necessário a realização de novos inventários a fim de relacionar as espécies e o ambiente estudado para avaliar a significância desse índice quanto a diversidade e a riqueza de espécies no estado.

No bioma Amazônico ocorrem as três espécies hematófagas (*Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*) (ALBERICO et al., 2000), e para Roraima, até este estudo só havia relato da espécie *Desmodus rotundus* e a partir desta pesquisa foi ampliada esta ocorrência com a identificação da espécie *Diaemus youngi*. Os indivíduos de *Desmodus rotundus* foram capturados em cinco municípios (Amajari, Boa Vista, Rorainópolis, Caracaraí e Alto Alegre) configurando um potencial risco epidemiológico para a transmissão da raiva. A espécie *Diaemus youngi* foi coletada apenas no município de Cantá, mas esta é uma espécie cuja preferência alimentar e por sangue de aves (CARTER et al., 2006). No entanto, estudos realizados por Bobrowiec (2007), sobre a dieta de morcegos, na Amazônia brasileira, revelaram que de fato o principal item consumido por *D. youngi* é sangue de aves. Porém, em uma amostra de fezes analisada no referido estudo foi detectado o consumo de sangue de suíno, que segundo Bobrowiec (2007), apesar de ser um único registro esse achado pode ser um indicativo de uma possível flexibilidade alimentar deste morcego hematófago.

Família	Espécie	Município	Nº de Individuos	Hábito Alimentar
Phyllostomidae	<i>Desmodus rotundus</i>	Amajari, Boa Vista, Rorainópolis, Caracaraí Alto Alegre	13 02 02 04 03	Hematófago
	<i>Carollia perspicillata</i>	Boa Vista	04	Frugívoro
	<i>Artibeus planirostris</i>	Boa Vista, Rorainópolis	02 01	Frugívoro
	<i>Phyllostomus elongatus</i>	Caracaraí, Rorainópolis	01 01	Onívoro
	<i>Artibeus lituratus</i>	Caracaraí, Boa Vista	01 01	Frugívoro
	<i>Vampyrum spectrum</i>	Caracaraí	01	Carnívoro
	<i>Micronycteris minuta</i>	Boa Vista, Caracaraí	01 01	Insetívoro
	<i>Phyllostomus discolor</i>	Cantá	02	Onívoro
	<i>Diaemus youngi</i> *	Cantá	01	Hematófago
Phyllostomidae	<i>Sturnira sp</i> *	Alto Alegre	01	Frugívoro
	<i>Glossopha SP</i>	Boa Vista	01	Nectarívoro Frugívoro
Noctilionidae	<i>Noctilio albiventris</i> *	Amajari, Rorainópolis, Caracaraí Boa Vista	01 01 01 03	Insetívoro
	<i>Noctilio leporinus</i>	Caracaraí	01	Piscívoro e insetívoro
Vespertilionidae	<i>Myotis nigricans</i> *	Boa Vista Uiramutã Alto Alegre	01 09 01	Insetívoro

Figura 16 - Famílias e espécies de quirópteros coletados em Roraima no período de julho de 2010 a julho de 2011.

Vespertilionidae	<i>Eptesicus diminutus</i> *	Uiramutã	03	Insetívoro
Molossidae	<i>Molossus molossus</i>	Boa Vista	03	Insetívoro
		Cantá	02	
Alto Alegre	07			
Caracaraí	02			
Uiramutã	02			
Amajari, Rorainópolis	10 01			
	<i>Cynomops planirostris</i> *	Boa Vista	01	Insetívoro
Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	Caracaraí	01	Insetívoro
Emballonuridae	<i>Rhynchonycteris naso</i>	Boa Vista	01	Insetívoro

*novas ocorrências para Roraima.

Figura 16 - Famílias e espécies de quirópteros coletados em Roraima no período de julho de 2010 a julho de 2011 (continuação).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através da técnica de RT-PCR, mostraram não haver morcegos infectados pelo vírus da raiva nas amostras analisadas no presente estudo. No entanto, não é possível afirmar que o vírus rábico não circule nos quirópteros de Roraima, visto que foi estudado um número pequeno de morcegos. Todavia, *Desmodus rotundus* foi capturado em cinco municípios (Amajari, Boa Vista, Rorainópolis, Caracaraí e Alto Alegre), indicando um risco epidemiológico para a raiva.

Foram identificadas 19 espécies de quirópteros distribuídas em seis famílias, destas uma nova família (Vespertilionidae) foi identificada pela primeira vez para o estado. Este estudo, também identificou cinco 5 novas espécies de morcegos ainda sem relato de ocorrência para Roraima, sendo elas: *Diaemus youngi*, *Noctilio albiventris*, *Myotis nigricans*, *Eptesicus diminutus* e *Cynomops planirostris*), dessa forma esta pesquisa contribuiu com novas informações sobre a distribuição de quirópteros em Roraima.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ALBERICO, M.; CADENA, A.; HERNÁNDEZ-CAMACHO, J. ; MUÑOZSABA, Y. Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. **Biota Colombia**, Bogotá, v.1, n.7, p.43-75, mar. 2000.
- BAER, G. M.; LENTZ, T. L. **Rabies pathogenesis to the central nervous system**. 2.ed. Florida: CRC Press, 1991.
- BARBOSA, R. I.; XAUD, H. M.; COSTA e SOUZA, J. M. **Savanas de Roraima – Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrossilvipastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005.
- BARQUEZ; M. R.; GIANNINI, P. N.; MARES, A. M. **Guide to the bats of Argentina**. Oklahoma: Museum of Natural History, 1993.
- BATISTA, H. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.2, n.35, p.125-144, fev. 2007.
- BELOTTO, A.; LEANES, L.F.; SCHNEIDER, M.C.; TAMAYO, H.; CORREA, E. Overview of rabies in the Americas. **Virus Research**, Bethesda, v.4, n.111, p.5-12, fev. 2005.
- BERNARD, E., TAVARES, V.C.; SAMPAIO, E. Updated compilation of bat species (Chiroptera) for the Brazilian Amazonia. **Biota Neotropica**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-12, jan. 2011.
- BOURHY, H; KISSI, B; AUDRY, Z; SMRECZAKA, K.M. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. **Journal General virology**, Washington, v.6, n.80, p.2545-2557, nov.1999.
- BOBROWIEC, P. E.D. **Caracterização molecular da dieta do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (mammalia: chiroptera) na Amazônia brasileira**. Manaus, 2007. 101f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas.
- BRADANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, O.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of virology**, Washington, v.75, n.3, p.3268-3276, nov. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da raiva**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.108 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Mapas da raiva no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 108 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Sanidade Animal. **Raiva Brasil e regiões 2011**. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br> > Acesso em: 10 out. 2011.

CARTER, G. G.; COEN, C. E.; STENZLER, L. M.; LOVETTE, I. J. Avian host DNA isolated from the feces of whitewinged vampire bats (*Diaemus youngi*). **Acta Chiropterologica**, Bethesda, v.8, n.02, p. 255–274, nov. 2006.

CHARLES-DOMINIQUE, P.; BROSSET, A.; JOUARD, S. **Atlas des Chauves-Souris de Guyane**. 1 ed. Paris: Muséum national d'Histoire naturelle, 2001.

COLLIER, L. **A text for students of medicine, dentistry and microbiology**. 2.ed. New York: Oxford University Press, 2000.

CUNHA, E. M. S.; SILVA, L. H. Q.; SOUZA, M. C. C.; LARA, H.; NASSAR, A. F. C.; ALBAS, A.; SODRÉ, M. M.; PEDRO, W. A. Raiva em morcegos na região norte e noroeste do Estado de São Paulo: 1997-2002. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.6, n.40, p.1082-1086, dez. 2006.

DANTAS-TORRES, F. BATS AND THEIR ROLE IN HUMAN RABIES EPIDEMIOLOGY IN THE AMERICAS. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.2, n.14, p.193-202, oct. 2008.

DANTAS JUNIOR, J. V.; KIMURA, L. M. S.; FERREIRA, M. S. R.; FIALHO, A. M.; ALMEIDA, M. M. S.; GRÉGIO, C. R. V.; ROMIJN, P. C.; LEITE, J. P. G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.3, p.398-400. dez. 2004.

FABER, M.; PULMANAUSAHAKUL, R.; NAGAO, K.; PROSNIAK, M.; RICE, A.B.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v.101, n.46, p.16328-16332, nov. 2004.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses: Family Rhabdoviridae**. 4.ed. London: Academic Press London, 2005.

FERNANDES, C. G. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2001.

FEKADU, M.; SHADOCK, J. H. Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. **American Journal Veterinary Research**, Bethesda, v.45, n.4, p.724-729, apr. 1984.

FOOKS, A.R; JOHNSON, N; FREULIN, M.C; WAKELEY, R.P; BANYARD, C.A; MCELHINNEY, L. et al, Emerging Technologies for the Detection of Rabies Virus: Challenges and Hopes in the 21st Century. **Plos neglected tropical diseases**, Bethesda, v.9, n.3, p.530-535, sep. 2009.

GREGORIN, R.; TADDEI, A. V. Chave artificial para a identificação de Molossídeos brasileiros. **Journal Neotropica Mammal**. (sl) v.1, n.9, p.13-32, jun. 2002.

HEALTON, P. R. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. **Journal Clinic Microbiology**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2762-2766, nov. 1997.

HINRICHSEN, S. L.; NOVA, A. V.; RENGELL, F. S. **Tratado de Infectologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Censo demográfico 2010. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/censo2010>>. Acesso em: 12 de jan. 2011.

KOPROWSKY, H. **The mouse inoculation test**. 3.ed. Geneva: World Health Organization, 1996.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; CARNIELI, JR. P.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.; MACEDO, C.I.; FERREIRA, K.C.S.; ACHKAR, S.M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.4, n.40, p. 36-39, jan. 2007.

KUNZ, T.H.; FENTON, M.B. **Bat ecology**. 2.ed. Chicago: The University of Chicago Press, 2003. 254 p.

KUZMIN, I.V.; ORCIARI, L.A.; ARAI, Y.T.; SMITH, J.S.; HANLON, C.A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C.E. 2003. Bat lyssavirus (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. **Virus Research**, Bethesda, v.3, n.95, p.65-79, jun.2003.

KUZMIN, I.V.; HUGHES, G.J.; BOTVINKIN, A.D.; ORCIARI, L.A.; RUPPRECHT, C.E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. **Virus Research**, Bethesda, v.5, n.111, p.28–43, nov. 2005.

MARQUES, G.H.F.; KOTAIT, I. Situação epidemiológica da raiva dos herbívoros no Brasil. In: Seminário Internacional – Morcegos como transmissores da raiva, 2001, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2001. p.27-28.

MARSTON, D.A.; MCELHINNEY, L.M.; JOHNSON, N.; MÜLLER, T.; CONZELMANN, K.K.; TORDO, N.; FOOKS, A.R. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in

the G-L 3' non-translated region. **Journal of General Virology**, Washington, v.88, n.9, p.1302-1314, dez. 2007.

MEBATION, T.; KONIG, M.; CONZELMANN, K.K. 1996. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. **Cell**, Amsterdam, v.7, n.84, p.941-951, jul. 1996.

MELLO, M.A.R.; PASSOS, F.C. Frugivoria em morcegos brasileiros. In. PACHECO, S.M; MARQUES, R.V.; ESBERÁRD, C.E.L. (Org). **Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação**. Porto Alegre: Armazém digital, 2008. p.231-234.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D.C.; SPITSIN, S.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. **Journal of Virology**, Washington, v.3, n.73, p. 510-518, fev. 1999.

ORCIARI, L.A.; NIESGODA, M.; HALON, C.A.; RUPPRECHT, C.E.; Rapid Clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, Surrey, v.19, p.4511-4518, may. 2001.

PACHECO, S. M.; MARQUES, R. V.; ESBERÁRD, C.E.L. **Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação**. Porto Alegre: Armazém Digital, 2008.

PACHECO, S. M.; SODRÉ, M.; GAMA, A. R.; BREDT, A.; CAVALLINI SANCHES, E. M.; MARQUES, R. V.; GUIMARÃES, M. M. ; BIANCONI, G. V. Morcegos Urbanos: Status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera Neotropical**, (sl), v.16, n1. p. 629-647, jul. 2010.

PEIXOTO, Z. M. P.; CUNHA, E. M. S.; SACRAMENTO, D. R. V.; SOUZA, M. C. A. M.; SILVA, L. H. Q.; GERMANO, P. L.; KROEFF, S. S.; KOTAIT, I. Rabies Laboratory Diagnosis: Peculiar Features of Samples from Equine Origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.3, n.3, p.1-7, may. 2000.

POISSON, N.; REAL, R.; GAUDIN, Y.; VANEY, M.C.; KING, S.; JACOB, Y.; TORDO, N.; BLONDEL, D. Molecular basis virus phosphoprotein P and dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. **Journal of General Virology**, Washington, v.82, n.11, p.2691-2696, nov. 2001.

QUEIROZ, L. H.; CARVALHO, C. DE; BUSO, D. S.; FERRARI, C. I. DE L.; PEDRO, W. A. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 à 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 1, n. 42, p. 9-14, jan-fev 2009.

REIS, R. N.; PERACCHI, L. A; PEDRO, A. W.; LIMA, P. I. **Morcegos do Brasil**. Londrina: EDUEL, 2007.

REZENDE, M.B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; VASCONCELOS, P.F.C.; REZENDE JÚNIOR, A. B. **Doenças Infeciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup, 1997.

RODRIGUES, W.C. **Diversidade de Espécies- DivEs**. Versão 2.0. Software e Guia do Usuário. 2005. Disponível em: <http://www.ebras.vbweb.com.br>. Acesso em: 12 de nov.2010.

RORAIMA. Edital MS/CNPq/FEMACT - N° 001/2006. Seleção de Projetos de Pesquisa e desenvolvimento tecnológico prioritário para o Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial do Estado de Roraima**, Boa Vista, RR, de 18 de janeiro de 2007.

RORAIMA. Secretaria de Estado da Saúde. **Relatório Epidemiológico Anual**. Boa Vista. 2010. 127 p.

ROSA, E. S. T; BRANDÃO, P. E.; BARBOSA, T. F. S.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; DE OLIVEIRA, R. C.; GRISSARD, E. C.. FERREIRA, W.; DA SILVA LIMA, R. J.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUZA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. C. Bat transmitted human rabies outbreaks, brazilian Amazon. **Emerging Infection Disease**, Atlanta, v.12, n.8, p.1197-1202, jul. 2006.

RUPPRECHT, C. E.; HALON, C.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 2, n.8, p.327-343, jul. 2002.

SANTOS, O. S. N.; ROMANOS, V. T. M.; WIGG, D. M. **Introdução a virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 2002.

SCHNEIDER, M. C., ALMEIDA, G. A., SOUZA, L. M., MORARES, N. B.; DIAZ, R. C. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.10, n.30, p.196-203, fev.1996.

SCHNEIDER, M. C.; ROMIJN, P. C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; DA SILVA, D. F.; BELOTTO, A.; DA SILVA, J. B.; LEANES, L. F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? **Revista Panamericana de Salud Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.3, p.260-269, fev. 2009.

SILVA, M. L. C. R.; LIMA, F. S.; GOMES, A. A. B.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; BERNADI, F.; Isolation of rabies from the parotid salivary glands of foxes from Paraíba state, Brazil. **Brazilian Journal microbiology**, São Paulo, v.2, n.40, p.446-449, nov. 2009.

SIMMONS, N.B. **Chiroptera: Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3.ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005.

SIPAM. BRASIL. **Imageamento com sensor SAB para monitoramento do estado de Roraima**. Brasília: EDSPAM, 2007. 185p.

SODRÉ, M. M.; GAMA, A. R. DA; ALMEIDA, M. F. DE. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.52, n.2, p.75-81, abr. 2010.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural Proteins of Rabies Virus. **Journal of Virology**, Washington, v.7, n.2, p.241-249, sep.1971.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. **History of rabies and global aspects**. 2.ed. Boston: CRC Press, 1991.

TAKAOKA, N. Y. **Raiva**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2004.

TORDO, N. **Characteristics and molecular biology of the rabies virus**. 4.ed. Geneva: World Health Organization, 1996.

VELASCO-VILLA, A.; ORCIARI, L.A.; JUAREZ-ISLAS, V.; GOMEZ-SIERRA, M.; PADILLA-MEDINA, I.; FLISSER, A.; SOUZA, V.; CASTILLO, A.; FRANKA, R.; ESCALANTE-MANE, M.; SAURI-GONZALEZ, I.; RUPPRECHT, C. E. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n. 2, p.1697-1710, apr. 2006.

VIEIRA, L. F. P.; PEREIRA, P. E.; BRANDRÃO, R. N.; OLIVEIRA, P.; CARNIELI-JUNIOR, A. C.; GALANTE, C. N.; KOTAIT, I. Caracterização molecular do vírus da raiva isolados de *Desmodus rotundos* capturados no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 2, p.343-349, fev. 2010.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. **Revista da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de São José do Rio Preto**, São Jose do Rio Preto, v.1, n. 1, p.1-72, mar. 1973.

WADA, M. Y.; BEGOT, A. L.; NORONHA, S. L. B.; ALMEIDA, I. F.; LIMA, R. J. S.; SANTOS, L. B. C.; MONTEIRO A.; CRUZ, R. S.; SILVA, I. N. O.; SOARES, D. S.; PINHEIRO, A. S.; MORAES, J. R. F.; TENÓRIO, A. S.; PEREIRA, A. G. G.; PENHA, T. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; BARROS, V. L. S.; VASCONCELOS, P. F. C.; BARBOSA, T. F. S. B.; KOTAIT, I. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no Município de Portel-Pará, março/abril de 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico- n.6**, Brasília, 15 set. 2004. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 10 de out. 2010.

WHO. World Health Organization. **Expert Consultation on Rabies: first Technical report series 931**. Geneva: World Health Organization, 2005.

WHO. World Health Organization. **Rabies**. Geneva: World Health Organization, 2010.

WUNNER, H. W. **Rabies Virus**. 2.ed. San Diego : Academic Press, 2007.

ANEXO 1 - Sequência nucleotídica obtida do CVS (amostra do vírus padrão) e alinhamento com a Cepa do vírus da raiva CVS-N2c, genoma completo.

ATGAGTCATTCGAATACGTCTTGTTTAAAAATTCGGCGAATGAGTTTGGACGGG
CTTGATGATTGGAAGTACTGACTGAGACATATCTCCGTATATGAGATCTCTTCAGTCG
ACCTCCATTCATCATGATTCGAGTAT

HM535790.1- Rabies virus strain CVS-N2c, complete genome
Length= 11927, Score = 250 bits (135), Expect = 2e-63, Identities = 135/135 (100%),
Gaps = 0/135 (0%), Strand=Plus/Minus

```

Query 1      ATGAGTCATTCGAATACGTCTTGTTTAAAAATTCGGCGAATGAGTTTGGACGGGCTTGAT
60
      |||
Sbjct 1421   ATGAGTCATTCGAATACGTCTTGTTTAAAAATTCGGCGAATGAGTTTGGACGGGCTTGAT
1362

Query 61     GATTGGAAGTACTGACTGAGACATATCTCCGTATATGAGATCTCTTCAGTCGACCTCCATTCA
120
      |||
Sbjct 1361   GATTGGAAGTACTGACTGAGACATATCTCCGTATATGAGATCTCTTCAGTCGACCTCCATTCA
1302

Query 121    TCATGATTCGAGTAT 135
      |||
Sbjct 1301    TCATGATTCGAGTAT 1287

```

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

ANEXO 2- Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de amplificação dos CP-Controlle Positivo; CCN-Cérebro de camundongo normal; CN-Controlle negativo com água livre de DNase e RNase e Amostras 51-93; PM (padrão de peso molecular 100pb).

