

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA DA RAIVA E DE ANTICORPOS
ANTIRRÁBICOS EM MORCEGOS DO NOROESTE DE
SÃO PAULO**

Daiene Karina Azevedo Casagrande
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA DA RAIVA E DE ANTICORPOS
ANTIRRÁBICOS EM MORCEGOS DO NOROESTE DE
SÃO PAULO**

Daiene Karina Azevedo Casagrande

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba - SP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

**ARAÇATUBA – SP
2014**

Catálogo na Publicação(CIP)

Casagrande, Daiene Karina Azevedo

C334o Ocorrência da raiva e de anticorpos antirrâbicos em morcegos do Noroeste de São Paulo / Daiene Karina Azevedo Casagrande. -- Araçatuba: [s.n], 2014.
56 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz

1. Vírus da raiva. 2. Anticorpos. 3. Isolamento viral. 4. Morcegos. I. T.

CDD 614.563

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP



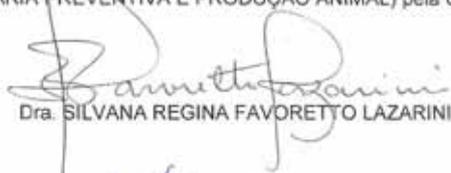
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Ocorrência da raiva e de anticorpos antirrábicos em morcegos do noroeste do Estado
de São Paulo.

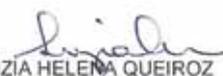
AUTORA: DAIENE KARINA AZEVEDO CASAGRANDE

ORIENTADORA: Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ

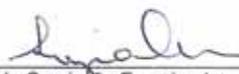
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dra. SILVANA REGINA FAVORETTO LAZARINI


Dr. AVELINO ALBAS


Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ

DATA DA REALIZAÇÃO: 27 de junho de 2014.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DAIENE KARINA AZEVEDO CASAGRANDE – brasileira, solteira, nascida em 29 de dezembro de 1988 no município de Campinas – SP. Ingressou no Curso de Medicina Veterinária em 2007 e graduou-se em 2011 pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) campus Araçatuba – SP. No ano de 2012 iniciou o Mestrado no Curso de Pós-graduação em Ciência Animal da mesma faculdade e atualmente é proprietária do laboratório de análises clínicas veterinárias “Verum Diagnóstico Veterinário” atuando como patologista clínica.

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, pela intensa
dedicação em me ensinar
como ser alguém melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua vontade em minha vida de forma tão boa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária, em especial às Profs. Cárís Maroni Nunes e Márcia Marinho pelas contribuições no Exame Geral de Qualificação.

À Professora Luzia Helena Queiroz, pela confiança, dedicação e paciência.

Ao Dr. Avelino Albas e à bióloga Mileia Ricci Picolo da APTA de Presidente Prudente – SP pelo apoio e realização dos testes sorológicos.

Ao Cristiano de Carvalho que foi um grande amigo e mestre e que me ensinou tudo o que eu sei sobre trabalhar a campo.

Aos meus pais, por estar o tempo todo à disposição do outro lado da linha e do estado, por tudo que abdicaram para que estivesse aqui e pela dedicação incondicional sem nada esperar em troca.

À minha avó, porque também é minha mãe, pela preocupação com cada detalhe da minha formação e acima de tudo pela fé depositada em mim.

Ao Kleber, meu sócio que é também irmão e conselheiro, que segurou tantas vezes as pontas do negócio para que eu pudesse me dedicar a meu título de mestrado, que corrigiu meus rascunhos e que muitas vezes me incentivou quando faltava ânimo.

À Rafaela, pelas horas de paciência e amizade dedicadas, quando ninguém mais o teria.

Ao Matheus, pelos piores conselhos e as melhores histórias durante essa jornada.

À Fabi, pela receptividade, pelo abrigo nesses momentos tensos de defesas e pela companhia sempre incrivelmente divertida.

À Carol, pela convivência, pelos momentos incríveis entre os dias de experimento e aulas, pelo companheirismo, pelos estronogofes de domingo, pelo ombro amigo e por todo exemplo de vida que ela me dá desde que eu a conheço.

A mais uma Carol, pela parceria que começou na graduação e atravessou a pós-graduação, mesmo quando as disciplinas apertavam nosso tempo.

Aos mestres que participaram da minha formação, pelo exemplo e inspiração.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO: VIGILÂNCIA DA RAIVA EM MORCEGOS NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO	13
Material e Métodos.....	42
Amostras de morcegos para diagnóstico e sorologia de raiva	42
Pesquisa do vírus da raiva	43
Pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o vírus.....	44
Resultados	45
Discussão	48
Conclusões.....	52
REFERÊNCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 Ilustração esquemática da morfologia e composição estrutural do vírus da raiva 16

Capítulo 2

- Figura 1 Mapa da região de Araçatuba, mostrando os municípios com casos positivos apenas em morcegos (cinza escuro), em morcegos e bovinos (cinza médio) e apenas em bovinos (cinza claro). Os números correspondem aos casos em morcegos e os pontos indicam a localização dos abrigos de morcegos com anticorpos neutralizantes do vírus 46
- Figura 2 Número de morcegos hematófagos distribuídos de acordo com o título de anticorpos neutralizantes para a raiva. Negativos (<0,06 UI/ml); reagentes com baixos títulos (0,10-0,19 UI/ml); títulos médios (0,20-0,49) e títulos protetores (>0,50) 48

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1	Resultados da pesquisa de vírus da raiva em morcegos da região noroeste do estado de São Paulo de 2008 a 2012	45
Tabela 2	Morcegos positivos para raiva, segundo a espécie e hábito alimentar, no período de 2008 a 2012	46

OCORRÊNCIA DA RAIVA E DE ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS EM MORCEGOS DO NOROESTE DE SÃO PAULO

RESUMO - A raiva é uma importante zoonose que acomete os mamíferos e tem os morcegos como reservatórios, tanto em áreas urbanas quanto rurais. Desde 1998 a região Noroeste do Estado de São Paulo tem registrado casos de raiva em morcegos, predominantemente em áreas urbanas. O objetivo deste trabalho foi investigar a circulação do vírus da raiva em morcegos da região noroeste do Estado de São Paulo por meio da pesquisa do vírus em diversas espécies e da pesquisa de anticorpos neutralizantes em morcegos hematófagos. Um total de 1490 amostras de cérebro de morcegos encaminhadas ao Laboratório de Raiva e de 125 amostras de soros obtidos de morcegos vampiros capturados de quatro abrigos da região foi avaliado durante o período de 2008 a 2012. O vírus da raiva foi detectado em 26 (1,97%) dos 1314 morcegos não-hematófagos, por meio da imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (ICC) e em nenhum dos 176 morcegos vampiros examinados. Por outro lado, 7% (9/125) dos morcegos vampiros apresentaram título de anticorpos neutralizantes acima de 0,5UI/mL, 65% (81/125) tinham títulos baixos (0,10 a 0,5UI/mL) e 28% (35/125) foram negativos pela técnica de microneutralização simplificada (SFIMT) em células BHK21. O índice de positividade observado foi de 1,74% o que está acima do percentual médio de 1,3% registrado anteriormente nesta região. A alta percentagem de morcegos vampiros com anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva indica uma exposição recente ao vírus o que confirma que, medidas de vigilância devem ser implementadas para evitar um aumento na ocorrência da doença.

Palavras-chave - vírus da raiva, anticorpos, isolamento viral, morcegos.

OCCURRENCE OF RABIES AND RABIES ANTIBODIES IN BATS IN THE NORTHWEST OF SÃO PAULO

SUMMARY - Rabies is a major zoonosis which affects mammals from all over the world and has bats as reservoirs of, both urban and rural areas. Since 1998 cases of rabies in bats have been recorded in the northwest region of São Paulo State, predominantly in urban areas. The objective of this study was to investigate the circulation of rabies in bats in the northwestern region of São Paulo by searching of the virus in different species and the presence of rabies neutralizing antibodies in vampire bats. A total of 1,490 brain samples from bats were sent to the Laboratory of Rabies and 125 serum samples of vampire bats from four shelters in the region were examined from 2008 to 2012. The virus presence was determined by fluorescent antibodies test (FAT) and mouse inoculation test (MIT) while neutralizing antibodies were determined by the simplified microneutralization (SFIMT) in BHK21 cells. Rabies virus was detected in 26 (1.97%) out of 1,314 non-hematophagous bats and in none of the 176 vampire bats examined. Only 7% (9/125) of vampire bats had antibody titers above 0.5UI/ml, 65% (81/125) had low titers (0.10 to 0.5UI/ml) and 28% (35/125) were negative. The positivity rate observed was 1.74% which is above the average rate of 1.3% recorded previously in this region. The high percentage of vampire bats with neutralizing antibodies to rabies virus indicates a recent exposure to the virus which confirms that surveillance measures must be in place to avoid an increase in disease occurrence.

Keywords: rabies virus, virus isolation, antibodies, bats.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Conhecida desde a antiguidade e reportada de diferentes maneiras, cada autor, ao seu modo e ao seu tempo, observou características peculiares da raiva.

O primeiro registro da doença data do século XXIII a.C. na Mesopotâmia, onde o Código de Eshnunna previa pagamento de indenização pelo dono do cachorro “louco” que provocasse a morte de alguém em virtude de uma mordedura (BAER, 1991; JACKSON; WUNNER, 2007).

Os egípcios cultuavam o deus Sirius representado por um cão, provavelmente a primeira associação da raiva ao cão; Homero e Demócrito (500 a.C.), na Grécia, associaram a raiva ao termo grego lyssa (loucura) e descreveram-na como uma doença contagiosa transmitida por cães; Galeno (200 a.C.) recomendava a remoção cirúrgica de um ferimento causado por cão para prevenir a doença (JACKSON, 2013).

Em Roma, em meados do século I a terminologia vírus, equivalente em latim a veneno, foi adotada para falar da saliva de cães doentes. Cornelius Celsius descreveu a raiva humana e foi o criador do termo hydrophobia, sendo quatro séculos depois outro romano, Célio Aureliano, a descrever a forma de transmissão da doença por meio de mordidas de cães, cavalos, macacos, lobos, ursos e até mesmo aves (BAER et al., 1985; HATSHBACH, 1989).

Desde então todas as epizootias relatadas incluíam canídeos como principais transmissores e reservatórios de raiva. Segundo Baer (1991), a primeira epizootia de raiva que se tem registro aconteceu na região da Francônia quando uma alcatéia atacou um pequeno vilarejo, levando a 30 mortes humanas com os sintomas da doença. Na porção norte-americana, atribuíam-se aos cães e às raposas os principais surtos de raiva em porcos e outros animais domésticos (JACKSON; WUNNER, 2007). Já na América

Latina, acredita-se que a raiva canina tenha sido introduzida pelos colonizadores, que traziam cães em seus navios (LORD, 1980).

Em 1908, em Santa Catarina, deflagrou-se uma grave epizootia em que os bovinos foram os principais animais acometidos, naquela ocasião Antonio Carini e Parreiras Horta, em 1911, levantaram pela primeira vez a hipótese de que os morcegos hematófagos eram os transmissores do vírus para os herbívoros (KOTAIT, 1996). Muito embora pesquisadores importantes como Louis Pasteur e Aldechi Negri já tivessem realizado avanços significativos como a criação da vacina, em 1885 e a identificação histopatológica da inclusão citoplasmática patognomônica, em 1903, denominada Corpúsculo de Negri, essa hipótese foi prontamente rechaçada no meio científico, ridicularizada e apelidada de “fantasia tropical”. Mesmo tendo identificado corpúsculos de Negri nas amostras obtidas de bovinos e morcegos na ocasião do surto, Carini e Horta permaneceram desacreditados. A aceitação dos morcegos como transmissores da raiva só ocorreu em 1931 quando pesquisas no Brasil demonstraram que surtos de poliomielite e botulismo em bovinos e humanos eram, na verdade, raiva transmitida por morcegos hematófagos. (ATANASIU, 1975; CARNEIRO, 1954; DIETZSCHOLD et al., 1996).

Finalmente, em 1936, Pawan isolou pela primeira vez o vírus da raiva em morcegos insetívoros incluindo-os também na epidemiologia da doença (PAWAN, 1936 apud KOTAIT, 1996).

A raiva é causada por um vírus pertencente à ordem Mononegavirales; à família Rhabdoviridae e ao gênero Lyssavirus (ICTV, 2012). Morfologicamente, a partícula viral assemelha-se a um projétil balístico cilíndrico cujas extremidades são assimétricas, de maneira que uma é achatada e a outra arredondada (TORDO, 1996).

Do mesmo modo que os outros Rhabdovírus, os Lyssavirus são compostos basicamente por RNA (2% a 3%), proteína (65% a 75%), lipídio (15% a 25%) e carboidrato (3%) (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Estruturalmente, o vírus pode ser dividido em duas porções. A primeira delas é composta pelo ribonucleocapsídeo helicoidal, que armazena o material genético

viral. Envolvendo o material genético aparece a segunda estrutura: o envelope de natureza lipoprotéica. As glicoproteínas estão inseridas no envelope e interagem com o nucleocapsídeo via proteína matriz. As espículas glicoprotéicas formam um trímero na superfície do vírion, de aproximadamente 5 a 10 nanômetros (nm) de comprimento e 3 nm de diâmetro, com separações de 5 nm umas das outras (Figura 1) (FAUQUET et al., 2005; TORDO, 1996).

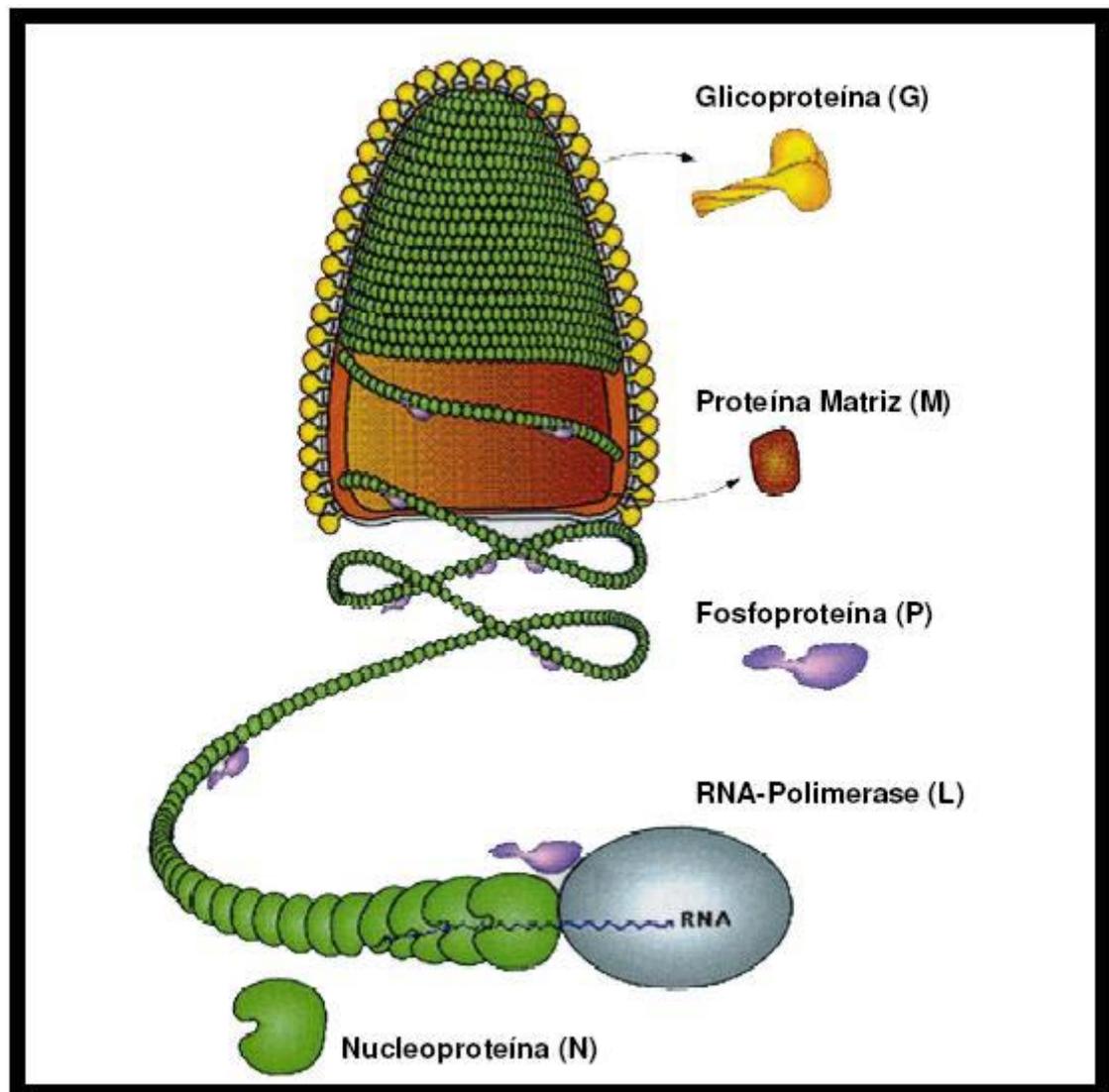


FIGURA 1- Ilustração esquemática da morfologia e composição estrutural do vírus da raiva. Fonte: Adaptado de Fauquet et al., 2005.

Até algumas décadas atrás se acreditava que a raiva era causada por apenas uma espécie viral, até que, por meio de estudos sorológicos que avaliaram a glicoproteína e da nucleoproteína e por meio de estudos antigênicos e genéticos, comprovou-se a existência de diferentes tipos virais, denominados inicialmente de sorotipos e posteriormente de genótipos (GTs) (RUPPRECHT et al., 2002). Inicialmente foram identificados quatro sorotipos: vírus clássico da raiva foi classificado como sorotipo 1 e posteriormente GT1 ou RABV (Rabies vírus); o sorotipo 2 ou GT2 foi encontrado em uma amostra isolada de morcego frugívoro da espécie *Eidolon helvum*, na Nigéria, e ficou conhecido como vírus Lagos bat; ainda na Nigéria, mas isolados a partir de gatos o vírus Mokola ficou determinado como sorotipo 3 ou GT3 e por fim, o sorotipo 4 ou GT4 isolado em um caso de raiva humana no sul da África, conhecido como vírus Duvenhage (CRICK, 1982; MEREDITH, 1971; SCHNEIDER, 1983).

Com a introdução das técnicas de biologia molecular, com procedimentos minuciosos como o seqüenciamento nucleotídico dos genes da nucleoproteína (N), da glicoproteína (G) e de pseudogenes dos vírus do gênero *Lyssavirus*, o termo genótipo foi substituído por **espécie viral**, tendo sido possível a comprovação da existência de doze espécies diferentes, segundo a última classificação viral do Comitê Internacional de Taxonomia Viral - ICTV: *vírus da Raiva* clássico (VRC); *vírus Lagos bat* (VLB); *vírus Mokola* (VMOK); *vírus Duvenhage* (VDUV); *vírus European bat lyssavirus 1* (VEBL1); *vírus European bat lyssavirus 2* (VEBL2); *vírus Australian bat lyssavirus* (VABL); *vírus Aravan* (VARA); *vírus Khujand* (VKHU); *vírus Irkut* (VIRK); *vírus West Caucasian bat* (VWCB) e *vírus Shimoni bat* (VSHI) (ICTV, 2012).

Estas espécies estão agrupadas em dois filogrupos com patogenicidade e imunogenicidade bem distintas. No Filogrupo 1 estão espécies virais o VRC, VDUV, VEBL-1 e VEBL-2, o VABL, VARA, VKHU, VIRK, VWCB. Os quatro primeiros possuem sítios antigênicos bem conservados nas glicoproteínas de superfície, permitindo a neutralização cruzada e a imunidade protetora frente à vacinação com as vacinas produzidas com os vírus clássicos. Já as espécies

VARA, VKHU e VIRK são fracamente neutralizados por anticorpos desencadeados por vacinação convencional com amostras clássicas (HANLON et al., 2005). No Filogrupo 2 estão as espécies de vírus africanos, o VMOK e o VLB, tidos como causadores de “encefalites relacionadas” que não são ou são fracamente neutralizados por anticorpos desencadeados por vacinas clássicas (BANDRANE; OIE, 2013; TORDO, 2001). O VWCB não apresenta reação cruzada com qualquer dos filogrupos e o VSHI ainda não foi incluído em algum destes filogrupos (OIE, 2013).

Baseado na tipificação antigênica por anticorpos monoclonais (AcMs) e no seqüenciamento genético do vírus foi possível identificar variantes antigênicas do vírus da raiva clássico em vários países do mundo e no Brasil. Nos estudos realizados no Brasil, dois painéis de anticorpos monoclonais foram utilizados. O primeiro agrega um conjunto de oito AcMs pré-estabelecidos pela OPAS (DIAZ et al., 1994), a partir do qual foi possível mostrar que as amostras brasileiras formam dois grupos distintos caracterizados por variantes que circulam em morcegos hematófagos e não hematófagos (ciclo aéreo) e variantes que circulam em cães e mamíferos terrestres (ciclo terrestre) (FAVORETTO et al., 1999; FAVORETTO et al., 2002). O segundo painel utilizado no Brasil é composto por 14 AcMs anti-N contra antígenos de diferentes lyssavírus (Lagos bat, Mokola, Duvenhage e Danish bat), produzido na Inglaterra, foi utilizado em pesquisas conduzidas no Rio Grande do Sul (ROEHE et al., 1997).

Pesquisas realizadas no Brasil, para a caracterização genética, por meio do seqüenciamento de genes que codificam, principalmente para a nucleoproteína viral (gene N), tem demonstrado a existência em dois grupos distintos compreendendo variantes mantidas em populações de morcegos hematófagos e não-hematófagos (OLIVEIRA et al., 2010; SODRE et al., 2010) e variantes mantidas em populações de cães e mamíferos terrestres silvestres, incluindo espécies domésticas e silvestres (CARNIELI et al., 2008, 2009; FAVORETTO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2012).

Análises de amostras isoladas de espécies silvestres do Brasil demonstraram ciclos silvestres da doença, onde o vírus da raiva é mantido em determinadas espécies de animais como o sagüi (*Callithrix jacchus*) no Estado do Ceará provocando mortes em humanos (FAVORETTO et al., 2001) e as raposas (*Pseudalopex vetulus*) e cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), em Estados do nordeste do Brasil (CARNIELI et al., 2008).

A classe *Mammalia*, que compreende todos os mamíferos, possui mais do que 4.000 espécies e todas elas são consideradas susceptíveis e transmissoras de raiva (RUPPRECHT et al., 2001). Todavia, as ordens *Carnivora* e *Chiroptera* destacaram-se por serem mais hábeis na dispersão do vírus (ACHA; SZYFRES, 2003; RUPPRECHT et al., 2002).

Os quirópteros constituem-se no segundo maior grupo dos mamíferos, do mundo, com um total de 1.120 espécies descritas, sendo que 172 destas ocorrem no Brasil e dentre as quais 41 já foram diagnosticadas com raiva (REIS et al. 2011; SODRE et al., 2010).

O ciclo de transmissão da raiva, classicamente, inicia-se por meio da agressão de um animal doente a outro indivíduo suscetível expondo-o à saliva infectada (TAKAOKA, 2000). O agressor, por meio de arranhaduras ou mordeduras, promove uma solução de continuidade pela qual o vírus consegue atravessar e atingir porções da musculatura estriada e tecidos adjacentes (JACKSON, 2003). Muito embora sejam raros, há relatos de casos onde a transmissão ocorreu por meio do contato do vírus com mucosas (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007); da infecção através da inalação do vírus em um abrigo com superpopulação de morcegos (JONES et al. 2000); e por transplante de órgãos (BURTON et al., 2005).

O período de incubação da raiva é bastante variável, podendo durar de duas semanas a vários e meses (CHARLTON et al. 1997). À variabilidade atribuem-se fatores como: a distância da lesão em relação ao SNC, a anatomia da região quanto à abundância de nervos periféricos, a severidade e extensão

da lesão, a quantidade de vírus inoculado, a patogenicidade da cepa viral e a própria reação sistêmica do hospedeiro (JACKSON, 2003).

Uma vez alocados nos tecidos musculares, as partículas virais dão início a um intenso processo de replicação (ZACHARY, 2007) chegando aos terminais axonais dos neurônios motores e começando sua migração centrípeta em fluxo axonal retrógrado até o SNC (LICATA; HARTY, 2003) atingindo os cornos ventrais e os núcleos motores do tronco encefálico. A partir de então a disseminação viral passa a acontecer em um movimento centrífugo levando as partículas aos nervos periféricos e às glândulas salivares, onde permanecem em replicação até que sejam inoculados em um novo indivíduo (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Quanto aos sinais clínicos, a raiva pode se manifestar de duas maneiras: furiosa, freqüentemente observada em carnívoros e paralítica que é a mais comum em herbívoros. A diferença sintomática é decorrente da localização das lesões, de forma que na raiva paralítica estas se localizam na medula espinhal e no tronco encefálico, enquanto que na furiosa costumam ocorrer também lesões cerebrais (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

A forma furiosa é marcada por hiperexcitabilidade, fotofobia, sialorréia, dificuldade de deglutição e agressividade. O quadro progride para ataxia, incoordenação, convulsões, coma e morte. Já na forma muda ou paralítica a fase de excitação é muito curta ou até mesmo inexistente (KOTAIT; 1996).

Estima-se que a cada dez minutos ocorre uma morte por raiva no mundo e que mais de 15 milhões de pessoas são submetidas a tratamento profilático da raiva ao ano. Porém, a quase totalidade dos casos (95%) em humanos na Ásia e África, levando ocorrência de cerca de 50 mil óbitos por raiva transmitida principalmente por cães em todo o mundo (WHO, 2013).

No início da década de 2000 estima-se que a carga da doença denominada de DALY (Disability Adjusted Life Years), ou seja, o tempo estimado de vida perdido pelos indivíduos acometidos era de 1.160 milhões por 1.000 habitantes (COLEMAN et al., 2004).

No Brasil, com o sucesso das medidas de controle da raiva canina os quirópteros passaram a responder pela transmissão de 70% dos casos humanos na última década (2004-2013), e os cães, em segundo lugar, com 22% dos casos (OPAS, 2014; SCHNEIDER et al, 2009). A ascendência dos morcegos ao primeiro lugar na transmissão de raiva humana é atribuída, principalmente, a um surto ocorrido entre os anos de 2004 e 2005 nos Estados do Pará e Maranhão (OPAS, 2014).

Na América Latina os morcegos foram responsáveis pela transmissão de 727 casos de raiva humana entre 1990 e 2013 e, dos 243 casos ocorridos nos últimos dez anos (2004-2013), 91,4% foram devidos a morcegos hematófagos e apenas 8,6% a espécies não hematófagas ou não identificadas (OPAS, 2014). Esse grande número de casos transmitidos por morcegos no Brasil é conseqüente de surtos ocorridos no estado do Pará em 2004 (DA ROSA et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2005). Os casos de raiva humana transmitidos pelo cão diminuíram de forma significativa de 50, em 1990, para apenas seis entre o período de 2011 e 2013, todos ocorridos no Estado do Maranhão (RECIFE, 2013).

Durante o período de 2001 até julho de 2013 foram registrados no Brasil, 1.854 casos de raiva em morcegos, sendo 1201 (64,8%) em espécies não hematófagas, 327 (17,6%) em hematófagos e 326 (17,6%) em espécies não identificadas (CALDAS, 2013; OPAS, 2014). Até o ano de 2009, o Estado de São Paulo respondeu pelo maior número de casos relatados em diversas espécies no Brasil (SODRE et al., 2010) e apenas em sua região noroeste foram registrados entre 1998 a 2007, 50 casos, todos de espécies não hematófagas (QUEIROZ et al., 2009), com índice de positividade de 1,2%.

Em relação à transmissão para herbívoros, os morcegos hematófagos são os principais transmissores, isso porque as agressões são diárias (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Existem três espécies hematófagas de morcegos *Desmosdus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla eucaudata*, e,

embora todos estejam envolvidos no ciclo de transmissão, o *D. rotundus* é rotineiramente o mais comum em áreas rurais (FUNASA, 1996).

O diagnóstico de raiva é realizado post-mortem, em animais agressores, potencialmente infectados ou coletados para fins de controle epidemiológico (TRIMARCHI; SMITH, 2002). As amostras são obtidas de tecido nervoso e geralmente são fragmentos de cérebro, cerebelo e medula espinhal. Devem ser mantidas resfriadas ou congeladas e, no caso dos animais silvestres, devem ser encaminhados inteiros para possibilitar a identificação da espécie (BRASIL, 2008).

Uma das primeiras técnicas de diagnóstico laboratorial da doença data de 1903, quando o médico italiano Aldechi Negri reportou uma inclusão citoplasmática em impressões de tecido nervoso que é considerada patognomônica da enfermidade. Em 1973 Dean e Abelseth adaptaram a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) desenvolvida por Goldwasser e Kissling (1958) a qual é utilizada até hoje nos laboratórios de referência de diagnóstico de raiva (DEAN et al., 1996; RUDD et al., 1980).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza o uso das técnicas de identificação viral por meio da Imunofluorescência Direta (IFD), conforme descrita por Dean et al., (1996) e o isolamento viral que pode ser feito tanto “*in vitro*”, por meio dos cultivos celulares, como “*in vivo*”, por meio da Prova Biológica (PB) de inoculação em camundongos, segundo Koprowski (1996) como os principais métodos de diagnóstico. Ambos os testes são considerados de alta sensibilidade e especificidade e devem ser usados (MESLIN; KAPLAN, 1996).

A IFD é uma técnica bastante sensível e específica, de baixo custo para realização e rápida obtenção dos resultados. Seu sucesso está intimamente relacionado à qualidade dos reagentes e conjugado e à experiência do examinador, todavia é uma técnica que permite a análise de amostras de diversas origens que podem ser frescas, congeladas ou até glicerizadas (DEAN et al., 1996).

Além dessas duas técnicas preconizadas pela OMS (Organização Mundial de Saúde), outros métodos diagnósticos também são possíveis para a detecção do vírus rábico. Dentre eles estão a fixação do tecido em formol para análise histopatológica em que os corpúsculos de Negri são patognomônicos (LÉPINE, 1976); as técnicas moleculares de identificação do RNA viral a partir de diferentes tecidos (ROEHE et al., 2002); a detecção por meio de imunohistoquímica (MACHADO et al., 2004) e a utilização de Anticorpos Monoclonais (AcMs), que tem grande importância em investigações epidemiológicas, para se determinar a variante antigênica da amostra e a espécie transmissora (SMITH et al., 1991).

Enquanto as técnicas descritas acima identificam antígenos virais em amostras suspeitas da doença, as provas sorológicas procuram encontrar e quantificar anticorpos antirrábicos, neutralizantes ou não. Popularmente são técnicas empregadas a fim de se conhecer a resposta imunológica de humanos e animais após a vacinação, contudo, também podem ser utilizadas em investigações sorológicas que objetivem identificar a exposição dos animais sem que tenha havido a presença de sinais clínicos ou óbitos (CLIQUET et al., 1998).

Os morcegos adquirem a raiva principalmente por meio de mordeduras resultantes da interação intra e interespécies (ALMEIDA et al., 2011) resultando na maioria das vezes na morte dos infectados. Nos morcegos hematófagos, o aparecimento da doença em uma população só ocorre quando um percentual muito grande da população está infectada, sendo que uma parte pode se infectar sem apresentar sintomas (MAYEN, 2003), não resultando na morte e levando ao desenvolvimento de anticorpos (LANGONI et al., 2008). Desta forma a pesquisa sorológica nestes animais pode contribuir para avaliação epidemiológica da circulação do vírus causador da doença, por indicar que houve exposição dos soropositivos ao vírus e até mesmo um surto recente da doença na colônia (ALMEIDA et al., 2011; MEGID, 2007).

A pesquisa de vírus em morcegos hematófagos é realizada, na maioria das vezes, a partir de vigilância ativa, com captura de morcegos em abrigos e a prevalência não ultrapassa 1%, considerando que esta é a porcentagem de morcegos aparentemente saudáveis que podem estar infectados com o vírus da raiva (KOTAIT, 1996). Os relatos de casos confirmados em morcegos vampiros referem-se sempre a áreas de grande concentração de bovinos e normalmente descrevem um comportamento atípico dos mesmos, como a atividade alimentar diurna em currais ou mostram que os mesmos foram encontrados mortos em locais de acesso de bovinos e em cavernas com grande concentração de morcegos (SOUZA et al., 1997; SUGAY e NILSSON, 1966). Um único relato de literatura descreve a presença de um *Desmodus rotundus* positivo para raiva em área urbana, no município de Ubatuba, SP (FERRAZ et al., 2007).

Por outro lado, quando se tratam de morcegos não hematófagos, em sua maioria proveniente de áreas urbanas, a pesquisa do vírus é realizada a partir de vigilância passiva, em amostras enviadas ao laboratório pelos serviços de saúde ou pela própria população. Nestes casos a porcentagem média de positividade no Estado de São Paulo tem variado desde 0,7% e 0,9%, na década de 90, para a região metropolitana de São Paulo (ALMEIDA et al., 1994) e região de Botucatu (CORTES et al., 1994), respectivamente, até 1,6% para as regiões de Presidente Prudente (ALBAS et al., 2005), São José do Rio Preto (CUNHA et al., 2006) e Araçatuba (QUEIROZ et al., 2009) no final da década de 90 e na década de 2000. Estudos semelhantes realizados nos Estados Unidos e Canadá revelaram percentuais variando entre 4,6 a 9,0% (BURNETT, 1989; CHILDS et al., 1994; FELLER et al., 1997; PARKER et al., 1999).

Entretanto, quando a pesquisa do vírus da raiva foi feita, por vigilância ativa, em espécies não hematófagas, a partir de morcegos assintomáticos capturados em seus abrigos, os índices variaram de 0% a 3% (DEBBIE, 1977; PYBUS, 1986; TRIMARCHI; WHITBY, 1996).

Estudos sorológicos têm sido realizados em morcegos e outras espécies silvestres, no Brasil e em outros países, como forma de vigilância ativa da raiva (ALMEIDA et al., 2001; ARAUJO et al., 2014; BOWEN et al., 2013; JORGE et al., 2010; LANGONI et al., 2008; TURMELLE et al., 2010). Todas as pesquisas têm detectado a presença de anticorpos neutralizantes nas espécies estudadas, e, embora a OIE (Organização Internacional de Saúde Animal) recomende que devesse haver uma melhor padronização das técnicas sorológicas para estas espécies (OIE, 2013), esta é uma ferramenta importante para estudar a atividade do vírus em populações.

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi investigar a circulação do vírus da raiva em morcegos da região noroeste do Estado de São Paulo por meio da pesquisa do vírus em diversas espécies e por meio da pesquisa de anticorpos neutralizantes em morcegos hematófagos.

REFERÊNCIAS

ALBAS, A.; ZOCOLLARO, P.T.; ROSA, T.Z.; CUNHA, E.M.S. Diagnóstico laboratorial da raiva na região oeste do Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 6, p. 493- 495, 2005.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 3 ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de La Salud, Oficina Sanitária Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 2003, p.351-383.

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

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

ALMEIDA, M.F.; MARTORELLI, M.F.A.; SODRÉ, M. M.; KATAOKA, A. P. A. G.; ROSA, A. R.; OLIVEIRA, M. L.; AMATUZZI, E. Diagnóstico e sorologia de raiva em morcegos do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n.2, p.140-145, 2011.

ARAUJO, D.B.; MARTORELLI, L.A.; KATAOKA, A.P.G.A.; CAMPOS, A.C.A.; RODRIGUES, C.S.; SANFILIPPO, L.F.; CUNHA, E.M.S.; DURIGON, E.L.; FAVORETTO, S.R. Antibodies against rabies virus in terrestrial wild mammals in native rainforest on the north coast of São Paulo State, Brazil. **J. Wildl. Dis.**, v. 50, n.3. DOI: 10.7589/2013-04-099. Disponível em:

<http://www.jwildlifedis.org/doi/pdfplus/10.7589/2013-04-099>. Acesso em: 23 Maio, 2014.

ATANASIU, P.; GAMET, A.; GUILLON, J.C. Limites du diagnostic de la rage au laboratoire. **Rec. Med. Vet.**, v. 11, p.1083-1088, 1968.

ATANASIU, P. Animal inoculation and the Negri body. In: BAER, G.M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975, v.1, p.374-396.

BAER, G.M. Rabies virus. In: FIELDS, B.N. **Virology**. New York: Raven, 1985, p.1133-1156.

BAER, G.M. Vampire bat and bovine paralytic rabies. In: **The natural history of rabies**. 2. ed. Florida, CRC Press, 1991, p.341-366.

BANDRANE, H.; TORDO, N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. **J. Virol.**, v.75, n. 17, p. 8096-8104, 2001.

BOWEN, R.A.; O'SHEA, T.J.; SHANKAR, V.; NEUBAUM, M.A.; NEUBAUM, D.J.; RUPPRECHT, C.E. Prevalence of neutralizing antibodies to rabies virus in serum of seven species of insectivorous bats from Colorado and New Mexico, United States. **J. Wildl. Dis.**, v. 49, n.2, p. 367-374, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de diagnóstico laboratorial da raiva**. Brasília: 2008, 108p.

BURNETT, C.D. Bat rabies in Illinois: 1965 to 1986. **J. Wildl. Dis.** v. 25, n.1, p.10-19, 1989.

BURTON, E. C.; BURNS, D. K.; OPATOWSKY, M. J.; EL-FEKY, W. H.; FISCHBACH, B.; MELTON, L.; SANCHEZ, E.; RANDALL, H.; WATKINS, D. L.; CHANG, J.; KLINTMALM, G. Rabies Encephalomyelitis. Clinical, neuroradiological, and pathological findings in 4 transplant recipients. **Arc. Neur.**, v. 62, p. 873-882, 2005.

CALDAS, E.P. Raiva Silvestre no Brasil: situação, riscos, desafios e perspectivas de controle. In: REDIPRA - **Reunião de Diretores de Programas Nacionais de Controle da Raiva na América Latina**, 14, 2013. Lima, Perú. Disponível em: http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=799&Itemid=336. Acesso em: 03 Abr. 2014.

CARNEIRO, D. V. M. Transmission of rabies by bats in Latin America. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, 10. Geneva, p. 775-780, 1954.

CARNIELI JUNIOR, P.; FAHL, W. O.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C.I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R.S.; MORATO, R.G.; SPÍNDOLA, R.O.; MACHADO, L.M.; UNGAR DE SÁ, J.E.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main canids host in Northeastern Brazil. **Virus Res.**, v.131, n.1, p.33–46, 2008.

CARNIELI JUNIOR, P.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W. O.; VERAS, N. M.; KOTAIT, I. Molecular characterization of Rabies Virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. **Virus Res.**, v.141, n.1, p.81–89, 2009.

CHARLTON, K. M.; CASEY, G. A.; CAMPBELL, J.B. Experimental rabies in skunks: mechanisms of infection of the salivary glands. **Can. J. Comp. Med**, v. 47, p. 363-369, 1997.

CHILDS, J. E.; TRIMARCHI, C.V.; KREBS, J.W. The epidemiology of bat rabies in new York State, 1988-1992. **Epid. Infect.**, v.113, n.3, p.51-511, 1994.

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

COLEMAN, P.G.; FÈVRE, E.M.; CLEVELAND, S. Estimating the public health impact of rabies. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, n.1, p.140-142, 2004.

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

CRICK, J.; TEGNOR, G. H.; MORENO, K. A new isolate of lagos bat virus from the Republic of South Africa. **Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.**, n. 76, p. 211-213, 1982.

CUNHA, E.M.S.; QUEIROZ DA SILVA, L.H.; LARA, M.C.C.S.H.; NASSAR, A.F.C.; ALBAS, A.; SODRE, M.M.; PEDRO, W.A. Bat rabies in the North-northwestern regions of São Paulo State – Brazil, 1997-2002. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 6, p. 1082-86, 2006.

DA ROSA, E. S. T.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J. S.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUSA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. C. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerg. Infec. Dis.**, v.12, n.8, p.1197-1202, 2006

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescence antibody test.

MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (eds.).In: **Laboratories Techniques in Rabies**. Geneva, World Health Organization,1996, p.88-95.

DIAZ, A.M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J.S. Antigenic analysis of rabies virus isolates from Latin America and the Caribbean. **Zentralbl Veterinarmed. B.**, v. 41, n. 3, p. 153-160, 1994.

DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C.E.; FU, Z.F.; KOPROWSKI, H. Rhabdoviruses. In:FIELD, B.N.; KNEPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 1137-59.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses: Family Rhabdoviridae. In: **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Virology 97 Division International Union of Microbiological Societies. Elsevier Academic Press. 2005. p. 623-633.

FAVORETTO, S.R.; MATTOS, C.C.; CARRIERI, M.L.; MATTOS, C.A.; CUNHA, E.M.S.; AGUIAR, E.A.C.; SILVA, L.H.Q.; SODRÉ, M.; SOUZA, M.C.A. e KOTAIT, I. Rabies in chiropters: typification and epidemiological study. In: INTERNATIONAL RABIES IN THE AMERICAS MEETING, 10., 1999, San Diego, CA, **Proceedings...** San Diego: California Association of Public Health Laboratory directors, 1999, p.28.

FAVORETTO, S.R.; CARRIERI, M.L.; CUNHA, E.M.S.; AGUIAR, E.A.C.; SILVA, L.H.Q.; SODRÉ, M.; SOUZA, M.C.A.; KOTAIT, I. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91-95, 2002.

FAVORETTO, S.R.; MATTOS, C.C.; MORAIS, N.B.; CARRIERI, M.L.; ROLIM, B.N.; SILVA, L.M.; RUPPRECHT, C.E.; DURIGON. E.L.; MATTOS, C.A. Rabies

virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife in Ceara State, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, p.1978–1981, 2006.

FAVORETTO, S.R.; MATTOS, C.C.; MORAIS, N.B.; ARAÚJO, F.A.A.; MATTOS, C.A. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, 2001, n.6, p.1062-1065.

FELLER, M.J.; KANEENE, J.B.; STOBIERSKI, M.G. Prevalence of rabies in bats in Michigan, 1981-1993. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 210, n. 2, p.195-200, 1997.

FERNANDES, C. G.; RIET-CORREA, F. Raiva. In: RIET-CORREA,. F **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3 ed. Santa Maria: Palloti, 2007, v.1, p.184-198.

FERRAZ, C.; ACHKAR, S.M.; KOTAIT, I. First report of rabies in vampire bat (*Desmodus rotundus*) in an urban area, Ubatuba, São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.49, n.6, p. 389-390, 2007.

FUNASA, FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle**. Brasília: Gráfica e Editora Brasil, 1996, 117p.

GOLDWASSER, R.A.; KISSILING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies vírus antigens. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.98, p.219-223, 1958.

HANLON, C.A.; KUZMIN, I.V.; BLANTON, J.D.; WELDON, W.C.; MANANGAN, J.S.; RUPPRECHT, C.E. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. **Virus Res.**, v. 111, n.1, p.44-54, 2005.

HATSHBACH, P. I.: Aspectos históricos da raiva animal e humana. **A Hora Vet.**, v. 9, n. 52, p.26-45, 1989.

ICTV - International Committee on the Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. KING, A.M.Q.; ADANS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Ed.), San Diego: **Academic Press**, 1327 p. 2012.

JACKSON, A. C. Rabies virus infection: an update. **J. Neur.**, v.9, p. 253-258, 2003.

JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. Eds. **Rabies**, 2nd ed. London: Elsevier Academic Press, 2007. 680p.

JACKSON, A.C. History of rabies research. In: JACKSON, A.C. **Rabies: scientific basis of the disease and its management**. 3. ed. San Diego, USA: Academic Press, 2013. 707p.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W., **Patologia veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole. 2000, 1415p.

JORGE, R.S.P.; PEREIRA, M.S.; MORATO, R;G; SCHEFFER, K.C.; CARNIELI JR.; P.; FERREIRA, F.; FURTADO, M.M.; KASHIVAKURA, C.K.; SILVEIRA, L.; JACOMO, A.T.A.; LIMA, E.S.; PAULA, R.C.; MAY-JUNIOR, J.A. Detection of rabies virus antibodies in Brazilian free-ranging wild carnivores. **J. Wildl. Dis.**, v.46, n. 4, p.1310-1315, 2010.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (eds). **Laboratories Techniques in Rabies**. Geneva, World Health Organization, 1996, p. 80-87.

KOTAIT, I. Infecção de morcegos pelo vírus da raiva. **Bol. Instituto Pasteur** (São Paulo), v. 1. p. 51-58, 1996.

LANGONI, H.; SOUZA, L.C.; ZETUN, C.B.; SILVA, T.C.C.; HOFMANN, J.L.; SILVA, R.C. Serological survey for rabies in sérum samples from vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v.14, n.4, p. 651-659, 2008.

LÉPINE, P., Diagnostico histopatologico. In: KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. **La rabia: tecnicas de laboratorio**. 4. ed. Ginebra Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1976, p. 58-65.

LICATA, J. M.; HARTY, R. N. Rhabdoviruses and apoptosis. **Int. Rev. Immun.**, v. 22, p.451-476, 2003.

LORD, R. D. An ecological strategy for controlling bovine rabies through elimination of vampire bats. **Vertebrate Pest Conference Proceedings Collection**. University of Nebraska. p. 170-175, 1980.

MACHADO, G.F.; QUEIROZ, L.H. ; NUNES, C.M. Detecção de antígenos do vírus da raiva em encéfalos de cão mantido em formol durante longo período.. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v. 99, n.550, p. 89-92, 2004.

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

MEGID, J. Raiva. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO DIAS, J.L. Eds. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 785-98p.

MEREDITH, C. D.; PROSSOW, A. P.; KOCK, H. V. P. An unusual case of human rabies thought to be of Chiropteran origin. **South Afr. Journ.**, v. 13 n. 45, p. 767-769, 1971.

MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M. General considerations in the production and use of brain-tissue and purified chicken-embryo rabies vaccine for human use. p. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWISK, H. **Laboratory techniques in rabies**. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 19, p. 223-233.

OIE – WORLD ORGANIZATION OF ANIMAL HEALTH. Rabies. In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2013**. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES.pdf> Acesso em: 22 Maio 2014.

OLIVEIRA, R. N.; DE SOUZA, S.P.; LOBO, R.S.; CASTILHO, J.G.; MACEDO, C.I.; CARNIELI JUNIOR, P.; FAHL, W.O.; ACHKAR, S.M.; SCHEFFER, K.C.; KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; BRANDÃO, P.E. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and gly-coprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**, v.405, n.2, p. 352–60, 2010.

OPAS - Organização Panamericana da Saúde, Organização Mundial da Saúde, **Sistema de informação epidemiológica**, database 2014, históricos anuais. Disponível em: <<http://siepi2.panaftosa.org.br/Export.aspx> e <http://sirvera.panaftosa.org.br/AcessoLivre/Logon.aspx?ReturnUrl=%2facessogeral%2fdefault.aspx>> Acesso em: 03 Abr. 2014.>

PARKER, E.K.; HAROLD, D.; REDEN, S. E.; TOLSON, M. W.; TUNER, M.; KEMICK, W. Bat rabies in South Caroline, 1970-90. **J. Wildl. Dis.**, v. 35, n. 3, p. 557-564, 1999.

PAWAN, J. L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bats. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 30, p.101 - 130, 1936.

PYBUS, M.J. Rabies in insectivorous bats of western Canada, 1979 to 1983. **J. Wildl. Dis.**, v. 22, n. 3, p. 307-313, 1986.

QUEIROZ, L. H.; CARVALHO, C.; BUSO, D. S.; FERRARI, C. I. L.; PEDRO, W.A. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** , v.42, p.9 - 14, 2009.

QUEIROZ, L. H.; FAVORETTO, S. R.; CUNHA, E. M. S.; CAMPOS, A. C. A.; LOPES, M. C.; CARVALHO, C.; IAMAMOTO, K.; ARAÚJO, D. B.; VENDITTI, L. L. R.; RIBEIRO, E. S.; PEDRO, W. A.; DURIGON, E. L. Rabies in southeast Brazil: a change in the epidemiological pattern. **Arch. Vir.** v.157, p. 93 - 105, 2012.

RECIFE (Maranhão), Últimos seis casos de raiva animal no país ocorreram no Maranhão. Recife. **Diário de Pernambuco**. 2013 Disponível em: <http://www.diariodepernambuco.com.br/app/noticia/brasil/2013/02/08/interna_brasil,422482/ultimos-seis-casos-de-raiva-animal-no-pais-ocorreram-no-maranhao.shtml> Acesso em: 20 jan. 2014.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2. Ed. Londrina: Nélio R. dos Reis, 2011. 439p.

ROEHE, P.M.; PANTOJA, L.D.; SHAEFER, R.; NARDI, N.B.; KING, A.A . Analysis of brazilian rabies virus isolates with monoclonal antibodies to *Lyssavirus* antigens. **Rev. Microb.**, v. 28, n. 4, p. 288-292, 1997.

ROEHE, P.M.; SCHAEFER, R.; PEREIRA, A.S.; Otimização da imunofluorescência direta para diagnóstico de raiva. **Acta Sci. Vet.**, v. 30, p. 53-57, 2002.

RUDD, R.J.; TRIMARCHI, C.V.; ABELSETH, M.K. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. **J. Clin. Microb.**, v. 12, p. 590=593. 1980.

RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 327-343, 2002.

SCHNEIDER, L. G.; BARNARD, B. J. H.; SCHNEIDER, H. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigations and oral vaccine studies. African Viruses. In: _____ **Proceedings of an International Conference on Rabies Control in Tropics**. Tunis. Institute Pasteur. October, 1983. p. 3-6.

SCHNEIDER, M. C.; BELOTTO, A.; ADÉ, M. P.; LEANES, L. F.; CORREA, E.; TAMAYO, H.; MEDINA, G.; RODRIGUES, M. J. Situación epidemiológica de la rabia humana en América Latina en 2004. **Bol. Epid. Org. Panam. Sal.**, v. 26, p. 2-4, 2005.

SCHNEIDER M.C.; SOUZA L.M.; MORAES N.B.; DIAZ R.C. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. **Rev. Saúde Pública**, v. 30, n.2, p.196-203.

SCHNEIDER, M.C.; ROMIJN, P.C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; SILVA, D.F.; BELOTTO, A.; SILVA, J.B.; LEANES, L.F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? **Rev. Panam. Salud Publica**, v.25, n.3, p.260-269, 2009.

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

SODRE, M.M.; GAMA, A.R.; ALMEIDA, M.F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 52, n.2, p. 75-81, 2010.

SOUZA, M.C.A.M.; BERNARDI, F.; ITO, F.H. Epidemiology of rabies: biological and serological aspects of rabies in vampire bats *Desmodus rotundus* (E.GEOFFROY) captured in Vale do Paraíba, southeastern of Brazil. **Arq. Int. Biol., São Paulo**, v.64, n.2, p.91-101, 1997.

SUGAY, W.; NILSSON, M.R. Isolamento do vírus da raiva em morcegos hematófagos do Estado de São Paulo, Brasil. **Bol. Ofic. Sanit. Panamericana**, v. 50, p.310-315, 1966.

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

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

TRIMARCHI, C.V.; DEBBIE, J.G. Naturally occurring rabies and neutralizing antibody in two species of insectivorous bats of New York State. **J. Wildl. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 366-69, 1977.

TRIMARCHI, C. V.; SMITH, J.S. Diagnostic evaluation. In: JACKSON, A.C. WUNNER, W.H. **Rabies**, San Diego: Academic Press,2002, p. 307-349.

TURMELLE, A.S.; ALLEN, L.C.; JACKSON, F.R.; KUNZ, T.H.; RUPPRECHT, C.E.; McCRANKEN, G.F. Ecology of rabies virus exposure in colonies of Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at natural and man-made roosts in Texas. **Vector-borne Zoon. Dis.**, v.10, n.2, p.165-175, 2010.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B., ESTES, M.H., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R. & WICKNER, R.B. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Family *Rhabdoviridae*. In: ____ **Virus taxonomy – classification and nomenclature of viruses**. Academic Press, 2000, p. 563-583.

WHITBY, J.E.; JOHNSTONE, P.; PARSONS, G.; KING, A.A.; HUTSON, A.M. Ten-year survey of British bats for the existences of rabies. **Vet. Rec.**, v. 139, n. 20, p. 491-493, 1996.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Centro de Prensa – **Nota descritiva nº 99 – Rabia. 2013.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>> Acesso em 20 jan. 2014.

ZACHARY, J. F., Nervous system. In: McGAVIN, M.D., ZACHARY, J.F. **Pathologic basis veterinary disease** 4th St. Louis Mosby, 2007, cap. 14, p. 833-971.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO: VIGILÂNCIA DA RAIVA EM MORCEGOS NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

VIGILÂNCIA DA RAIVA EM MORCEGOS NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO - A raiva é uma importante zoonose que acomete os mamíferos e tem os morcegos como reservatórios, tanto em áreas urbanas quanto rurais. Desde 1998 a região Noroeste do Estado de São Paulo tem registrado casos de raiva em morcegos, predominantemente em áreas urbanas. O objetivo deste trabalho foi investigar a circulação do vírus da raiva em morcegos da região noroeste do Estado de São Paulo por meio da pesquisa do vírus em diversas espécies e da pesquisa de anticorpos neutralizantes em morcegos hematófagos. Um total de 1490 amostras de cérebro de morcegos encaminhadas ao Laboratório de Raiva e de 125 amostras de soros obtidos de morcegos vampiros capturados de quatro abrigos da região foi avaliado durante o período de 2008 a 2012. O vírus da raiva foi detectado em 26 (1,97%) dos 1314 morcegos não-hematófagos, por meio da imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (ICC) e em nenhum dos 176 morcegos vampiros examinados. Por outro lado, 7% (9/125) dos morcegos vampiros apresentaram título de anticorpos neutralizantes acima de 0,5UI/mL, 65% (81/125) tinham títulos baixos (0,10 a 0,5UI/mL) e 28% (35/125) foram negativos pela técnica de microneutralização simplificada (SFIMT) em células BHK21. O índice de positividade observado foi de 1,74% o que está acima do percentual médio de 1,3% registrado anteriormente nesta região. A alta percentagem de morcegos vampiros com anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva indica uma exposição recente ao vírus o que confirma que, medidas de vigilância devem ser implementadas para evitar um aumento na ocorrência da doença.

Palavras-chave - vírus da raiva, anticorpos, isolamento viral, morcegos.

RABIES SURVEILLANCE IN BATS FROM SÃO PAULO STATE NORTHWEST REGION

SUMMARY - Rabies is a major zoonosis which affects mammals from all over the world and has bats as reservoirs of, both urban and rural areas. Since 1998 cases of rabies in bats have been recorded in the northwest region of São Paulo State, predominantly in urban areas. The objective of this study was to investigate the circulation of rabies in bats in the northwestern region of São Paulo by searching of the virus in different species and the presence of rabies neutralizing antibodies in vampire bats. A total of 1,490 brain samples from bats were sent to the Laboratory of Rabies and 125 serum samples of vampire bats from four shelters in the region were examined from 2008 to 2012. The virus presence was determined by fluorescent antibodies test (FAT) and mouse inoculation test (MIT) while neutralizing antibodies were determined by the simplified microneutralization (SFIMT) in BHK21 cells. Rabies virus was detected in 26 (1.97%) out of 1,314 non-hematophagous bats and in none of the 176 vampire bats examined. Only 7% (9/125) of vampire bats had antibody titers above 0.5UI/ml, 65% (81/125) had low titers (0.10 to 0.5UI/ml) and 28% (35/125) were negative. The positivity rate observed was 1.74% which is above the average rate of 1.3% recorded previously in this region. The high percentage of vampire bats with neutralizing antibodies to rabies virus indicates a recent exposure to the virus which confirms that surveillance measures must be in place to avoid an increase in disease occurrence.

Keywords: rabies virus, virus isolation, antibodies, bats.

Introdução

A raiva é uma encefalite viral, na maioria das vezes fatal, causada por um vírus do gênero *Lyssavirus* à qual todos os mamíferos são suscetíveis (ACHA; SZYFRES, 2003; RUPPRECHT et al., 2001). Embora seja descrita como uma das doenças mais antigas conhecidas (JACKSON, 2013), foi somente em 1911, que no Brasil, considerou-se pela primeira vez a participação dos morcegos como transmissores e reservatórios de raiva (CARINI, 1911) e, em 1931, pesquisadores alemães, também no Brasil, diagnosticaram e reconheceram a importância epidemiológica dos morcegos hematófagos na transmissão da raiva, especialmente aos herbívoros (CARNEIRO, 1954).

Os quirópteros constituem-se no segundo maior grupo dos mamíferos, do mundo, com um total de 1.120 espécies descritas, sendo que 172 destas ocorrem no Brasil, das quais 41 já foram diagnosticadas com raiva (REIS et al. 2011; SODRE et al., 2010).

No Brasil, com o sucesso das medidas de controle da raiva canina os quirópteros passaram a responder pela transmissão de 70% dos casos humanos na última década (2004-2013), e os cães, em segundo lugar, com 22% dos casos (OPAS, 2014; SCHNEIDER et al, 2007).

Na América Latina os morcegos foram responsáveis pela transmissão de 727 casos de raiva humana entre 1990 e 2013 e, dos 243 casos ocorridos nos últimos dez anos (2004-2013), 91,4% foram devidos a morcegos hematófagos e apenas 8,6% a espécies não hematófagas ou não identificadas (OPAS, 2014). A ascendência dos morcegos ao primeiro lugar na transmissão de raiva humana é atribuída, principalmente, a um surto ocorrido entre os anos de 2004 e 2005 nos Estados do Pará e Maranhão (OPAS, 2014).

Durante o período de 2001 até julho de 2013 foram registrados no Brasil, 1.854 casos de raiva em morcegos, sendo 1201 (64,8%) em espécies não hematófagas, 327 (17,6%) em hematófagos e 326 (17,6%) em espécies não identificadas (CALDAS, 2013; OPAS, 2014). Até o ano de 2009, o Estado de

São Paulo respondeu pelo maior número de casos relatados em diversas espécies no Brasil (SODRE et al., 2010) e apenas em sua região noroeste foram registrados entre 1998 a 2007, 50 casos, todos de espécies não hematófagas (QUEIROZ et al., 2009), com índice de positividade de 1,2%.

Os morcegos adquirem a raiva principalmente por meio de mordeduras resultantes da interação intra e interespecies (ALMEIDA et al., 2011) resultando na maioria das vezes na morte dos infectados. Nos morcegos hematófagos, o aparecimento da doença em uma população só ocorre quando um percentual muito grande da população está infectada, sendo que uma parte pode se infectar sem apresentar sintomas (MAYEN, 2003), não resultando na morte e levando ao desenvolvimento de anticorpos (LANGONI et al., 2008). Desta forma a pesquisa sorológica nestes animais pode contribuir para avaliação epidemiológica da circulação do vírus causador da doença, por indicar que houve exposição dos soropositivos ao vírus e até mesmo um surto recente da doença na colônia (ALMEIDA et al. 2011; MEGID, 2007).

O objetivo deste trabalho foi investigar a circulação do vírus da raiva em morcegos da região noroeste do Estado de São Paulo por meio da pesquisa do vírus em diversas espécies e da pesquisa de anticorpos neutralizantes em morcegos hematófagos.

Material e Métodos

Amostras de morcegos para diagnóstico e sorologia de raiva

Para a realização desse estudo foram utilizadas amostras de *Desmodus rotundus* colhidas no período de janeiro de 2009 a julho de 2012, em abrigos da região de Araçatuba, no noroeste paulista. A localização dos abrigos foi feita a partir dos dados fornecidos pela equipe de controle de morcegos hematófagos de Penápolis (SP), pertencente ao Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) de Araçatuba. Foram feitas visitas a propriedades dos municípios de Gabriel Monteiro e Guararapes, que tiveram casos comprovados de raiva em herbívoros no período do estudo. Também aconteceram visitas a

colônias previamente mapeadas previamente por técnicos da Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, bem como de atendimentos a produtores que relataram ocorrência de ataques aos seus rebanhos. As capturas foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob os números 12.751-3/2009 e 27.346-1/2011.

As coletas dos morcegos em abrigos foram feitas utilizando redes de neblina (“*mist nets*”) de tamanhos variados (7 x 2 m; 10 x 2 m e 12 x 2 m), armadas em bastões de madeira fixados ao chão e estrategicamente colocadas dentro dos abrigos ou à sua entrada, e redes manuais (puçás), utilizadas no interior dos abrigos. Em colônias com 10 morcegos vampiros ou mais, foi capturada uma porcentagem de 20% de espécimes dos quais foram colhidas amostras de sangue, para titulação de anticorpos e após a realização da eutanásia por deslocamento cervical, foram encaminhados ao Laboratório de Raiva da UNESP de Araçatuba, para pesquisa do vírus da raiva.

As amostras de morcegos de espécies não-hematófagas foram provenientes, em sua grande maioria, de áreas urbanas e encaminhadas ao Laboratório de Raiva de Araçatuba pelos centros de controle de zoonoses (CCZ) dos municípios da região, ou até mesmo diretamente pela população em geral, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2012. Todos os procedimentos para colheita de amostras e realização do diagnóstico laboratorial foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Pesquisa do vírus da raiva

A pesquisa do vírus da raiva foi realizada no Laboratório de Raiva da UNESP de Araçatuba, utilizando-se as técnicas de diagnóstico preconizadas pela Organização Mundial da Saúde: Imunofluorescência direta (IFD) para detecção do antígeno rábico padronizada por Dean et al. (1996) e inoculação

intracerebral em camundongos (IICC), prova biológica preconizada por Koprowisk (1996).

Pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o vírus

Colheu-se uma amostra sanguínea de morcegos vampiros (*Desmodus rotundus*) por punção intracardíaca, para a determinação de títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva, realizada no Laboratório de Raiva da APTA de Presidente Prudente. O volume mínimo de sangue obtido por indivíduo foi 500uL, o material colhido foi centrifugado para separação do soro sanguíneo e armazenado em freezer -20^o C.

Os títulos individuais de anticorpos neutralizantes foram determinados pela técnica de soroneutralização em células BHK21 por meio do microteste simplificado de inibição da fluorescência (SFIMT) descrito por Favoretto et al. (1993). Utilizou-se soro eqüino de referência nacional, fornecido pelo Instituto Butantan, contendo 200 unidades internacionais por ml (UI/ml) e os resultados corresponderam à diluição onde ocorreu decréscimo de 50% de infecção pelo vírus.

Para fins de cálculo dos títulos dos soros em Unidades Internacionais (UI/mL), comparou-se, por meio de uma regra de três, os resultados obtidos com uma amostra do soro padrão contendo 200 UI/mL. A diluição inicial das amostras de soro (1:5) correspondeu a 0,06UI/mL e todas as amostras que apresentaram inibição da fluorescência, nesta diluição ou acima dela, foram consideradas reagentes (SOUZA et al., 1997). Para fins de melhor visualização, os gráficos foram elaborados considerando-se a porcentagem de soros negativos (<0,06UI/mL), reagentes com baixos títulos (0,06-0,19 UI/mL), com títulos médios (0,20-0,49 UI/mL) e com títulos considerados protetores (>0,50 UI/mL). Para determinação da taxa de soroprevalência foi adotado o título de 0,50UI/mL, segundo Langoni et al. (2008) e Almeida et al. (2011).

Resultados

Foram analisadas 1.490 amostras de morcegos no período de estudo sendo que dessas, 1314 (88,2%) corresponderam às espécies não hematófagas e o restante, 176 amostras (11,8%), a morcegos *Desmodus rotundus*, a principal espécie hematófaga descrita na região. Todos os morcegos hematófagos foram diagnosticados como negativos para a presença do vírus da raiva aos testes de IFD e IICC. Dentre as amostras de morcegos de espécies não hematófagas, 26 (1,98%) foram positivas, sendo o maior número de positivos registrados nos anos de 2009 e 2010, com nove casos por ano (Tabela 1), sendo o índice de positividade total de 1,74%.

Com relação às amostras positivas 88,5% (23/26) corresponderam a espécies de morcegos insetívoros das famílias Molossidae (38,5%) e Vespertilionidae (50%) e apenas 11,5% (3/26) à espécie frugívora *Artibeus lituratus*, pertencente à família Phyllostomidae (Tabela 2). Dentre as amostras de espécies insetívoras 43,5% (10/23) pertenciam ao gênero *Molossus* com predominância da espécie *M. rufus*, 39,1% (9/23) ao gênero *Epitesicus*, com predominância da espécie *E. furinalis* e 17,4% (4/23) à espécie *Myotis nigricans*.

Tabela 1- Resultados da pesquisa de vírus da raiva em morcegos da região noroeste do estado de São Paulo de 2008 a 2012.

Hábito Alimentar	Não-hematófagos			Hematófagos			% de Positividade Total
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	
Ano							
2008	1	237	238	0	0	0	0,42
2009	9	363	372	0	16	16	2,32
2010	9	349	358	0	37	37	2,28
2011	1	113	114	0	71	71	0,54
2012	6	226	232	0	52	52	2,11
TOTAL	26	1288	1314	0	176	176	1,74

Tabela 2- Morcegos positivos para raiva, segundo a espécie e o hábito alimentar, no período de 2008 a 2012.

Família / Espécie	Hábito		
	alimentar	Positivo	
Phyllostomidae <i>Artibeus lituratus</i>	Frugívoro	3	
Molossidae	<i>Molossus</i>		
	<i>molossus</i>	Insetívoro	3
	<i>Molossus rufus</i>	Insetívoro	7
Vespertilionidae	<i>Eptesicus diminutus</i>	Insetívoro	2
	<i>Eptesicus furinalis</i>	Insetívoro	7
	<i>Myotis nigricans</i>	Insetívoro	4
TOTAL		26	

Seis municípios da região Noroeste apresentaram casos de raiva em morcegos (Figura 1), sendo o maior número de casos registrados em Penápolis (12), seguido de Araçatuba (5), Guararapes (4), Birigui (3), Pereira Barreto (1) e Coroados (1). No município de Guararapes foram registrados casos de raiva também em bovinos, além dos morcegos, e em Gabriel Monteiro foi registrada apenas raiva bovina.

Dentre os 176 morcegos hematófagos capturados na região, 125 (71%) tiveram amostras de soros submetidos aos testes de SIFMT para pesquisa de anticorpos antirrábicos. Deste total, 86 foram provenientes de um abrigo localizado em um oco de árvore no município de Araçatuba, 33 de um oco de árvore no município de Gabriel Monteiro, quatro de um túnel sob a Rodovia Marechal Rondon, em Rubiácea e dois em um barracão abandonado em uma fazenda em Guararapes.

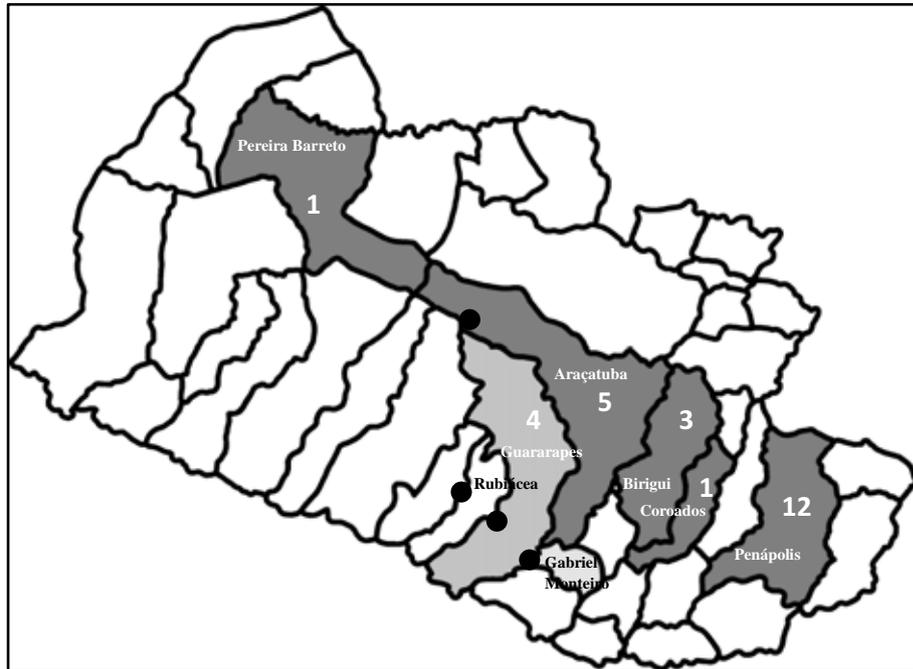


FIGURA 1 - Mapa da região de Araçatuba, mostrando os municípios com casos positivos apenas em morcegos (cinza escuro), em morcegos e bovinos (cinza médio) e apenas em bovinos (cinza claro). Os números correspondem aos casos em morcegos e os pontos indicam a localização dos abrigos de morcegos com anticorpos neutralizantes do vírus.

Levando em consideração o total de amostras examinadas e o critério adotado para os reagentes, 72% (90/125) foram considerados positivos, sendo 39% (35/90) machos e 61% (55/90) fêmeas e 28% (35/125) foram negativos, dos quais 49% (17/35) eram de machos e 51% (18/35) de fêmeas. Dentre os positivos, 90% (81/90) apresentaram títulos variando de 0,10 a 0,50 UI/mL e 10% (9/90) com títulos maiores que 0,50 UI/mL. Considerando-se o total de amostras examinadas e aquelas com títulos acima de 0,5UI/ml, a taxa de soroprevalência foi 7,2% (9/125) (Figura 2). Dentre as nove amostras com título > 0,5UI/mL, apenas três eram provenientes de abrigos localizados em locais próximos a propriedades com casos confirmados de raiva em bovinos, dos municípios de Guararapes (1), Rubiácea (1) e Gabriel Monteiro (1) e as demais

(6) eram de um oco de árvore do município de Araçatuba, onde não foram registrados casos de raiva (Figura 1).

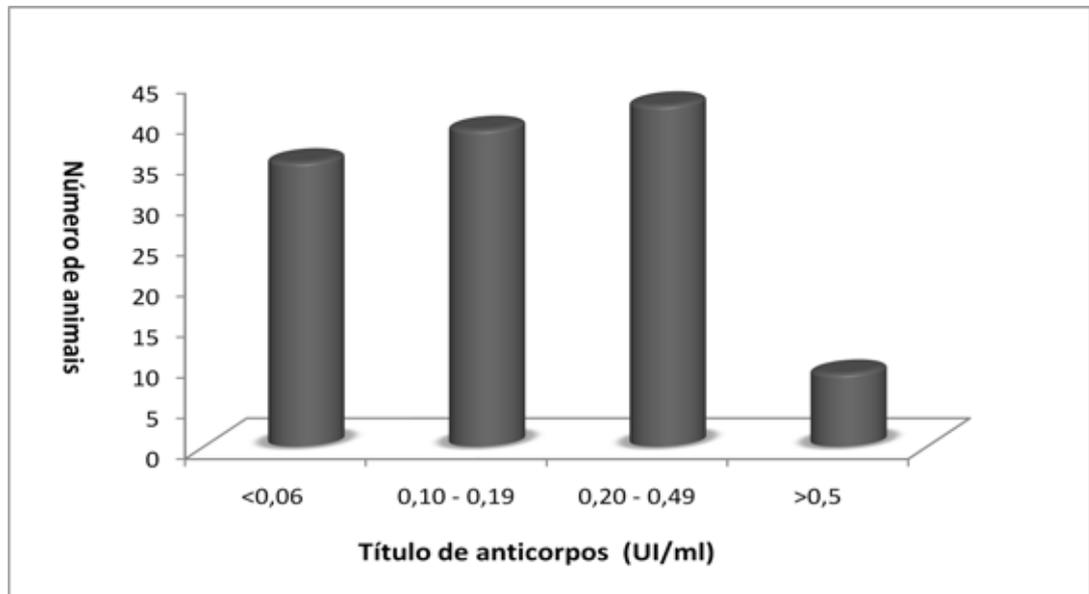


Figura 2. Número de morcegos hematófagos distribuídos de acordo com o título de anticorpos neutralizantes para a raiva. Negativos (<0,06 UI/ml); reagentes com baixos títulos (0,10-0,19 UI/ml); títulos médios (0,20-0,49) e títulos protetores (>0,50).

Discussão

A raiva em morcegos na região noroeste do Estado de São Paulo, ocorreu somente em espécie não-hematófagas, que representaram 88% do total de morcegos recebidos durante o período de 2008 a 2012, embora tenham sido registrados casos em bovinos na região. Este fato tem sido observado na região Noroeste de São Paulo desde 1998 (CUNHA et al., 2006, QUEIROZ et al., 2009, 2012), com registro da raiva em morcegos, bovinos e até mesmo cães e gatos, com variantes características de morcegos vampiros, entretanto, sem isolamento desta variante do vírus nestas espécies.

Estudos têm mostrado a dificuldade em se detectar a raiva em morcegos hematófagos, mesmo em regiões consideradas epidêmicas para raiva bovina. Na região do Vale do Paraíba Sugay e Nilsson (1966) realizaram pesquisa do vírus da raiva em área epidêmica e observaram apenas 3,8% de positividade, porcentagem considerada baixa em vista da grande quantidade de casos que ocorria na região. Em pesquisa semelhante, Souza et al. (1997) também no Vale do Paraíba, observaram 5,1% (7/138) de positividade em morcegos hematófagos capturados em cavernas de uma região com alto índice de ocorrência de raiva bovina, ressaltando que todos os morcegos positivos eram provenientes de um mesmo local de captura.

A pesquisa de vírus em morcegos hematófagos é realizada, na maioria das vezes, a partir de vigilância ativa, com captura de morcegos em abrigos e a prevalência não ultrapassa 1%, considerando que esta é a porcentagem de morcegos aparentemente saudáveis que podem estar infectados com o vírus da raiva (KOTAIT, 1996). Os relatos de casos confirmados nesta espécie descrevem a presença dos mesmos em atividade alimentar diurna em currais, encontrados mortos em locais de acesso de bovinos e em cavernas com grande concentração de morcegos, em áreas de grande ocorrência de casos em bovinos (SUGAY e NILSSON, 1966; SOUZA et al., 1997). Um único relato de literatura descreve a presença de um *Desmodus rotundus* positivo para raiva em área urbana, no município de Ubatuba, SP (FERRAZ et al., 2007).

Por outro lado, a pesquisa do vírus em morcegos não hematófagos é realizada a partir de vigilância passiva em áreas urbanas, e no presente estudo, mostrou uma positividade de 1,74%, que está acima dos 1,3% registrados por Cunha et al. (2006) no período de 1997 a 2002, nesta mesma região e em regiões adjacentes. Considerando apenas a região de Araçatuba, o índice de positividade observado é superior ao obtido no período de 1993 a 2007 (1,2%) (QUEIROZ et al., 2009) e também superior ao índice de 1,13% encontrado em Campo Grande-MS no período de fevereiro a dezembro de 2001 (DEUS et al., 2003). O maior índice de positividade registrado no

presente estudo, de 2,32% em 2009 não chegou a atingir o máximo registrado na região, que foi de 3,29% no ano de 2001 (QUEIROZ et al., 2009).

Comparando-se estes percentuais com outras regiões do Estado, como a região metropolitana de São Paulo, também se observam variações nos índices de positividade de um ano para outro, em um determinado período, como foi o caso do aumento dos índices, de 0,69%, no período de 1988 a 1992 (ALMEIDA et al., 1994), para 0,78% no período de 1993 a 2003 (ALMEIDA et al., 2011), com picos de casos em 2002 e 2003, atingindo 2,2% e 1,4% de positividade, respectivamente. Contudo, em outros relatos observou-se a ausência do vírus da raiva em morcegos de áreas urbanas, como no município de Japurá, no Paraná (MARQUES et al., 2010) e em municípios do Estado de Roraima (CARDOSO et al., 2005) e taxas de positividade variando entre 0 e 0,9% em uma mesma região, como no caso de Botucatu, SP (CORTES et al., 1994; SOUZA et al., 2005; LANGONI et al., 2008).

Observou-se no período deste estudo (2008-2012), uma diminuição de casos de raiva na espécie frugívora *A. lituratus* (11,5%) em relação ao período anterior, de 1998-2007 (QUEIROZ et al., 2009), no qual correspondeu a 30% dos casos. Os morcegos insetívoros da família Vespertilionidae conservaram o mesmo índice de 50% (13/26) dos casos positivos, entretanto, houve predominância da espécie *E. furinalis* ao invés da *M. nigricans*, que havia sido maioria no período 98-2007. Dentre a família Molossidae, houve um aumento no número de positivos passando de 20% no período 98-2007 para 38,5% entre 2008-12, também com predomínio de casos na espécie *M. rufus*.

Para a pesquisa de anticorpos, foram considerados como reagentes todos os morcegos que apresentaram título de 0,10 UI/mL, que foi o menor título no qual se observou inibição da fluorescência e não apenas os que apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml, título adotado para o índice de soroprevalência. Este critério tem sido adotado também quando se realiza a vigilância sorológica em animais silvestres (ARAÚJO et al., 2014). Nosso percentual de morcegos *Desmodus rotundus* soropositivos foi de 72%,

indicando seu contato com o vírus da raiva, a circulação do vírus na colônia e até mesmo um surto recente da doença na colônia (ARAÚJO et al., 2014; MEGID, 2007) ainda que não tenham sido diagnosticados animais doentes. Na literatura, casos semelhantes foram relatados por Souza et al. (1997) na região do Vale do Ribeira, com uma porcentagem bem menor (6,7%) e por Langoni et al (2008) na região de Botucatu, com 65,2% de soros reagentes.

Considerando-se como positivos apenas os morcegos com títulos iguais ou superiores a 0,5UI/mL, como relatam alguns autores, a soroprevalência observada neste estudo foi de 7,2%, resultado muito próximo ao de 7,35% descrito na região de Botucatu-SP, em morcegos hematófagos (LANGONI et al., 2008) e superior ao de 5,9% observado na região metropolitana de São Paulo em morcegos de diversas espécies, incluindo os hematófagos (ALMEIDA et al., 2011).

Estudos sorológicos têm sido realizados em morcegos e outras espécies silvestres, no Brasil e em outros países, como forma de vigilância da raiva (ALMEIDA et al., 2001; ARAUJO et al., 2014; BOWEN et al., 2013; ; JORGE et al., 2010; LANGONI et al., 2008; TURMELLE et al, 2010;). Todas as pesquisas têm detectado a presença de anticorpos neutralizantes nas espécies estudadas, e, embora a OIE recomende que devesse haver uma melhor padronização das técnicas sorológicas para estas espécies (OIE, 2013), esta é uma ferramenta importante para estudar a atividade do vírus em populações.

Apesar de não ter sido realizado o isolamento viral em amostras de *Desmodus rotundus* e apesar da região noroeste ser considerada como uma área geográfica cujo risco para raiva em herbívoros é considerado baixo ou desprezível (BRAGA et al, 2014), a alta taxa de morcegos sororreagentes (72%) e o percentual de soroprevalência de 7,2% em morcegos vampiros provenientes de abrigos próximos a locais com casos de raiva em bovinos, demonstraram a ocorrência de infecção pelo vírus da raiva em morcegos *Desmodus rotundus* da região de Araçatuba,.

Conclusões

Os casos de raiva confirmados em morcegos não-hematófagos em áreas urbanas corroboram a participação e importância epidemiológica como reservatórios da doença. Em relação aos morcegos vampiros, a presença de animais com anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva indica exposição recente ao vírus ratificando que, muito embora não tenha sido detectada a presença do vírus rábico, a pesquisa de anticorpos mostrou-se como uma importante ferramenta para a vigilância epidemiológica da raiva nestas espécies.

Agradecimentos – Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (Proc. 578281/2008-2) e concessão de bolsas (Cristiano de Carvalho, Mileia Ricci Picolo, Janaína C.B. Hernandez e Monique Serra Lot); à CAPES pela bolsa de mestrado de Daiene K.A.Casagrande; ao Dr. Vladimir de Souza Nogueira Filho, Coordenador do Programa Estadual de controle da Raiva dos Herbívoros (EDA Bauru - CDA-SAA/SP) e às equipes de controle de morcegos hematófagos da CDA pelo fornecimento dos dados sobre os abrigos de morcegos cadastrados na região de Araçatuba/SP.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Rabia. In: **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a a los animales**. 3. ed. Whashington: Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 2003. p. 351-383.

ALMEIDA, M. F. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 28, p. 341-344,1994.

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

ALMEIDA, M.F.; MARTORELLI, M.F.A.; SODRÉ, M. M.; KATAOKA, A. P. A. G.; ROSA, A. R.; OLIVEIRA, M. L.; AMATUZZI, E. Diagnóstico e sorologia de raiva em morcegos do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, v. 44, n.2, p.140-145, 2011.

ARAUJO, D.B.; MARTORELLI, L.A.; KATAOKA, A.P.G.A.; CAMPOS, A.C.A.; RODRIGUES, C.S.; SANFILIPPO, L.F.; CUNHA, E.M.S.; DURIGON, E.L.; FAVORETTO, S.R. Antibodies against rabies virus in terrestrial wild mammals in native rainforest on the north coast of São Paulo State, Brazil. **J. Wild. Dis.** V. 50, n.3. DOI: 10.7589/2013-04-099. Disponível em: <<http://www.jwildlifedis.org/doi/pdfplus/10.7589/2013-04-099>. Acesso em: 23 Maio. 2014.>

BOWEN, R.A.; O'SHEA, T.J.; SHANKAR, V.; NEUBAUM, M.A.; NEUBAUM, D.J.; RUPPRECHT, C.E. Prevalence of neutralizing antibodies to rabies virus in

serum of seven species of insectivorous bats from Colorado and New Mexico, United States. **J. Wild. Dis.**, v. 49, n.2, p. 367-374, 2013.

BRAGA, G.B.; GRISI-FILHO, J.H.H.; LEITE, B.M.; SENA, E.F., DIAS, R.A. Predictive qualitative risk model of bovine rabies occurrence in Brazil. **Prev. Vet. Med.**, v.113, n.4, p.536-546, 2014.

CALDAS, E.P. Raiva Silvestre no Brasil: situação, riscos, desafios e perspectivas de controle. In: 14^a. REDIPRA - **Reunião de Diretores de Programas Nacionais de Controle da Raiva na América Latina**. Lima, Perú, 2013. Disponível em: <http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=799&Itemid=336>. Acesso em: 03 Abr. 2014.>

CARDOSO, M.N.; PASSOS, M.C.V.; MELO, S.A.N.; SOUZA, J.R.; ACOSTA, P.O. Diagnóstico do vírus da raiva por RT-PCR em morcegos de municípios do estado de Roraima. In: REUNIÃO REGIONAL DA SBPC, 2010, Boa Vista. **Anais**. Boa Vista: SBPC, 2010. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/boavista/resumos/1322.htm>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

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

CARNEIRO, D. V. M. Transmission of rabies by bats in Latin America. **Bull. Wild. Hlth. Org.**, v. 10., p. 775-780, 1954.

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

CUNHA, E.M.S.; QUEIROZ DA SILVA, L.H.; LARA, M.C.C.S.H.; NASSAR, A.F.C.; ALBAS, A.; SODRE, M.M.; PEDRO, W.A. Bat rabies in the North-northwestern regions of São Paulo State – Brazil, 1997-2002. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 6, p. 1082-86, 2006.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWISK, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva Switzerland: WHO-World Health Organization, 1996. p. 476.

DEUS, G.T.; BECER, M.; NAVARRO, I.T. Diagnóstico da raiva em morcegos não hematófagos na cidade de Campo Grande, Mato Grosso de Sul, Centro Oerste do Brasil: descrição de casos. **Semina: Cienc. Agr., Londrina**, V.24, N.1, P. 171-176, 2003.

FAVORETTO, S. R. ; CARRIERI, M. L. ; TINO, M. S. ; ZANETTI, C. R. ; PEREIRA, O. A. C. Simplified Fluorescent Inhibition Microtest for the Rabies Neutralizing Antibodies. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 35, n.2, p. 171-175, 1993.

FERRAZ, C.; ACHKAR, S.M.; KOTAIT, I. First report of rabies in vampire bat (*Desmodus rotundus*) in an urban area, Ubatuba, São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.49, n.6, p. 389-390, 2007.

JACKSON, A.C. History of Rabies Research. In: JACKSON, A.C. **Rabies: scientific basis of the disease and its management**. 3 ed. San Diego, USA: Acad. Press, 2013. 707p.

JORGE, R.S.P.; PEREIRA, M.S.; MORATO, R;G; SCHEFFER, K.C.; CARNIELI JR.; P.; FERREIRA, F.; FURTADO, M.M.; KASHIVAKURA, C.K.; SILVEIRA, L.; JACOMO, A.T.A.; LIMA, E.S.; PAULA, R.C.; MAY-JUNIOR, J.A. Detection of

rabies virus antibodies in Brazilian free-ranging wild carnivores. **J. Wild. Dis.**, v.46, n. 4, p.1310-1315, 2010.

KOPROWISK, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; AND, H., **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva Switzerland: WHO-World Health Organization, 1996. p. 476.

KOTAIT, I. Infecção de morcegos pelo vírus da raiva. **Boletim do Instituto Pasteur** (São Paulo), v. 1. p. 51-58, 1996.

LANGONI, H.; SOUZA, L.C.; ZETUN, C.B.; SILVA, T.C.C.; HOFMANN, J.L.; SILVA, R.C. Serological survey for rabies in serum samples from vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.14, n.4, p. 651-659, 2008.

MARQUES, M. A; BONANI, G. A; FILHO, H. O. Ocorrência do vírus rábico em morcegos do município de Japurá-PR - um estudo preliminar. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 13, n. 1, p. 33-36, 2010.

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

MEGID, J. Raiva. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO DIAS, J.L. Eds. **Tratado de animais selvagens – medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 785-98p.

OIE – WORLD ORGANIZATION OF ANIMAL HEALTH. Rabies. In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2013**. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES.pdf. Acesso em: 22 Maio 2014.

OPAS - Organização Panamericana da Saúde, Organização Mundial da Saúde, **Sistema de informação epidemiológica**, database 2014, históricos anuais. Disponível em: <http://siepi2.panaftosa.org.br/Export.aspx> e <http://sirvera.panaftosa.org.br/AcessoLivre/Logon.aspx?ReturnUrl=%2faccessogeral%2fdefault.aspx>. Acesso em: 03 Abr. 2014.

QUEIROZ, L. H.; CARVALHO, C.; BUSO, D. S.; FERRARI, C. I. L.; PEDRO, W.A. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** , v.42, p.9 - 14, 2009.

QUEIROZ, L. H.; FAVORETTO, S. R.; CUNHA, E. M. S.; CAMPOS, A. C. A.; LOPES, M. C.; CARVALHO, C.; IAMAMOTO, K.; ARAÚJO, D. B.; VENDITTI, L. L. R.; RIBEIRO, E. S.; PEDRO, W. A.; DURIGON, E. L. Rabies in southeast Brazil: a change in the epidemiological pattern. **Arch. Vir.** v.157, p.93 - 105, 2012.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. & LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: Nélío R. dos Reis. 2011. 439p.

RUPPRECHT, C.E.; STÖHR, K.; MEREDITH, C. Rabies. In: WILLIAMS, E.S.; BARKER, I.K. (Ed.). **Infectious disease of wild mammals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001. p. 3-36.

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

SODRE, M.M.; GAMA, A.R.; ALMEIDA, M.F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 52, n.2, p. 75-81, 2010.

SOUZA, M.C.A.M.; BERNARDI, F.; ITO, F.H. Epidemiology of rabies: biological and serological aspects of rabies in vampire bats *Desmodus rotundus* (E.GEOFFROY) captured in Vale do Paraíba, southeastern of Brazil. **Arq. Int. Biol., São Paulo**, v.64, n.2, p.91-101, 1997.

SOUZA, L.C.; LANGONI, H.; SILVA, R.C.; LUCHESI, S.B. Vigilância epidemiológica da raiva na região de Botucatu-SP: importância dos quirópteros na manutenção do vírus na natureza. **Ars. Veterinária**, v. 21, p.62-68, 2005.

SUGAY, W.; NILSSON, M.R. Isolamento do vírus da raiva em morcegos hematófagos do Estado de São Paulo, Brasil. **Bol. Ofic. Sanit. Panamericana**, v. 50, p.310-315, 1966.

TURMELLE, A.S.; ALLEN, L.C.; JACKSON, F.R.; KUNZ, T.H.; RUPPRECHT, C.E.; McCRANKEN, G.F. Ecology of rabies virus exposure in colonies of Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at natural and man-made roosts in Texas. **Vector-borne Zoon. Dis.**, v.10, n.2, p.165-175, 2010.