

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA DE UMA VACINA COMERCIAL CONTRA A RAIVA
FRENTE A DESAFIOS COM AMOSTRAS DE VÍRUS DE CAMPO
COMPARADOS AO DESAFIO PADRÃO NO TESTE NIH**

Fernando José Pires de Souza
Médico Veterinário

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA DE UMA VACINA COMERCIAL CONTRA A RAIVA
FRENTE A DESAFIOS COM AMOSTRAS DE VÍRUS DE CAMPO
COMPARADOS AO DESAFIO PADRÃO NO TESTE NIH**

Fernando José Pires de Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2009

S729e Souza, Fernando José Pires
Eficácia de uma vacina comercial contra a raiva frente a desafios com amostras de vírus de campo comparados ao desafio padrão no teste NIH / Fernando José Pires de Souza. -- Jaboticabal, 2009
xiii, 57 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientadora: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

Banca examinadora: Maria da Glória Buzinaro, Luzia Helena Queiroz

Bibliografia

1. Vírus da raiva. 2. Vacina contra a raiva. 3. Teste de potência NIH. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
fernando.pires@agricultura.gov.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDO JOSÉ PIRES DE SOUZA – Brasileiro, casado, nascido em 14 de abril de 1965, natural de Andradina, Estado de São Paulo, foi graduado em Medicina Veterinária no ano de 1988 pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Está inscrito no Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo sob o nº 5.812. Foi contratado pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa para atuar na produção de vacina contra a febre aftosa nas instalações do Laboratório de Referência Animal (LARA/SP) do Ministério da Agricultura em Campinas, Estado de São Paulo, onde permaneceu de 1989 a 1998. Atuou como clínico de pequenos animais de 1998 a 2002, período em que também prestou assistência técnica a indústrias de alimentos para cães e gatos, bem como de medicamentos veterinários, atuando primeiramente na divulgação de uma nova marca de ração da empresa Nestlé e, em seguida, de toda a linha de rações e medicamentos veterinários da empresa Purina. Ingressou por concurso público no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em julho de 2002, sendo designado a atuar no controle oficial da qualidade de vacinas contra a raiva, de uso animal, nas dependências do LARA/SP que, em 2005, foi transformado em Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro/SP). Em 2008 tornou-se também responsável pela Unidade de Biotério do Lanagro/SP.

*A mente que se abre a uma novidade
nunca mais retorna ao tamanho anterior*
(Albert Einstein)

Aos meus pais, pelo Norte da minha bússola

À minha esposa, pelas trilhas da nossa vida

Aos meus filhos, pelo indescritível

Aos meus irmãos, pelos alicerces

Aos amigos, pela vibração

Aos mestres, pelas lições

Aos cães, pela escolha da minha profissão

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e compadre Fernando Gomes Buchala, pelo incentivo e pelo companheirismo desde a graduação.

À Prof.^a Dr.^a Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, pela confiança e pela maneira amorosa com que orienta.

Ao coordenador da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Abrahão Buchatsky, pelo entendimento da importância da capacitação técnica e pelo apoio neste sentido.

Aos coordenadores e colegas do Lanagro/SP, pela oportunidade e colaboração, especialmente à equipe da Unidade de Controle de Vacinas contra a Raiva.

À colega Margarida Maria Zaroni, pelo oportuno auxílio estatístico.

Aos professores, colegas e funcionários da Unesp de Jaboticabal, pelas lições, convivência e apoio.

Aos animais de laboratório, pelo sacrifício em prol da ciência.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS E LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	2
III. OBJETIVO	23
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1. Camundongos	24
2. Vírus Padrão	24
3. Vírus de campo	25
3.1 Amostra 616/2002	25
3.2 Amostra 2156/2005	25
3.3 Amostra 774/2006	25
3.4 Amostra 1018/2006	25
4. Preparo das suspensões virais	26
5. Titulação viral	26
6. Vacina de Referência	27
7. Vacina Teste	27
8. Teste de potência NIH	27
8.1 Vacinação	28
8.2 Desafio	29
8.3 Cálculo da potência	29
8.4 Comparação da potência relativa entre os testes com VC e com CVS...	30
9. Estudo filogenético das amostras de vírus de campo.....	30
V. RESULTADOS.....	31
1. Passagens em camundongos	31
1.1 Amostra 616/2002	31

1.2 Amostra 2156/2005	31
1.3 Amostra 774/2006	32
1.4 Amostra 1018/2006	32
2. Titulação viral	33
3. Testes de potência NIH	33
3.1 Teste 1-A (vacina X CVS)	35
3.2 Teste 1-B (vacina X amostra 616/2002)	35
3.3 Teste 2-A (vacina X CVS)	35
3.4 Teste 2-B (vacina X amostra 2156/2005)	36
3.5 Teste 3-A (vacina X CVS)	36
3.6 Teste 3-B (vacina X amostra 1018/2006)	36
4. Comparação da potência relativa entre os testes com VC e com CVS.....	37
5. Árvore filogenética	38
VI. DISCUSSÃO.....	39
VII. CONCLUSÕES.....	43
VIII.REFERÊNCIAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMs.....	Anticorpos monoclonais
BHK.....	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CDC.....	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cepanzo.....	Centro Panamericano de Zoonoses
CVS.....	<i>Challenge Virus Standard</i>
EUA.....	Estados Unidos da América
IIC.....	Inoculação intracerebral em camundongos
IFD.....	Imunofluorescência direta
Lanagro/SP.....	Laboratório Nacional Agropecuário do Estado de São Paulo
MAPA.....	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIH.....	<i>National Institutes of Health</i>
OIE.....	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
OPAS.....	Organização Panamericana de Saúde
PM.....	Pitman-Moore
PV.....	<i>Pasteur Virus</i>
RT-PCR.....	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SPF.....	<i>Specific Pathogen Free</i>
VRI.....	Vacina de Referência Internacional
VRN.....	Vacina de Referência Nacional

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Resultados obtidos nos testes de potência NIH, em valores absolutos e percentuais de camundongos sobreviventes por camundongos inoculados, em cada diluição da vacina de referência (VRN), de acordo com a amostra viral utilizada no desafio	33
2. Resultados obtidos nos testes de potência NIH, em valores absolutos e percentuais de camundongos sobreviventes por camundongos inoculados, em cada diluição da vacina teste (VT), de acordo com a amostra viral utilizada no desafio	34
3. Resultados dos títulos e doses efetivas (DE) virais, potências da vacina teste e doses efetivas das vacinas teste (VT) e de referência (VRN), de acordo com a amostra de vírus utilizada, obtidos nos testes de potência NIH	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquemas do vírus da raiva em cortes longitudinal e transversal.....	05
2. Esquema do genoma do vírus da raiva mostrando as sequências codificadoras de proteínas	05
3. Representação esquemática dos testes NIH, onde cada diluição representa uma caixa contendo 18 camundongos.....	28
4. Valores da potência relativa e limites fiduciais dos testes de vacinas contra a raiva, realizados frente a desafios com CVS e com os vírus de campo 616/2002, 2156/2005 e 1018/2006.....	37
5. Árvore filogenética baseada no gene N (100-998bp), contendo a amostra de campo 616/2002 (elaborada no Laboratório Central de Diagnóstico do “College of Bioresource Sciences”, da Universidade de Nihon, Japão, 2009....	38

**EFICÁCIA DE UMA VACINA COMERCIAL CONTRA A RAIVA FRENTE A DESAFIOS
COM AMOSTRAS DE VÍRUS DE CAMPO
COMPARADOS AO DESAFIO PADRÃO NO TESTE NIH**

RESUMO – No Brasil, a potência das vacinas veterinárias contra a raiva é avaliada pelo teste NIH (“National Institutes of Health”), no qual o desempenho de uma vacina, medido pela DE_{50} em camundongos, é comparado ao desempenho de uma vacina de referência. São consideradas aprovadas as partidas com potência igual ou superior a 1,0 UI. O presente estudo comparou o desafio viral com vírus fixo CVS, utilizado como padrão no teste de potência NIH, a desafios com três amostras virais isoladas de bovinos naturalmente infectados. O objetivo foi verificar se as amostras de vírus de campo apresentariam virulência maior que a do CVS, o que poderia sugerir a inadequação do teste NIH para a avaliação das vacinas contra a raiva e, portanto, inferir que as vacinas aprovadas por esse teste poderiam não proteger suficientemente o rebanho. Apesar da grande variabilidade que o teste NIH pode apresentar, as três repetições desafiadas com CVS apresentaram semelhança em um intervalo de confiança de 95%, e nos desafios realizados com três amostras de vírus de campo a vacina utilizada protegeu mais do que nos desafios com CVS. Conclui-se que a virulência das amostras de vírus de campo utilizadas não foi maior que a virulência do CVS, em camundongos, e que o rigor do desafio padrão mostrou-se adequado para a avaliação da potência pelo teste NIH e, portanto, para o controle da qualidade de vacinas contra a raiva.

Palavras-Chave: teste de potência NIH, vacina contra a raiva, vírus da raiva

**EFFICACY OF A COMMERCIAL RABIES VACCINE AGAINST CHALLENGES USING
WILD STRAINS IN CONTRAST TO THE STANDARD CHALLENGE OF THE NIH
POTENCY TEST**

SUMMARY – The potency of veterinary rabies vaccines in Brazil is evaluated by the NIH (National Institutes of Health) potency test, in which the ability of a vaccine to induce protection in mice (ED_{50}) is compared with a reference vaccine. The batches are approved when the potency is equal or superior to 1.0 IU. The present study compared CVS strain challenges (standard strain for the potency test) with challenges that used three wild isolates of natural occurrence in cattle. The aim was to verify if the wild strains could be more virulent than the CVS. If this occurred, the NIH potency test would prove inadequate to evaluate rabies vaccines. Therefore, one could infer that the approved vaccines might not provide sufficient herd protection. Despite the great variability of NIH test, all three repetitions that were challenged with CVS were similar at a 95% confidence-level; and when challenged with wild strains, the vaccine provided better protection than the one achieved at CVS challenge. In conclusion, wild strains virulence was not greater than CVS virulence in mice. The strictness of standard challenge proved to be adequate for potency evaluation by NIH test, and consequently, for the quality control evaluation of rabies vaccines.

Keywords: NIH potency test, rabies vaccine, rabies virus

I. INTRODUÇÃO

A raiva é uma das mais antigas e temidas doenças de humanos e de animais. É causada por um vírus que ataca o sistema nervoso de todos os mamíferos, principalmente bovinos, equinos, suínos, cães, gatos e morcegos. Por ser fatal em praticamente 100% dos casos, a profilaxia é fundamental para o controle da doença, o que demonstra a grande importância de se utilizar vacinas de alta eficácia. Apesar dos conhecimentos atuais sobre a ocorrência de diferentes estirpes do vírus da raiva, as vacinas continuam sendo preparadas e testadas com vírus das estirpes clássicas, como o CVS e o PV. Em decorrência do aumento da disseminação do vírus da raiva pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*, a doença tem matado milhares de herbívoros, o que tem causado um grande prejuízo econômico ao país. Como algumas dessas mortes ocorrem em animais supostamente vacinados, não é raro encontrar pecuaristas que não confiam na eficácia das vacinas.

As vacinas veterinárias contra a raiva, antes de serem liberadas para venda ou uso, são analisadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em uma das unidades que compõem sua rede laboratorial, o Lanagro/SP, localizado na cidade de Campinas, Estado de São Paulo. Todas as partidas de vacinas produzidas no Brasil ou importadas, antes da liberação ao comércio, são submetidas a testes de potência, inativação viral, inocuidade e esterilidade, entre outros, para verificação dos padrões de qualidade exigidos pela legislação. O teste de potência adotado oficialmente no Brasil é o teste NIH, no qual a DE_{50} de uma vacina teste, em camundongos, é comparada à DE_{50} de uma vacina de referência

O presente estudo comparou o comportamento de uma vacina comercial no teste NIH frente a desafios padrão com o vírus CVS e a desafios com três amostras virais isoladas de bovinos, nas mesmas condições em que é realizado o teste oficial no Lanagro/SP.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A raiva é uma doença infecciosa viral de evolução aguda que pode acometer todas as espécies de mamíferos, inclusive o homem. É de distribuição cosmopolita, mundialmente endêmica. É uma doença conhecida e estudada desde a antiguidade. Foi observada no Egito antes de 2300 a.C. e descrita no código de Eshnunna, na Babilônia, que determinava multas a proprietários de cães raivosos que agredissem pessoas (BAER et al., 1985). A palavra originou-se do sânscrito *rabbahs*, que significa violento (STEELE, 1975).

Na Antiga Grécia, Homero e Demócrito (500 a.C.), assim como Aristóteles (320 a.C.), referiram-se, em seus escritos, à palavra *lyssa*, que em grego significa loucura. A associação do cão com a doença surgiu no antigo Egito, onde o deus Sirius era representado pela figura de um cão raivoso (DIETZSCHOLD et al., 1996). Os povos do século I já conheciam a infecciosidade da saliva de cães raivosos, chamando esse material de *virus* que, em latim, significa veneno, e recomendavam a cauterização do local infectado pelo animal raivoso. Nessa época, o romano Cornelius Celsus criou o termo *hydrophobia* e descreveu a raiva humana (BAER et al., 1985). No século V, o também romano Célio Aureliano afirmou ser a raiva do homem causada por mordidas de cães, raposas, cavalos, macacos, lobos, ursos, leopardos e aves (HATSHBACH, 1989).

Em 1271, na Europa, foi descrita a primeira epizootia de raiva. Lobos raivosos atacaram um vilarejo na região da Francônia (atual Baviera, na Alemanha) causando pelo menos 30 mortes humanas. No continente americano os primeiros relatos da doença ocorreram em 1709, no México, e em 1741, em Barbados, e a primeira epizootia relatada ocorreu entre 1768 e 1771, em Boston (EUA), envolvendo cães e raposas (BAER, 1991).

Na América Latina, desde a chegada das primeiras expedições colonizadoras, algumas mortes de animais e de homens foram atribuídas à raiva e, supostamente, cães trazidos pelos colonizadores foram os responsáveis pela introdução da raiva canina (LORD, 1980).

Em 1546, o cientista italiano Girolamo Fracastoro fez uma afirmação muito importante sobre a doença: “Quando os sintomas clínicos da doença se manifestam, esta já é irreversivelmente letal”. Esta afirmação, com raras exceções, ainda é válida (ROSNER, 1974). Após Fracastoro, estudos sobre a raiva só reapareceram em 1804 com o cientista alemão Zinke que demonstrou, através de experimentos em cães, a transmissão da doença pela saliva. Em 1879, o francês Victor Galtier fez a transmissão do vírus rábico de cão para coelho e de coelho para coelho, e utilizou este material para imunizar carneiros e cabras. No entanto, seu trabalho ficou esquecido em decorrência da fama do seu contemporâneo Louis Pasteur que, em 1881, demonstrou que o SNC era o principal sítio de replicação do vírus rábico e, em 1885, desenvolveu uma vacina contra a raiva e aplicou em um garoto que havia sido mordido por um cão raivoso, inaugurando a era da prevenção de doenças virais pela vacinação, antes mesmo da natureza dos vírus estar bem definida (DIETZSCHOLD et al., 1996).

Outra descoberta importante foi a de Negri, um médico italiano que, em 1903, descreveu uma inclusão citoplasmática relacionada à raiva que foi considerada patognomônica para o diagnóstico e, em sua homenagem, recebeu o nome de Corpúsculo de Negri (ATANASIU, 1975).

No Brasil, a partir de 1908, uma grave epizootia que ocorreu numa região entre a Serra do Mar e o litoral, em frente à ilha de Santa Catarina, levou os pesquisadores Antonio Carini e Parreiras Horta a levantarem, em 1911, a hipótese de serem os morcegos hematófagos os transmissores do vírus da raiva para os herbívoros. Inicialmente, esta hipótese foi rejeitada pela comunidade científica internacional e até ridicularizada por alguns pesquisadores que a chamaram de “fantasia tropical”. Em 1921, Haupt e Rehaag, dois veterinários alemães contratados cinco anos antes pelo governo catarinense, relataram a presença de Corpúsculos de Negri em amostras de cérebro de bovinos e de morcegos, confirmando a teoria de Carini. Mesmo assim, muitas contestações ainda surgiram, pois, naquela época, Louis Pasteur afirmava que para ser raiva, havia a necessidade do envolvimento de um cão raivoso, e no episódio de Santa Catarina não havia relatos de ocorrência da doença em cães (KOTAIT, 1996). Entretanto, a demonstração definitiva da transmissão da raiva por morcegos foi aceita somente mais tarde, entre 1931 e 1936, por meio de estudos conduzidos

independentemente no Brasil, por Queiroz Lima e Torres, e em Trinidad, por Hurst e Pawan, que demonstraram que um surto de botulismo em bovinos e de poliomielite ascendente em humanos tratava-se, na verdade, de raiva transmitida por morcegos hematófagos (CARNEIRO, 1954).

Atualmente, graças a medidas profiláticas, dentre elas a vacinação, vários países estão livres da infecção: Barbados, Jamaica e várias outras ilhas do Caribe, nas Américas; Japão e a maior parte da Oceania; e Irlanda, Grã-Bretanha, Países Baixos, Bulgária, Espanha, Portugal, bem como vários países escandinavos, na Europa. Apesar disso, a raiva continua sendo um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, principalmente a transmitida por cães em áreas urbanas e pelos morcegos em áreas rurais (ACHA & SZYFRES, 1986).

O agente etiológico da raiva pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, a qual compreende mais de 100 vírus de vertebrados, invertebrados e vegetais, o que demonstra a diversidade destes vírus. Esta família possui três gêneros que infectam mamíferos: *Vesiculovirus*, que compreende o vírus da estomatite vesicular e relacionados, *Lyssavirus*, que engloba o vírus da raiva e “aparentados”, e *Ephemerovirus*, vírus da febre efêmera dos bovinos (FENNER et al., 1992; VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Os lyssavírus, como outros rabdovírus, consistem essencialmente de RNA (2% a 3%), proteína (65% a 75%), lipídio (15% a 25%) e carboidrato (3%). São vírus envelopados com formato cilíndrico, com uma extremidade arredondada e outra plana, assemelhando-se a um projétil de revólver, com diâmetro de 45nm a 100nm e comprimento de 100nm a 430nm. Apresentam projeções no envelope, em forma de espículas, que estão distribuídas por toda a superfície viral, com exceção da parte plana do vírus (figura 1). O nucleocapsídeo é filamentososo, com simetria helicoidal, e 700nm de comprimento e 20nm de diâmetro (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

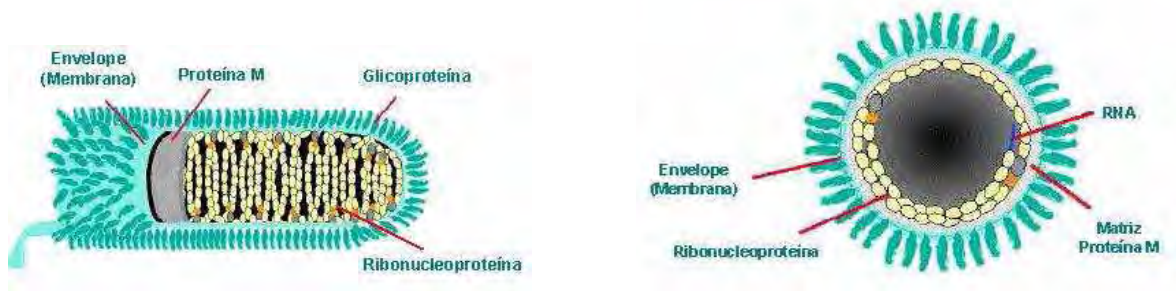


Figura 1. Esquemas do vírus da raiva em cortes longitudinal e transversal

Fonte: <http://www.cdc.gov/rabies/virus.html>

O genoma é composto por RNA de fita simples, linear, não segmentado, com polaridade negativa complementar ao RNA mensageiro, cujo tamanho varia de 11 a 15 Kb e o peso molecular de $3,5$ a $4,6 \times 10^6$ daltons. O RNA genômico é transcrito em cinco RNAs mensageiros, os quais são traduzidos em proteínas (FENNER, et al., 1992). As proteínas estruturais do virion, associadas ao nucleocapsídeo, incluem a nucleoproteína “N”, uma fosfoproteína “P” e a proteína “L” (uma RNA-polimerase), e as do envelope viral, o qual envolve a ribonucleoproteína: a matriz protéica ou proteína matrix “M” e a glicoproteína “G” (figura 2).

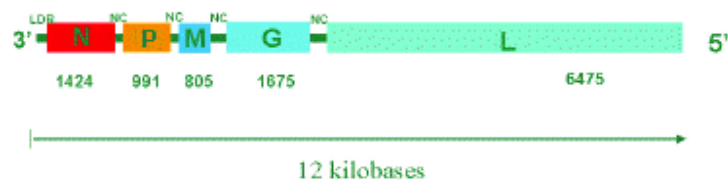


Figura 2. Esquema do genoma do vírus da raiva mostrando as sequências codificadoras de proteínas

Fonte: <http://www.cdc.gov/rabies/virus.html>

Das cinco proteínas identificadas, duas são de especial importância para a proteção imunológica contra os lyssavirus: a nucleoproteína (N), do RNA, que é um antígeno grupo-específico por apresentar uma pequena diversidade de seqüência de aminoácidos entre os genótipos, e a glicoproteína (G), das projeções espiculadas da superfície do virion, responsável pela interação do vírus com os receptores da célula na adsorção e essencial na indução de anticorpos neutralizantes, alvo das células T-auxiliares e células citotóxicas específicas, e diretamente ligada à patogenicidade do vírus (VAN REGENMORTEL *et al*, 2000).

O gênero *Lyssavirus* foi classificado inicialmente em quatro sorotipos, de acordo com características antigênicas identificadas através de reações com anticorpos monoclonais (AcMs): Tipo 1, o vírus clássico da raiva (“Rabies vírus”) que, até 1956, era considerado o único tipo (SMITH, 1996); Tipo 2, uma amostra isolada do morcego frugívoro *Eidolon helvum*, na Nigéria, denominado de vírus Lagos bat (CRICK, 1982); Tipo 3, vírus Mokola, isolado de gatos da Nigéria (SCHNEIDER, 1983); Tipo 4, Duvenhage, isolado de um caso de raiva humana no sul da África (MEREDITH, 1971).

A caracterização antigênica de variantes é realizada por meio de testes de imunofluorescência indireta, onde o vírus é multiplicado em camundongos ou em cultivos celulares, fixado e submetidos a reação frente a painéis de AcMs preparados contra antígenos da proteína N, fornecidos pelo CDC de Atlanta, EUA (DELPIETRO *et al.*, 1977; DIAZ *et al.*, 1994).

No Brasil, dois painéis de AcMs têm sido utilizados. O primeiro é constituído por oito AcMs preparados contra diversas amostras do vírus da raiva e pré-estabelecido pela OPAS para o estudo de amostras isoladas nas Américas (DELPIETRO *et al.*, 1977; DIAZ *et al.*, 1994). Com esse painel foram identificadas no Brasil as variantes 2 (encontrada principalmente em cães), 3 (de morcegos *Desmodus rotundus*), 4 (do morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis*), 5 (relacionada a morcegos hematófagos na Venezuela, mas isolada de cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* no Brasil), e variante 6 (de morcego insetívoro *Lasiurus cinereus*), além de algumas amostras que não puderam ser enquadradas nesta classificação (MORAIS *et al.*, 2000; FAVORETTO *et al.*, 2002). O outro painel que tem sido utilizado é composto por 14 AcMs anti-N dirigidos contra antígenos de diferentes lyssavírus (Lagos bat, Mokola, Duvenhage e

Danish bat), preparado na “Central Veterinary Agency”, em Weybridge, Inglaterra (KING, 1991). Uma nova variante do vírus da raiva, não compatível com os AcMs existentes, foi identificada em associação com casos de raiva humana descritos no Estado do Ceará, de 1991 a 1998. O sagüi (*Callithrix jacchus*) foi identificado como a fonte de exposição (FAVORETTO et al., 2001).

Com o advento das técnicas genéticas, como RT-PCR, adotou-se o termo genótipo no lugar de sorotipo. Por meio da caracterização genética, nos últimos anos o gênero *Lyssavirus* passou a incluir sete espécies distintas: o vírus clássico da raiva, genótipo 1, que infecta mamíferos terrestres e morcegos nas Américas; o Lagos bat, genótipo 2, isolado pela primeira vez de um morcego na África, em 1956; o vírus Mokola, genótipo 3, que foi isolado de mussaranhos (*Crocidura sp.*), de humanos e de felinos na Etiópia, Nigéria e Zimbábue, também no continente africano (SHOPE et al., 1970); o vírus Duvenhage, genótipo 4, isolado de humano e, posteriormente, de morcegos insetívoros da África do Sul e Zimbábue (BOURHY et al., 1993); o European bat Lyssavirus 1, genótipo 5, isolado de um caso de raiva humana na Rússia e de morcegos insetívoros do gênero *Eptesicus* no continente europeu; o European bat Lyssavirus 2, genótipo 6, de um caso humano na Finlândia e de morcegos insetívoros do gênero *Myotis* (BRASS, 1994); e o genótipo 7, denominado Australian bat Lyssavirus, isolado na década de 90 de morcegos frugívoros da Austrália, da espécie *Pteropus alecto*, conhecido como raposa voadora (FRASER et al., 1996). Mais recentemente, outros quatro lyssavirus “divergentes” foram isolados de morcegos insetívoros: O vírus Aravan, do morcego *Myotis blyti*, no Kirguistão, Ásia Central (ARAI et al., 2003); o vírus Khujand, do morcego *Myotis mystacinus*, no Tadjiquistão, também na Ásia Central (KUZMIN et al., 2003); o Irkut, do morcego *Murina leucogaster*, em Irkutsk, na Rússia; e o West Caucasian bat, de morcegos *Miniopterus schreibersi*, das montanhas do Cáucaso (WUNNER, 2002).

Esses sete genótipos foram divididos em dois filogrupos. O filogrupo I, que inclui os genótipos 1, 4, 5, 6, e 7, e o filogrupo II, com os genótipos 2 e 3. Os isolados mais recentes, ainda não classificados em genótipos, também foram agrupados em filogrupos. Os vírus Aravan, Khujand e Irkut no filogrupo I e o West Caucasian bat no filogrupo II. Os vírus do filogrupo I, quando inoculados em camundongos, provocam

sintomatologia característica da raiva, enquanto que com os vírus do filogrupo II não há desenvolvimento de sinais característicos (BADRANE et al., 2001).

A OMS e a OIE consideram como raiva apenas a doença causada pelo genótipo 1, classificando as demais como “encefalites relacionadas”, e como “aparentados” os vírus pertencentes aos outros genótipos (WHO, 2008). Nas Américas, só foram registrados casos envolvendo o genótipo 1, acometendo diferentes espécies de mamíferos e sendo mantidos principalmente em dois reservatórios, canídeos e morcegos. No Brasil, a análise filogenética da nucleoproteína N, uma região conservada do genoma, de amostras isoladas de várias espécies animais e de humanos confirmou estes dois reservatórios. As amostras foram classificadas como DRRV, “dog-related rabies virus”, e VRRV, “vampire bat-related rabies virus” (ITO et al., 2001). Outros pesquisadores utilizaram esta mesma classificação ao analisarem amostras isoladas de diferentes espécies no Brasil (cinco bovinos, dois equinos, dois ovinos, um suíno, um morcego hematófago, dois cães, um gato e um humano), porém elegeram para estudo a região da glicoproteína G, mais susceptível a mutações e relacionada à infectividade e patogenicidade do vírus. Em ambos os casos os pesquisadores fazem parte de um grupo que desde 2000 desenvolve estudos moleculares com o objetivo de avaliar características epidemiológicas da raiva no Brasil, no qual estão envolvidas a Universidade de Nihon, do Japão, e as brasileiras Universidade de São Paulo, Universidade Estadual Paulista (câmpus de Jaboticabal) e Universidade Federal de Mato Grosso (SATO et al., 2004).

Esse tipo de investigação muito contribui para o esclarecimento da epidemiologia da raiva, principalmente no que se refere à adaptação do vírus ao hospedeiro. A análise filogenética, com base no gene N, de material genético amplificado de amostras de morcegos do Estado de São Paulo (três hematófagos, um frugívoro e 13 insetívoros), revelou que os vírus isolados de morcegos, que foram geneticamente divididos em quatro linhagens, tiveram a tendência de depender da espécie de morcego hospedeira. A primeira linhagem consistiu principalmente de isolados de morcegos hematófagos, incluindo os frugívoros *Artibeus* spp., as outras três linhagens foram provenientes de isolados de morcegos insetívoros, o que indicou a possibilidade de existirem, no Brasil, variantes do vírus da raiva em morcegos que são espécies-específicas. Considerando o

grande número de espécies de morcegos da fauna silvestre do país, é provável que existam variantes do vírus da raiva ainda desconhecidas (KOBAYASHI et al., 2005).

A distribuição geográfica da raiva bovina relacionada a morcego hematófago foi estudada por KOBAYASHI et al. (2006). Foram analisadas, filogeneticamente e geograficamente, 77 amostras de vírus isoladas a partir de bovinos de vários estados do Brasil. Esses isolados foram divididos em nove subgrupos genéticos, os quais estão amplamente distribuídos em regiões de baixa altitude, com alguns subgrupos separados uns dos outros por cadeias de montanhas. Além disso, a separação dos subgrupos em regiões montanhosas foi correlacionada com altitude. Os resultados do trabalho indicam que a raiva bovina é derivada de diversas variantes regionalmente definidas, o que sugere que a distribuição geográfica da doença está relacionada com a da população de morcegos hematófagos.

Análises filogenéticas e geográficas utilizando dados de sequenciamento de 570 amostras de vírus isoladas de bovinos oriundos de uma vasta área do Brasil, obtidas de 1987 a 2006, revelaram a existência de dezenas de variantes regionais associadas aos morcegos hematófagos, cujos padrões de distribuição foram afetados por montanhas e rios. Os resultados sugeriram que as características epidemiológicas da raiva transmitida por morcegos hematófagos no Brasil parecem estar associadas com as características geográficas e topográficas das áreas nas quais os rebanhos são mantidos, e com fatores que afetam a ecologia dos morcegos. A elucidação dessas características epidemiológicas é muito importante na avaliação da eficácia das medidas de controle da raiva transmitida por morcegos e devem ser levadas em conta no planejamento (KOBAYASHI et al., 2008).

O vírus da raiva é considerado neurotrópico. Progride desde o local da infecção até o cérebro, onde causa lesões irreversíveis provocando paralisias musculares e a morte por asfixia, em decorrência da paralisia do diafragma. A penetração do vírus no hospedeiro ocorre pelo contato direto. A forma mais comum de transmissão é por meio de ferimentos na pele produzidos por mordeduras e arranhaduras de animais que estejam eliminando o vírus pela saliva, mas pode ocorrer também por mucosas íntegras que entrem em contato com saliva ou tecidos contaminados (ALVES et al., 2003). Existem, ainda, relatos de transmissão pelo consumo de carcaças contaminadas

congeladas na região ártica (MURRAY et al., 2000), pela inalação de aerossóis em cavernas densamente povoadas por morcegos infectados (FISHBEIN, 1991) e por transplantes de córneas e outros órgãos (CDC, 1999). Após a inoculação, o vírus pode alcançar diretamente as terminações sensoriais e motoras ou permanecer algumas horas nas células musculares do ponto de inoculação (BAER, 1972). Os vírus replicam-se no tecido muscular estriado e, nas junções neuromusculares, ligam-se a receptores nicotínicos da acetilcolina e seguem pelos axônios dos nervos periféricos e neurônios motores até os gânglios espinhais, passando então à medula e ascendendo até o cérebro, onde ocorre uma encefalomielite aguda (REAGAN et al., 1985). Alguns autores observaram outros possíveis receptores para o vírus da raiva, como o ácido siálico de gangliosídeos e as moléculas de adesão celular neurais (THOULOZE et al., 1998), bem como o receptor de neurotrofinas P75NTR (TUFFEREAU et al., 1998).

JACOB et al. (2000) observaram que a condução do vírus aos nervos periféricos, via terminações nervosas motoras, parece utilizar o sistema motor celular num fluxo retrógrado, provavelmente envolvendo a proteína motora dineína, além das junções sinápticas e conexões intercelulares diretas, até atingir o SNC.

Embora as proteínas do vírus da raiva sejam altamente imunogênicas, a resposta imune contra o vírus é fraca durante a fase ascendente desde o local de entrada até o SNC, o que pode ser atribuído à barreira hemato-encefálica, que mantém o vírus isolado dos anticorpos e células imunes (GONÇALVES et al., 2002). Na resposta imune a apresentação dos antígenos pelos macrófagos é crucial para a produção de anticorpos pelos linfócitos B e para a estimulação de linfócitos T-auxiliares que, por sua vez, produzem as citocinas envolvidas na eliminação do vírus. Entretanto, a estimulação de linfócitos B e a síntese de imunoglobulinas geralmente não ocorrem até os sinais clínicos aparecerem e o título de anticorpos neutralizantes permanece baixo até a fase terminal da doença, atingindo seu pico próximo da morte do hospedeiro (ZANETTI, 1998).

A partir do SNC o vírus se dissemina de maneira centrífuga, via nervos periféricos, em direção a diversos órgãos. Antígenos virais já foram detectados em células da epiderme, folículos pilosos, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmão, músculo cardíaco, mucosas gástrica e intestinal, pâncreas,

parênquima renal, glândulas adrenais, ureteres, bexiga e uretra (CHARLTON, 1988; GERMANO et al., 1988). O vírus replica-se nas glândulas salivares e sua excreção através da saliva é o principal mecanismo de disseminação (SCHNEIDER, 1991).

A virulência, relacionada ao neurotropismo do vírus da raiva, pode ser explicada pela sua capacidade de interagir com os receptores da membrana celular, como o receptor nicotínico e a molécula de adesão da célula neural (THOULOZE et al., 1998). Mutações na proteína G da superfície viral, responsável pela ligação a estes receptores, têm um papel essencial na patogenicidade do vírus. Em algumas amostras selvagens verificou-se que o aminoácido arginina ou lisina na posição 333 da glicoproteína era o responsável pela virulência, e variantes do vírus onde ocorria a troca desses aminoácidos por glutamina, isoleucina, glicina, metionina ou serina apresentaram pouca ou nenhuma virulência quando inoculados por via intracerebral em camundongos adultos (DIETZSCHOLD et al., 1996).

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

Na América Latina e nas regiões onde a raiva em animais domésticos não está controlada, o cão é o principal transmissor da raiva aos humanos e a outros animais domésticos. Os morcegos hematófagos são os principais transmissores da doença para os herbívoros (QUEIROZ LIMA, 1934), mas as espécies insetívoras e frugívoras também podem transmitir a raiva (SILVA et al., 1967; ACHA & SZYFRES, 1986).

No Brasil, tem-se observado um aumento na incidência de casos de raiva em animais silvestres, enquanto decresce a incidência em cães e gatos. No ano de 1999, registrou-se 37 casos em silvestres, sendo quatro em morcegos hematófagos, seis em não hematófagos, 15 em raposas, três em cangambás, um em macaco e oito em

espécies não identificadas. No ano de 2002, o número de casos elevou-se para 89, sendo 12 em morcegos hematófagos, dois em não-hematófagos, 55 em espécies não identificadas, cinco em cangambás, 13 em raposas e dois em animais de outras espécies (OPAS, 2002). Em 2005, somente em morcegos foram registrados 196 casos. Neste mesmo período, a incidência em cães caiu de 970 casos, em 1999, para 93, em 2005 (OPAS, 2005).

A raiva pode se apresentar, em geral, de duas formas: raiva furiosa e raiva parálitica ou muda, de acordo com a sintomatologia mostrada pelo indivíduo infectado (MURRAY et al., 2000).

Existe uma grande variação no período de incubação da doença, tanto em humanos quanto em animais, geralmente variando de 20 a 90 dias (JACKSON, 2003), existindo relatos de período de mais de um ano. SMITH et al. (1991), por exemplo, investigaram três imigrantes nos EUA que morreram de raiva sem histórico de exposição a qualquer fonte de infecção. Concluiu-se que a infecção não poderia ter ocorrido naquele país, mas sim nos países de origem de cada um dos imigrantes, sugerindo então que se tratava de longos períodos de incubação (11 meses, quatro anos e seis anos). Esta variabilidade pode ser justificada pela proximidade da mordida em relação ao SNC, variação da inervação do local, severidade da lesão, quantidade de vírus inoculado e por fatores do próprio hospedeiro (JACKSON, 2003).

Nos humanos, a enfermidade começa com uma sensação de angústia, cefaléia, pequena elevação da temperatura corpórea, mal-estar e alterações sensoriais, geralmente no local da mordedura. Na fase seguinte ocorre excitação, hiperestesia e uma extrema sensibilidade à luz e ao som, dilatação das pupilas e aumento da salivação. À medida que a enfermidade progride, há espasmos nos músculos de deglutição e os líquidos são rejeitados violentamente por contrações musculares. Esta disfunção de deglutição se observa na maioria dos enfermos, muitos dos quais apresentam contrações espasmódicas laringofaríngeas à simples vista de um líquido, e se abstêm de deglutir a própria saliva (hidrofobia). Pode-se observar também espasmos nos músculos respiratórios e convulsões generalizadas. A fase de excitação pode ser predominante até a morte, ou substituída por uma fase de paralisia generalizada. A

enfermidade dura, em média, de dois a seis dias, algumas vezes um período maior e, de modo quase invariável, termina com morte (MURRAY et al., 2000).

Nos cães e gatos, o período de incubação é, em geral, de 10 dias a dois meses. Na fase prodrômica estes animais manifestam alterações de comportamento, se escondem em locais escuros ou mostram uma agitação inusitada, dando voltas sem parar (BRASIL, 2007). Na forma furiosa, a excitabilidade reflexa está exaltada e observa-se ainda anorexia, irritação na região da mordedura, estimulação das vias geniturinárias e um ligeiro aumento na temperatura corpórea. Depois de um a três dias, o cão (ou gato) torna-se agressivo, com tendência a morder objetos, animais e o homem. A salivação é abundante, já que o animal não deglute a saliva devido à paralisia dos músculos de deglutição, havendo, nos cães, uma alteração do latido devido a paralisia parcial das cordas vocais, provocando um latido rouco e prolongado. No lugar da expressão plácida normal, os animais apresentam-se muito atentos e seguem os movimentos e ruídos ao seu redor com os olhos e as orelhas (KOTAIT et al., 1998). Na fase terminal podem ser observadas convulsões generalizadas, após as quais ocorrem incoordenação muscular e paralisia dos músculos do tronco e das extremidades, seguidas de coma e morte (ATANASIU, 1975). A forma muda ou paralítica caracteriza-se pelo predomínio de sintomas paralíticos onde a fase de excitação é muito curta ou ausente. A paralisia começa pelos músculos da cabeça e pescoço, o animal tem dificuldade na deglutição e pode-se suspeitar que esteja engasgado. É quando o proprietário que tenta intervir sem o devido cuidado expõe-se à infecção. Logo se manifesta a paralisia das extremidades, em seguida a paralisia geral e a morte. O curso da enfermidade pode durar de um a 11 dias (RUPPRECHT et al., 2001).

Em herbívoros, o período de incubação varia de 25 a 90 dias. Na raiva transmitida pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*, há predominância de sintomatologia do tipo paralítico. Os animais acometidos isolam-se do rebanho, alguns podem apresentar midríase e pêlos arrepiados, enquanto outros apresentam sonolência. Pode haver movimentos anormais das extremidades posteriores, lacrimejamento e corrimento nasal catarral. Os acessos de fúria são raros e podem ser notados tremores musculares, inquietude, priapismo e hipersensibilidade no local da

mordedura do morcego, levando o animal doente a raspar e coçar essa região até causar ulcerações. Muitas vezes há aumento da libido, os mugidos são freqüentes e intercortados e o tenesmo é bastante frequente. Com a progressão do quadro sintomatológico (dois a três dias após o início dos sintomas) aparecem as incoordenações e contrações da musculatura do pescoço, tronco e extremidades. O andar é cambaleante, a ruminação cessa e há dificuldade de deglutição, dando a aparência de engasgo. Finalmente caem e tentam, sem sucesso, se levantar. Mufla e lábios ficam cobertos por uma baba amarelada e espumosa. A duração da doença é, geralmente, de quatro a sete dias, terminando, invariavelmente, com a morte que se dá por paralisia da musculatura envolvida na respiração (KOTAIT et al., 1998).

Após o aparecimento dos sintomas, a raiva é fatal em praticamente 100% dos casos (NILSSON, 1970). A divulgação da cura de um paciente humano, uma adolescente de Milwaukee (EUA), cujo tratamento foi baseado na indução do coma e administração de drogas antivirais, sem a utilização de produtos imunobiológicos (WILLOUGHBY et al., 2005), gerou uma grande expectativa em relação ao tratamento. Porém, alguns autores aconselham cautela antes da confirmação da eficácia do tratamento, considerando que o diagnóstico não foi definitivo, pois não houve isolamento viral, e foi baseado em evidência sorológica (WILDE et al., 2008). Todavia, o protocolo de Milwaukee vem sendo utilizado em vários países e, em novembro de 2008, o governo brasileiro anunciou que um jovem do Estado de Pernambuco, no qual foi diagnosticado raiva, após ser submetido a esse tratamento apresentou três resultados negativos seguidos em exames diagnósticos realizados pelo Instituto Pasteur de São Paulo (BRASIL, 2008).

A prevenção da raiva animal é o instrumento mais importante no controle da raiva humana (FENNER et al., 1992). Sempre que possível uma suspeita clínica de raiva deve ser confirmada por testes laboratoriais (KING, 1998). Os resultados laboratoriais influenciam tanto na decisão de se proceder ou não um tratamento como na decisão de se instituir medidas para controle de uma epizootia em uma comunidade. Além disso, permitem assegurar a eficácia e a segurança de produtos biológicos usados nos tratamentos de prevenção em humanos e animais (MESLIN & KAPLAN, 1996a).

O diagnóstico laboratorial da raiva é realizado rotineiramente com materiais obtidos do SNC, incluindo-se os fragmentos do encéfalo, cerebelo e medula espinhal. Ao exame microscópico, alguns membros da família *Rhabdoviridae*, como o vírus da raiva, são distinguidos dos outros membros do grupo pela formação de inclusões citoplasmáticas características, os corpúsculos de Negri (ATANASIU, 1975).

O teste de Imunofluorescência Direta (IFD), descrito por GOLDWASSER & KISSLING (1958), e modificado por DEAN et al. (1996), ainda permanece como padrão para o diagnóstico de raiva. É uma prova rápida, muito sensível e específica. Outra vantagem é que pode ser utilizado para pacientes ainda com vida (ACHA & SZYFRES, 2003; RUPPRECHT et al., 2002). Porém, permanece ainda a questão de resultados falso-negativos, que podem ocorrer com o uso desta técnica. Para minimizar esses erros, os especialistas que contribuem para a OMS recomendam o uso de pelo menos duas técnicas para o estabelecimento do diagnóstico: IFD e Inoculação intracerebral em camundongos (IIC) (DEAN et al., 1996; KOPROWSKI, 1996).

A pesquisa microscópica dos Corpúsculos de Negri por exame histopatológico com coloração direta, como no método de Sellers, é um procedimento simples, rápido e econômico, porém é um método menos sensível (ACHA & SZYFRES, 2003).

Os AcMs contra o vírus rábico foram produzidos pela primeira vez por WIKTOR & KOPROWSKI (1978) e atuam na glicoproteína ou no nucleocapsídeo viral. Embora esta técnica seja empregada principalmente em investigações epidemiológicas, tem se mostrado útil no diagnóstico em certas circunstâncias, como nos casos de raiva humana “importada” e em casos sem histórico de exposição (MESLIN & KAPLAN, 1996a; SMITH et al., 1991).

As provas sorológicas são aplicadas para se conhecer a resposta imunológica de pessoas ou animais vacinados, as evidências de infecções não fatais e também em experimentos que envolvem a patogenia (CLIQUET et al., 1998). As técnicas moleculares modernas, como o RT-PCR, podem detectar o ácido nucléico dos *Lyssavirus*, porém, devido a sua demora, alto custo de equipamentos e mão-de-obra e alto risco de falsos positivos e falsos negativos, recomenda-se que não se utilize esta técnica para diagnóstico de rotina, podendo ser usado como um teste confirmatório (RUPPRECHT et al., 2002).

O controle da raiva animal nas áreas urbanas baseia-se principalmente na vacinação dos animais domésticos, sendo esta uma atribuição dos governos estaduais e municipais. O Programa de Controle da Raiva, preconizado pela OMS, pela OPAS e pelo Ministério da Saúde do Brasil, define a vacinação de cães e gatos, a apreensão de cães errantes, o atendimento de pessoas envolvidas em agravos com animais, a observação clínica de cães e gatos, o tratamento de pessoas expostas ao risco de infecção rábica, a vigilância epidemiológica (contemplando, entre outros tópicos, a colheita e envio de material para exames laboratoriais e o controle de áreas de foco de raiva) e a educação em saúde, como atividades para estabelecimento de um sistema eficiente de controle da raiva canina e humana, tendo em vista que nos países em desenvolvimento o cão é ainda o principal agressor e transmissor da doença aos seres humanos, sendo a avaliação da circulação do vírus na espécie canina um dos principais parâmetros para que a doença seja considerada controlada (BRASIL, 2007).

A raiva dos animais de interesse econômico ou, simplesmente, raiva rural ou dos herbívoros, vem aumentando desde a década de 80 na maioria dos estados brasileiros e nos países da América Latina onde existe o morcego hematófago *Desmodus rotundus*. A raiva bovina preocupa governantes e pecuaristas, tanto por ser uma zoonose, quanto pelos prejuízos econômicos que causa. Entre perdas diretas e indiretas, estimou-se que os prejuízos podem atingir 175 milhões de dólares/ano na América Latina, com a morte, só no Brasil, de cerca de 40.000 bovinos (ACHA & MÁLAGA-ALBA, 1988). Entretanto, esses valores podem ser muito maiores devido à subnotificação. Conforme estimativa do MAPA, para cada caso notificado, dez deixam de ser, em consequência de um serviço de vigilância carente de maiores investimentos em recursos humanos e financeiros. Na zona rural a ação fundamental é o controle da raiva bovina, que tem os morcegos como fonte de infecção primária. A profilaxia da raiva em herbívoros é feita mediante a utilização de programas estratégicos e contínuos, utilizando-se a vacinação do rebanho em áreas onde haja incidência de raiva e controle populacional dos agentes transmissores, que são os morcegos hematófagos. Para adequado controle da raiva dos herbívoros, segundo o Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros, do MAPA, três medidas devem ser adotadas sistematicamente: atendimento a foco, controle populacional de morcegos e vacinação.

Em relação a atendimento a focos, quando ocorre a comunicação de um caso suspeito de raiva em herbívoros, os seguintes procedimentos devem ser adotados: anamnese, exames clínicos, necropsia, colheita de material e encaminhamento para laboratório com correto acondicionamento e conservação, e colheita de dados epidemiológicos. Já o controle populacional de morcegos é feito por meio de uma medida oficial que se baseia no uso da pasta vampiricida (a base de substâncias anticoagulantes), seja nos morcegos hematófagos ou nas mordeduras nos animais atingidos (BRASIL, 2005).

A vacinação é uma ferramenta importante para o controle da raiva, pois diminui a ocorrência nas espécies vacinadas (NOGUEIRA, 2003). No meio urbano, a vacinação de cães e gatos rompe eficazmente a cadeia de transmissão de raiva aos seres humanos (BERAN & CROWLEY, 1983). No meio rural, a vacinação dos herbívoros, especialmente ruminantes e equinos, diminui consideravelmente a ocorrência da raiva transmitida por quirópteros (WHO, 1992).

No Estado de São Paulo, o controle da raiva na zona rural é atribuído à Coordenadoria de Defesa Agropecuária, órgão da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, que estabeleceu, em 2001, a obrigatoriedade da vacinação anti-rábica dos herbívoros em alguns municípios considerados endêmicos, juntamente com a vacina de febre aftosa (CDA, 2001).

Após o sucesso de Pasteur, em 1885, que realizou o primeiro tratamento pós exposição utilizando uma vacina produzida a partir de medula espinhal de coelhos adultos infectados com o vírus da raiva, parcialmente inativado pelo fenol, o foco passou a ser o desenvolvimento de vacinas mais seguras, sem as indesejadas seqüelas neurológicas produzidas por essa vacina (DREESEN, 1997). O segundo passo foi a inativação completa pela associação de fenol com aquecimento, e formol, o que diminuiu o risco de provocar a doença, mas manteve as desvantagens do curto período de imunidade e da alta freqüência de reações neurológicas (BLANCOU, 1986). A seguir, a tentativa foi a de se utilizar outras espécies animais para a inoculação viral, como carneiros, bezerras e camundongos, preferencialmente jovens, o que permitiu constatar as vantagens da utilização de camundongos neonatos, mais sensíveis ao vírus e com menor quantidade de mielina, possibilitando o uso de doses menores sem

prejuízo à indução de imunidade e com menos reações adversas (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955).

Outra geração de vacinas contra a raiva que surgiu, na década de 50, foi a de vírus vivo modificado, ou simplesmente vacinas atenuadas, obtidas através de várias passagens em ovo embrionado de galinhas: Flury LEP (“low egg passage”, 70 passagens), Flury HEP (“high egg passage”, 180 passagens), e Kelev (100 passagens), bem como as de cultivo celular, SAD (“Street Alabama Dufferin”) e ERA (Ellen-Rokitnic-Abelseth), já na década de 60, que apresentavam a vantagem de proporcionar maior período de imunidade (CORDEIRO et al., 1990). Porém, eram restritas a determinadas espécies, além de serem termossensíveis e menos seguras, devido à possibilidade de reversão da patogenicidade (BLANCOU, 1986; KOTAIT et al., 1998). Com o advento das culturas celulares, surgiram grandes avanços na produção de vacinas (ESPESETH, 1996). Nessa mesma década, o “Wistar Institute”, na Filadélfia (EUA), desenvolveu a primeira vacina em cultura de células diplóides humanas, produzida com a estirpe PM e inativada pela β -propiolactona. Esta vacina foi liberada para uso em humanos em 1976 e apresentou baixo índice de reações adversas, mas o preço foi limitante para o uso em larga escala (COSTA et al., 2000).

Por mais de 100 anos, vacinas contra a raiva originadas de tecido nervoso vêm sendo utilizadas para a imunização de humanos. Estas vacinas são consideradas econômicas e conferem boa proteção, mesmo sem alcançar potências elevadas, mas estão associadas a efeitos adversos graves (DIAZ, 1996). Apesar disso, continuam a ser a única opção para a população de países subdesenvolvidos, enquanto que as vacinas originadas de cultivo celular, mais seguras e eficazes, estão disponíveis há mais de 20 anos para as populações de países desenvolvidos, justamente as que têm menor risco de contrair a doença (OMS, 2002).

No Brasil, a vacina utilizada nos programas de saúde pública, a partir de 2006, é originada de células Vero, uma linhagem celular derivada do rim do macaco verde africano, que utiliza a estirpe PM, é inativada e purificada por ultracentrifugação, portanto mais segura. Em casos de reação de hipersensibilidade, utiliza-se a vacina produzida em cultura de células diplóides humanas.

Uma variedade de vacinas veterinárias contra a raiva, atenuadas e inativadas, tem sido usadas no Brasil desde 1911, quando técnicos do Ministério da Agricultura elaboraram as primeiras, numa tentativa de começar a imunizar os rebanhos. Em 1966 foi instituído, pelo Ministério da Agricultura, o Plano de Combate à Raiva dos Herbívoros, sistematizando as ações profiláticas e intensificando as campanhas de vacinação. Vacinas tipo Formidogel, Flury LEP, Flury HEP, Fuenzalida-Palacios modificada e, mais recentemente, as de cultivo celular, têm sido utilizadas (CORTES et al., 1993; KOTAIT et al., 1998). A primeira preparação em cultivo celular, em células da linhagem BHK, data de 1960, mas somente em 1978 produziu-se em escala industrial (CORTES et al., 1993). Em 2002, o MAPA editou a Instrução Normativa Nº 5, que atualizou o Plano de Combate à Raiva, instituindo o Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCHR) e aprovando as Normas Técnicas para o Controle da Raiva dos Herbívoros no Brasil. Nesta Instrução Normativa as vacinas atenuadas foram banidas. Desde então, apenas vacinas inativadas produzidas em cultivo celular são utilizadas (BRASIL, 2005). Somente as vacinas utilizadas em campanhas de controle da raiva canina, sob responsabilidade do Ministério da Saúde, continuam sendo produzidas em cérebro de camundongos lactentes (Fuenzalida-Palacios modificada), mas em 2008 algumas partidas de vacinas de cultivo celular começaram a ser introduzidas na campanha.

Vários métodos e diferentes substâncias químicas têm sido usados como inativantes na produção dessas vacinas. A inativação suprime a capacidade de replicação dos vírus pela destruição de estruturas essenciais como o genoma, mantendo estruturas proteicas imunogênicas. Atualmente são utilizados os inativantes de primeira ordem, que possuem uma cinética de inativação constante: a β -propiolactona; a Acetiletienoimina e a Etilenoimina; a Bromoetienoamina, a Bromoetienoimina binária e outras iminas e, menos freqüentemente, a radiação ultravioleta (VAZ, 1999; COSTA et al., 2000).

O uso de adjuvantes em vacinas inativadas de cultivo celular faz com que a resposta imunológica seja equiparada à das vacinas atenuadas, desde que conservadas em condições ideais (SILVA & CUNHA, 1973). São substâncias que não possuem capacidade imunogênica específica isoladamente, mas quando adicionadas à

vacina potencializam a resposta imune específica contra o antígeno (BIER et al., 1982). O mecanismo de ação dos adjuvantes não está completamente esclarecido, mas alguns efeitos como o de prolongar a permanência do antígeno no organismo, formação de granulomas e indução da resposta imune inespecífica já foram descritos (TIZAR, 2000). Existem cerca de 20 vacinas comerciais diferentes disponíveis no Brasil, entre nacionais e importadas, sendo que a maioria utiliza células BHK infectadas com a amostra PV e hidróxido de alumínio como adjuvante. Algumas associam saponina, um complexo químico vegetal com poder detergente, ou avridine, um aminolípido sintético que aumenta a persistência da resposta imune (CORTES et al., 1993).

Existem, ainda, as vacinas recombinantes, produzidas pela inserção de uma cópia do gene da glicoproteína no genoma do vírus vacinal Poxvirus, indicadas principalmente para imunização por via oral de espécies silvestres, através do uso de iscas comestíveis. Estas vacinas foram usadas com sucesso em alguns países da Europa e América do Norte, mas não estão liberadas para uso no Brasil (WHO, 1992; CORTES et al., 1993; KOTAIT et al., 1998). Atualmente, o uso desta vacina está sendo testado em morcegos, através de capturas e aplicação de pasta, do mesmo modo que se faz com a pasta vampiricida e, num futuro próximo, plantas geneticamente modificadas poderão induzir imunidade contra a raiva e outras doenças. É possível, por exemplo, obter antígenos de raiva em plantas do tabaco (KOPROWSKI & YUSIBOV, 2001; SCHATZMAYR, 2002).

Falhas vacinais podem ocorrer por razões intrínsecas e extrínsecas à vacina. No momento da vacinação, o animal deve estar hígido para que outros processos metabólicos e patológicos não interfiram na resposta imunológica. Os cuidados na vacinação devem incluir a via de aplicação correta, dose adequada, tipo de vacina e, principalmente, conservação do produto, desde a origem até o momento da vacinação, observando-se a manutenção do resfriamento entre 2°C e 8°C (KOTAIT et al., 1998).

A necessidade de avaliação da potência das vacinas é reconhecida desde a época de Pasteur. Os testes para avaliar a capacidade de uma vacina contra a raiva de induzir proteção nos indivíduos vacinados foram desenvolvidos há décadas, com uso de modelos animais vivos. No entanto, o uso de animais de laboratório como o camundongo (*Mus musculus*) para pesquisa e diagnóstico da raiva iniciou-se com

Webster e Dawson, em 1935, que relataram pela primeira vez a grande susceptibilidade desta espécie animal à inoculação intracerebral do vírus da raiva. A grande variação nas potências das vacinas comerciais foram motivo de pesquisas e desenvolvimento de vários testes de potência, como os de Habel, NIH e Koprowski, entre outros (STEELE, 1975). O teste de Koprowski foi desenvolvido para vacinas atenuadas e utiliza cobaias (*Cavia porcellus*) como modelo. O teste de Habel utiliza o conceito da ruptura da imunidade, onde grupos de camundongos são vacinados com seis doses da vacina em teste, via intraperitoneal, e depois são desafiados com diferentes diluições do vírus CVS, via intracerebral. Grupos não vacinados recebem o mesmo desafio e a potência, ou Índice de Habel, é determinada pela diferença entre a dose letal capaz de matar 50% (DL_{50}) dos camundongos vacinados e a DL_{50} dos camundongos não-vacinados. A diferença, expressa em logaritmo, deve ser maior ou igual a 4 para que um lote seja aprovado (HABEL, 1976). É um teste confiável por apresentar alta reprodutibilidade, e foi adotado como o teste oficial, no Brasil, desde o início das atividades da Unidade de Controle de Vacinas contra a Raiva do Lanagro/SP, em 1988, até ser substituído pelo teste NIH, em 2002 (VAZ, 1999; BRASIL, 2002). O teste de potência NIH, desenvolvido nos "National Institutes of Health", em Bethesda (EUA), é o mais adotado internacionalmente e considerado o mais padronizado (HABEL, 1976). É o teste preconizado pela OMS (WHO, 1992a). Possui a vantagem de incluir uma vacina de referência nacional (VRN) padronizada através de testes comparativos com uma vacina de referência internacional (VRI). O "5º Padrão Internacional para Vacinas de Raiva", a atual VRI, foi estabelecido em 1991 em estudos colaborativos internacionais. É uma vacina preparada com o vírus da estirpe PM replicado em células Vero e inativado por β -propiolactona. É purificada, liofilizada e envasada em ampolas contendo 16 UI, mantidas e distribuídas aos laboratórios de produção e controle pelo "State Serum Institute", em Copenhague, na Dinamarca (WHO, 1992b). Dessa maneira, indiretamente, toda vacina submetida ao teste de potência NIH é comparada à VRI e pode ter o resultado expresso em unidades internacionais.

Diferentemente do teste de Habel, o teste NIH baseia-se no conceito da extinção do antígeno, onde grupos de camundongos são inoculados com diluições crescentes da vacina em teste, enquanto outros grupos recebem a vacina de referência, cujo título é

conhecido, nas mesmas diluições crescentes, em duas doses com intervalo de uma semana entre elas. Uma semana após a segunda dose, todos os camundongos vacinados são inoculados por via intracerebral com uma dose fixa do vírus CVS. Determina-se, então, a dose efetiva (DE_{50}) capaz de proteger 50% dos camundongos vacinados com a vacina em teste, bem como a dos vacinados com a vacina de referência. A partir da comparação estatística entre a DE_{50} das duas vacinas, calcula-se a potência relativa da vacina em teste, expressa em UI (WILBUR & AUBERT, 1996). São aprovadas as partidas que atinjam a potência mínima de 1,0 UI/dose, conforme recomendação da OMS (WHO, 1992b).

ARITA (2002) comparou os testes de Habel e NIH e obteve percentuais de aprovação superiores no primeiro, sugerindo que o teste NIH, por ter aprovado menor número de partidas na comparação, representa um maior rigor no controle de vacinas.

Apesar das vantagens citadas, o teste de potência NIH sempre foi alvo de muitas críticas, principalmente pela baixa reprodutibilidade, falta de homologia com a infecção natural e com a via de aplicação (WUNDERLI et al., 1991). ZANETTI et al. (1998), utilizando uma vacina Fuenzalida-Palacios de uso humano desafiada com vírus CVS e amostras de vírus de campo, obtiveram resultados menores que 1,0 UI/mL no teste de potência NIH com amostras de campo. BARTH et al. (1988) investigaram as possíveis causas da baixa reprodutibilidade do teste NIH utilizando uma VRI produzida com vírus CVS e uma vacina contra a raiva de uso humano produzida com a amostra Flury LEP, e verificaram que ambas apresentaram melhor desempenho quando o desafio foi realizado com vírus homólogo ao das vacinas.

A OMS coordenou estudos sobre os testes de potência de vacinas, investigando a possibilidade de substituir o teste NIH por um teste *in vivo* modificado, alterando a amostra de vírus de desafio, número de vacinações, via de inoculação da vacina e do vírus desafio, mas manteve a indicação de se utilizar o teste NIH (WHO, 1992b). Testes envolvendo vacinação pela via intramuscular com desafio viral periférico vêm sendo desenvolvidos pelos CDC, de Atlanta (EUA), considerando que o desafio com amostras de vírus de campo pela via intramuscular é o que mais se aproxima da condição de exposição natural quando comparado ao desafio intracerebral com vírus fixo (SIZARET, 1996; BAER, 1997).

Vários trabalhos utilizando camundongos como modelo sugeriram falhas vacinais ou proteção parcial contra vírus da raiva isolados de diferentes áreas geográficas (HAYASHI et al., 1984; ZANETTI et al., 1998). Por outro lado, outros autores defendem que as vacinas utilizadas atualmente são eficazes na proteção contra as diferentes variantes (FEKADU et al., 1988; ERBOLATO et al.; LODMELL et al., 1995; BERNARDI et al., 2005a).

Apesar dos conhecimentos atuais sobre a ocorrência de diferentes estirpes de vírus em uma mesma região, as vacinas contra a raiva continuam a ser preparadas a partir de estirpes clássicas (WHO, 1992a). Portanto, assume relevante importância na prevenção da infecção rábica, não só o conhecimento da existência de diferentes estirpes de vírus, mas, primordialmente, a eficácia das vacinas frente a essas estirpes (GERMANO et al., 1990). A constatação do aumento da disseminação do vírus da raiva pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* e de casos de óbito em rebanhos vacinados corroboram a necessidade de estudos aprofundados sobre a relação entre variantes virais, distribuição nos diferentes ecossistemas e eficácia das vacinas.

III. OBJETIVOS

1) Avaliar a eficácia de uma vacina comercial frente ao desafio com amostras de campo do vírus da raiva, originárias de diferentes regiões brasileiras, e comparar com o desafio com o vírus fixo CVS, padrão para o teste de potência NIH, reproduzindo o teste oficial de controle de vacinas contra a raiva adotado pelo Brasil.

2) Estabelecer uma relação entre os resultados dos testes de potência da vacina e as características filogenéticas das amostras de vírus de campo utilizadas nos desafios (a análise filogenética destas amostras será realizada por pesquisadores que fazem parte do grupo de estudos moleculares que envolve a Universidade de Nihon, do Japão, a Universidade de São Paulo, a Universidade Federal de Mato Grosso e a Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Jaboticabal).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Camundongos

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), linhagem albino Swiss, jovens, pesando entre 11g e 14g, fornecidos pela Unidade de Biotério do Lanagro/SP. Na produção do CVS, bem como nas passagens das amostras de vírus de campo, utilizou-se camundongos SPF criados em isoladores. Nas titulações e testes de potência, os camundongos vieram da colônia convencional, cujo padrão sanitário é monitorado periodicamente e mantido por boas práticas de manejo. Os animais foram pesados antes de cada experimento para garantir a uniformidade, evitando-se possíveis interferências advindas da utilização de animais de diferentes tamanhos e idades. Foram descartados os que estavam com menos de 11g e aqueles com mais de 14g.

2. Vírus Padrão

O vírus CVS, que remonta desde a época de Pasteur, teve sua origem na adaptação do vírus PV a camundongos. O vírus CVS utilizado nos experimentos é o mesmo que se utiliza rotineiramente no controle oficial das vacinas. Foi fornecido pelo Cepanzo, antigo centro de referência da OPAS para padronização de técnicas e produção de padrões biológicos, que funcionou até 1990 na Argentina, onde recebeu a denominação Cepanzo 31/2, que significa 31 passagens em camundongos desde a origem mais 2 passagens realizadas no Cepanzo. No Lanagro, após mais uma passagem em camundongos, o lote produzido recebeu a denominação Vírus Semente Lanagro 31/2/1. A partir deste, outros lotes são produzidos para o uso na rotina. O lote utilizado foi produzido em 11/04/08 e é mantido congelado a -70°C em tubos tipo *ependorf* contendo 0,7mL de suspensão viral a 20%. Como é utilizado na rotina, teve o título médio (DL_{50}) previamente determinado.

3. Vírus de Campo

Foram utilizadas quatro amostras de tecido nervoso, provenientes de diferentes regiões do Brasil e diagnosticadas positivamente para a raiva pelos métodos de Imunofluorescência Direta (IFD) e Inoculação intracerebral em Camundongos (IIC) nos laboratórios credenciados de seus estados de origem e confirmadas no Laboratório de Pesquisa em Raiva do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UNESP - *Câmpus* de Jaboticabal/SP, onde estavam estocadas a -20°C.

3.1 Amostra 616/2002

Proveniente de bovino, fêmea, raça Nelore, com idade aproximada de 30 meses, do Município de Livramento, Estado de Mato Grosso, de um rebanho supostamente vacinado onde morreram quatro vacas no período de dois meses, todas com sinais compatíveis com raiva.

3.2 Amostra 2156/2005

Proveniente de bovino do Município de Sandolândia, Estado de Tocantins. Amostra recebida sem informações adicionais.

3.3 Amostra 774/2006

Proveniente de equino do Município de Alexânia, Estado de Goiás. Sem informações adicionais.

3.4 Amostra 1018/2006

Proveniente de bovino do Município de Palmeira de Goiás, Estado de Goiás. Sem informações adicionais.

4. Preparo das suspensões virais

As amostras foram pesadas, diluídas a 20% em solução esterilizada de albumina de sangue bovino 0,75% acrescida de uma solução de antibióticos de modo a conter uma concentração final de 1600 UI/mL de estreptomicina e 500 UI/mL de penicilina, trituradas em “mixer” em três sessões de um minuto a 1500 rpm com intervalo de 30 segundos entre cada sessão, centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm, e tiveram os sobrenadantes colhidos em alíquotas de 0,7mL em tubos tipo “ependorf” e congelados a -70°C. Em todas essas manipulações as soluções foram mantidas refrigeradas em banho de gelo ou em equipamentos refrigerados a 4°C.

Posteriormente, uma primeira passagem em camundongos foi realizada pela técnica de IIC. Os camundongos inoculados foram sacrificados em câmara de CO₂ na fase final da doença, quando apresentaram paralisia e prostração, e tiveram os cérebros colhidos assepticamente em cabine de segurança de fluxo laminar e todo o procedimento de diluição, trituração e centrifugação foi repetido, bem como o congelamento em alíquotas de 0,7mL. Da mesma forma, uma 2ª passagem foi realizada por IIC a partir da solução obtida na 1ª passagem.

5. Titulação Viral

As suspensões virais obtidas após duas passagens em camundongos foram tituladas em triplicata para a obtenção do título médio. As titulações foram feitas inoculando-se 0,03 mL, via intracerebral, de diluições sucessivas da suspensão viral, na base dez (10^{-1} a 10^{-8}), em solução a 0,75% de albumina de sangue bovino, em grupos de dez camundongos jovens (11g a 14g) por diluição. Para o cálculo da DL₅₀ foi aplicada a fórmula de Spearman & Kärber, que relaciona o número de animais mortos com o de sobreviventes após 14 dias de observação (AUBERT, 1996).

O vírus padrão, antes de ser utilizado na rotina de testes do Lanagro/SP, também foi titulado em triplicata para a obtenção da DL₅₀ média, e depois de ser utilizado em dez testes NIH seguidos, teve o título médio recalculado com os dez valores obtidos nas titulações que acompanharam os testes NIH.

6. Vacina de Referência

Foi utilizada a vacina de referência nacional VRN 001/05, a mesma que se usa nos testes oficiais. É uma vacina liofilizada, produzida na França e previamente validada por comparação ao 5º Padrão Internacional para Vacinas de Raiva, em testes colaborativos realizados pelo Lanagro/SP e indústrias produtoras de vacinas, onde se estabeleceu a potência de 3,12 UI/mL.

7. Vacina Teste

Uma vacina comercial foi escolhida para este estudo de maneira aleatória dentre as amostras que o Lanagro/SP recebe para o controle oficial, observando-se os critérios de ter sido recentemente aprovada no teste oficial e estar dentro do prazo de validade. A vacina utilizada é líquida, inativada, produzida no Brasil com vírus fixo PV multiplicado em cultivo celular, e indicada para bovinos, equinos, ovinos e caprinos.

8. Teste de Potência NIH

Seguindo o protocolo do teste de potência NIH, foram montados testes em duplicata (“A” e “B”) para cada amostra de vírus de campo, de modo que cada desafio com vírus de campo pudesse ser comparado a um desafio com o vírus padrão. Cada teste NIH é composto por três grupos de camundongos. O primeiro grupo é subdividido em quatro, um para cada diluição da vacina teste (1:5, 1:25, 1:125 e 1:625), com 18 camundongos para cada diluição. Da mesma forma, o segundo grupo é subdividido em quatro para ser vacinado com as mesmas diluições da vacina de referência. Um terceiro grupo, de 80 camundongos que serão utilizados como controle e titulação dos desafios, não recebe vacinação. A figura 3 é uma representação esquemática das montagens dos testes NIH em duplicata, onde “X” é o número do teste (1, 2 ou 3), e demonstra o protocolo utilizado para cada amostra de vírus de campo nos três testes realizados. O grupo reservado para controle e titulação dos desafios não está representado.

X-A (Desafio com CVS)		X-B (Desafio com amostra de campo)	
Vacinados com VRN (Vacina de Referência)	Vacinados com VT (Vacina teste)	Vacinados com VRN (Vacina de Referência)	Vacinados com VT (Vacina teste)
Diluição 1:5 18 camundongos	Diluição 1:5 18 camundongos	Diluição 1:5 18 camundongos	Diluição 1:5 18 camundongos
Diluição 1:25 18 camundongos	Diluição 1:25 18 camundongos	Diluição 1:25 18 camundongos	Diluição 1:25 18 camundongos
Diluição 1:125 18 camundongos	Diluição 1:125 18 camundongos	Diluição 1:125 18 camundongos	Diluição 1:125 18 camundongos
Diluição 1:625 18 camundongos	Diluição 1:625 18 camundongos	Diluição 1:625 18 camundongos	Diluição 1:625 18 camundongos

Figura 3. Representação esquemática dos testes NIH, onde cada diluição representa uma caixa contendo 18 camundongos

8.1 Vacinação

Em cada teste, tanto a vacina de referência quanto a vacina teste foram diluídas assepticamente em salina fisiológica nas proporções 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625, tomando-se o cuidado de manter todas as soluções refrigeradas em banho de gelo. Grupos de 18 camundongos por diluição foram vacinados com cada vacina, via intraperitoneal, 0,5mL por camundongo, com uma dose de reforço sete dias após a primeira. Este procedimento foi feito em duplicata, e um grupo controle de 80 camundongos foi mantido sem vacinação para ser utilizado na confirmação dos títulos dos vírus no momento do desafio, sendo 40 camundongos para o vírus de campo e 40 camundongos para o vírus padrão.

8.2 Desafio

Em cada teste, todos os camundongos vacinados foram desafiados sete dias após a segunda vacinação. Como os testes foram montados em duplicatas contendo um grupo vacinado com a vacina teste e um grupo vacinado com a vacina de referência, uma das duplicatas foi desafiada com uma das amostras de vírus de campo e a outra com vírus CVS. Os desafios foram feitos por meio da inoculação intracerebral de 0,03mL das suspensões virais, utilizando-se seringa de insulina e agulha fina (13x0,3mm). As suspensões virais, previamente tituladas, foram diluídas em solução de albumina a 0,75% de modo a conter uma Dose Efetiva (DE) de aproximadamente $32DL_{50}/0,03mL$, aceitando-se a faixa de 12 a 50 DL_{50} para esta diluição de desafio. Após a inoculação os animais permaneceram em observação por 14 dias.

Os 80 camundongos do grupo controle, não vacinados, foram separados em dois grupos de 40 e utilizados para a verificação do título e, conseqüentemente, da Dose Efetiva inoculada em ambos os desafios da duplicata (vírus de campo e vírus padrão). Para isso, as diluições de desafio dos vírus de campo e do vírus padrão de cada teste sofreram mais três diluições logarítmicas na base 10, além da diluição de desafio. Os dois grupos de 40 camundongos foram subdivididos em quatro grupos de 10, assim cada grupo de 10 foi inoculado pela via intracerebral com 0,03mL de cada uma das quatro diluições sequenciais, e também permaneceram em observação por 14 dias. Dessa forma, aplicando-se a fórmula de Spearman & Kärber, obteve-se o título confirmativo da suspensão viral original, bem como a dose efetiva inoculada no desafio, que deve permanecer entre 12 e 50 DL_{50} para o desafio ser considerado válido, pois valores acima ou abaixo dessa faixa são considerados excessivamente fortes e excessivamente fracos, respectivamente, impedindo a avaliação adequada da eficácia da vacina em teste.

8.3 Cálculo da Potência

A potência relativa da vacina foi calculada estatisticamente pela análise de probito, segundo metodologia indicada na Farmacopéia Européia (COUNCIL OF EUROPE, 2002), analisando-se separadamente os desafios com os vírus de campo e

os desafios com o vírus padrão. Para realizar o cálculo foi utilizado programa de computador disponibilizado pela OMS, denominado Probit (versão 96-1), de autoria de MARSMAN, F.R. (WHO, 1992).

8.4 Comparação da potência relativa entre os testes com VC e com CVS

Para comparar a potência relativa entre os testes aplicados paralelamente, um com vírus de campo (VC) e outro com vírus padrão (CVS), foi estudada a sobreposição dos seus limites de confiança fiduciais a um nível de probabilidade de 83%, que corresponde a um teste de hipóteses sob $H_0: NIH_{VC} = NIH_{CVS}$, considerando o nível de significância de 5% e rejeitando-se H_0 se os intervalos de confiança não se sobrepõem. Caso haja sobreposição dos intervalos de confiança, as médias são consideradas estatisticamente semelhantes.

9. Estudo filogenético das amostras de vírus de campo

As quatro amostras selecionadas foram encaminhadas para estudos moleculares, numa tentativa de se estabelecer uma relação dos resultados apontados nos testes de potência da vacina com as características filogenéticas das amostras de vírus de campo.

Os ácidos nucléicos foram extraídos no Laboratório de Zoonoses Virais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em São Paulo/SP. Os produtos amplificados por PCR foram enviados ao College of Bioresource Sciences of Nihon University, Fujisawa, Kanagawa, no Japão, para o sequenciamento e análise filogenética. Foi analisada a região 203 nt do gene, localizada entre os nucleotídeos 109 e 311 da estirpe PV, buscando demonstrar associação com a divergência filogenética de clusters, conforme estudos anteriores. Os dados do sequenciamento direto foram analisados com o uso da bioinformática.

V. RESULTADOS

1. Passagens em camundongos

1.1 Amostra 616/2002

Na 1ª passagem, os camundongos inoculados com esta amostra apresentaram alto índice de mortalidade inicial (até quatro dias pós-inoculação), provavelmente relacionada com acidente de inoculação e elevada contaminação da amostra. Dos 72 camundongos inoculados, 30 (41,7%) foram descartados nos dois primeiros dias, os restantes começaram a morrer no 7º dia pós-inoculação sem apresentar sinais característicos de raiva, apenas encurvamento dorsal, pêlos arrepiados e prostração. No 9º dia já estavam todos mortos (espontaneamente ou sacrificados). Os camundongos encontrados mortos pela manhã eram aproveitados somente se apresentassem sinais de morte recente, do contrário eram descartados. Foram colhidos os cérebros de 35 camundongos. Na 2ª passagem, os camundongos apresentaram baixo índice de mortalidade inicial, apenas cinco (6,2%) de 80 inoculados, e foram observados sinais característicos de raiva como hiperexcitação seguida de paralisia. Foram sacrificados animais paralíticos prostrados do 7º ao 9º dia pós-inoculação para colheita dos cérebros. O teste de IFD confirmou a positividade para a raiva.

1.2 Amostra 2156/2005

Na 1ª passagem, os camundongos inoculados com esta amostra apresentaram baixo índice de mortalidade inicial. Dos 70 camundongos inoculados, quatro (5,7%) foram descartados nos dois primeiros dias. Os restantes também começaram a morrer no 7º dia pós-inoculação, sem apresentar muitos sinais característicos de raiva, e no 9º dia já estavam todos mortos ou sacrificados. Foram colhidos 65 cérebros. Na 2ª passagem, o índice de mortalidade inicial também foi de 5,7% (quatro mortos em 70 inoculados) e os sinais foram um pouco mais acentuados, com evolução rápida para óbito. Foram aproveitados os cérebros dos animais que apresentaram paralisia e prostração, sacrificados entre o 8º e o 10º dia pós-inoculação, ou com sinais de morte recente. O teste de IFD confirmou a positividade para a raiva.

1.3 Amostra 774/2006

Na 1ª passagem, os camundongos inoculados com esta amostra apresentaram alto índice de mortalidade inicial. Dos 80 camundongos inoculados, 39 (48,7%) foram descartados nos dois primeiros dias. Os restantes começaram a morrer no 4º dia pós-inoculação, sem apresentar sinais característicos de raiva, mas apresentando hidrocefalia, provavelmente devido a elevada contaminação da amostra. Foram colhidos os cérebros de 13 camundongos prostrados no 4º dia pós-inoculação e mais três até o 7º dia. No entanto, foram descartados 25 animais (31,2%) que não apresentaram qualquer sintoma e permaneceram sadios por seis semanas. Dos 16 cérebros colhidos, seis apresentavam aspecto gelatinoso e foram descartados. Na 2ª passagem, dos 40 camundongos inoculados nenhum morreu. Permaneceram sadios por seis semanas e foram descartados. Paralelamente, 20 camundongos foram inoculados com a mesma suspensão preparada sem adição de antibióticos e 100% dos animais morreram entre o 1º e o 2º dia pós-inoculação, indicando alto grau de contaminação. O teste de IFD apresentou resultado negativo para raiva. Portanto, não foi possível utilizar esta amostra na sequência do experimento.

1.4 Amostra 1018/2006

Na 1ª passagem, os camundongos inoculados com esta amostra apresentaram baixo índice de mortalidade inicial. Dos 80 camundongos inoculados, três (3,7%) foram descartados nos dois primeiros dias. Dos 77 restantes, apenas 10 adoeceram, apresentando poucos sinais característicos de raiva, o que sugeriu baixa concentração de vírus na amostra. No 13º dia pós-inoculação, estes 10 animais apresentaram somente encurvamento dorsal e pêlos arrepiados. No 14º dia estavam prostrados e foram sacrificados para colheita dos cérebros. Os 67 que permaneceram sadios foram observados por seis semanas e, então, descartados. Na 2ª passagem, de 70 camundongos inoculados, quatro (5,7%) foram inicialmente descartados e os demais apresentaram paralisia e prostração do 8º ao 10º dia pós-inoculação e, portanto, tiveram os cérebros aproveitados. O teste de IFD confirmou a positividade para a raiva.

2. Titulação viral

As suspensões virais obtidas após duas passagens em camundongos foram tituladas em triplicata para a obtenção do título médio. A média obtida na titulação viral ($DL_{50}/0,03mL$) das amostras 616/2002, 2156/2005 e 1018/2006, foi de $10^{4,83}$, $10^{4,50}$ e $10^{5,17}$, respectivamente.

O título do CVS, após o cálculo da média de dez titulações realizadas na rotina de testes NIH do Lanagro/SP, foi estabelecido em $10^{7,0} DL_{50}/0,03mL$.

3. Testes de potência NIH

Os testes NIH foram realizados em duplicatas numeradas (1, 2 e 3) e subdivididas em “A”, para os desafios realizados com CVS, e “B”, para os desafios realizados com as amostras de vírus de campo. Os dados obtidos nos testes de potência NIH em cada diluição da vacina de referência e vacina teste, de acordo com a amostra utilizada, estão nas tabelas 1 e 2. Os dados obtidos nos testes de potência NIH, referentes aos resultados dos títulos virais, potência da vacina e doses efetivas dos vírus e da vacina de referência e vacina teste, de acordo com a amostra utilizada, estão na tabela 3.

Tabela 1. Resultados obtidos nos testes de potência NIH, em valores absolutos e percentuais de camundongos sobreviventes por inoculados, em cada diluição da vacina de referência (VRN), de acordo com a amostra viral utilizada no desafio

TESTE	Amostra Viral	VRN 1:5	VRN 1:25	VRN 1:125	VRN 1:625
1-A	CVS	16/18 (89%)	10/18 (56%)	7/18 (39%)	3/18 (17%)
1-B	616/2002	14/18 (78%)	9/18 (50%)	4/18 (22%)	1/18 (6%)
2-A	CVS	15/18 (83%)	12/17 (71%)	9/18 (50%)	2/18 (11%)
2-B	2156/2005	16/18 (89%)	12/17 (71%)	8/17 (29%)	3/18 (11%)
3-A	CVS	18/18 (100%)	17/18 (94%)	10/18 (56%)	2/17 (12%)
3-B	1018/2006	16/18 (89%)	11/18 (61%)	4/18 (22%)	0/18 (0%)

Tabela 2. Resultados obtidos nos testes de potência NIH, em valores absolutos e percentuais de camundongos sobreviventes por camundongos inoculados, em cada diluição da vacina teste (VT), de acordo com a amostra viral utilizada no desafio

TESTE	Amostra Viral	VT 1:5	VT 1:25	VT 1:125	VT 1:625
1-A	CVS*	17/18 (94%)	13/18 (72%)	6/18 (33%)	2/18 (11%)
1-B	616/2002	17/18 (94%)	14/18 (78%)	7/18 (39%)	3/18 (5%)
2-A	CVS	18/18 (100%)	10/18 (56%)	5/18 (28%)	2/18 (11%)
2-B	2156/2005	18/18 (100%)	12/17 (71%)	5/17 (29%)	2/18 (11%)
3-A	CVS	18/18 (100%)	17/18 (94%)	7/18 (39%)	2/18 (11%)
3-B	1018/2006	17/18 (94%)	15/18 (83%)	6/16 (38%)	1/18 (6%)

*CVS = "Challenge Virus Standard" (Vírus Padrão de Desafio)

Tabela 3. Resultados dos títulos e doses efetivas (DE) virais, potências da vacina teste e doses efetivas das vacinas teste (VT) e de referência (VRN), de acordo com a amostra de vírus utilizada, obtidos nos testes de potência NIH

TESTE	Título (Vírus)	DE (Vírus)	Potência VT UI/dose	DE ₅₀ (VT)	DE ₅₀ (VRN)
1-A (CVS)*	10 ^{7,2}	50 DL ₅₀	7,62	68,07	56,61
1-B (616/2002)	10 ^{4,92}	40 DL ₅₀	22,72	91,25	24,77
2-A (CVS)	10 ^{7,1}	40 DL ₅₀	4,70	53,55	72,31
2-B (2156/2005)	10 ^{4,5}	32 DL ₅₀	5,42	70,43	85,54
3-A (CVS)	10 ^{7,1}	40 DL ₅₀	4,84	118,67	152,88
3-B (1018/2006)	10 ^{5,1}	25 DL ₅₀	13,84	76,92	34,67

*CVS = "Challenge Virus Standard" (Vírus Padrão de Desafio)

3.1 Teste 1-A (vacina X CVS)

Neste teste a vacina de referência e a vacina teste foram desafiadas com CVS. Na titulação concomitante ao teste, o valor obtido para o CVS foi de $10^{7,2}$, que correspondeu a uma dose efetiva inoculada de 50 DL₅₀. Na análise de probito, a potência relativa obtida para a vacina teste foi de 7,62UI/dose, e a DE₅₀ foi 68,07. A DE₅₀ da vacina de referência foi 56,61(tabela 3). Os parâmetros exigidos para validação do teste, de sobrevivência maior que 70% na primeira diluição e menor que 30% na última, foram observados tanto para a vacina teste quanto para a vacina de referência (tabelas 1 e 2).

3.2 Teste 1-B (vacina X amostra 616/2002)

Neste teste a vacina de referência e a vacina teste foram desafiadas com a amostra de vírus 616/2002. Na titulação concomitante ao teste, o valor obtido para esta amostra de vírus foi de $10^{4,9}$, que correspondeu a uma dose efetiva inoculada de 40DL₅₀. Na análise de probito, a potência relativa obtida para a vacina foi de 22,72UI/dose, e a DE₅₀ foi 91,25. A DE₅₀ da VRN foi 24,77 (tabela 3). Os parâmetros exigidos para validação do teste, de sobrevivência maior que 70% na primeira diluição e menor que 30% na última, foram observados tanto para a vacina teste quanto para a vacina de referência (tabelas 1 e 2).

3.3 Teste 2-A (vacina X CVS)

Neste teste a vacina de referência e a vacina teste foram desafiadas com CVS. Na titulação concomitante ao teste, o valor obtido para o CVS foi de $10^{7,1}$, que correspondeu a uma dose efetiva inoculada de 40 DL₅₀. Na análise de probito, a potência relativa obtida para a vacina foi de 4,70 UI/dose, e a DE₅₀ foi 53,55. A DE₅₀ da VRN foi 72,31(tabela 3). Os parâmetros exigidos para validação do teste, de sobrevivência maior que 70% na primeira diluição e menor que 30% na última, foram observados tanto para a vacina teste quanto para a vacina de referência (tabelas 1 e 2).

3.4 Teste 2-B (vacina X amostra 2156/2005)

Neste teste a vacina de referência e a vacina teste foram desafiadas com a amostra de vírus 2156/2005. Na titulação concomitante ao teste, o valor obtido para esta amostra de vírus foi de $10^{4,5}$, que correspondeu a uma dose efetiva inoculada de 32 DL₅₀. Na análise de probito, a potência relativa obtida para a vacina foi de 5,42UI/dose, e a DE₅₀ foi 70,43. A DE₅₀ da VRN foi 85,54 (tabela 3). Os parâmetros exigidos para validação do teste, de sobrevivência maior que 70% na primeira diluição e menor que 30% na última, foram observados tanto para a vacina teste quanto para a vacina de referência (tabelas 1 e 2).

3.5 Teste 3-A (vacina X CVS)

Neste teste a vacina de referência e a vacina teste foram desafiadas com CVS. Na titulação concomitante ao teste, o valor obtido para o CVS foi de $10^{7,1}$, que correspondeu a uma dose efetiva inoculada de 40 DL₅₀. Na análise de probito, a potência relativa obtida para a vacina foi de 4,84 UI/dose, e a DE₅₀ foi 118,67. A DE₅₀ da VRN foi 152,88 (tabela 3). Os parâmetros exigidos para validação do teste, de sobrevivência maior que 70% na primeira diluição e menor que 30% na última, foram observados tanto para a vacina teste quanto para a vacina de referência (tabelas 1 e 2).

3.6 Teste 3-B (vacina X amostra 1018/2006)

Neste teste a vacina de referência e a vacina teste foram desafiadas com a amostra de vírus 1018/2006. Na titulação concomitante ao teste, o valor obtido para esta amostra de vírus foi de $10^{5,1}$, que correspondeu a uma dose efetiva inoculada de 25 DL₅₀. Na análise de probito, a potência relativa obtida para a vacina foi de 13,84UI/dose, e a DE₅₀ foi 76,92. A DE₅₀ da VRN foi 34,67 (tabela 3). Os parâmetros exigidos para validação do teste, de sobrevivência maior que 70% na primeira diluição e menor que 30% na última, foram observados tanto para a vacina teste quanto para a vacina de referência (tabelas 1 e 2).

4. Comparação da potência relativa entre os testes com VC e com CVS

Houve semelhança entre os valores da potência relativa obtidos no teste NIH com o CVS em comparação com a amostra 2156/2005 (teste 2). O mesmo não ocorreu com a comparação entre o CVS e as amostras 616/2002 e 1018/2006 (testes 1 e 3). Quando comparado somente os valores relativos ao CVS nos três testes, percebe-se que houve semelhança, o que ocorreu também entre as amostras 616/2002 e 1018/2006.

Na figura 4 estão representados os valores da potência relativa e limites fiduciais obtidos nos testes 1, 2 e 3.

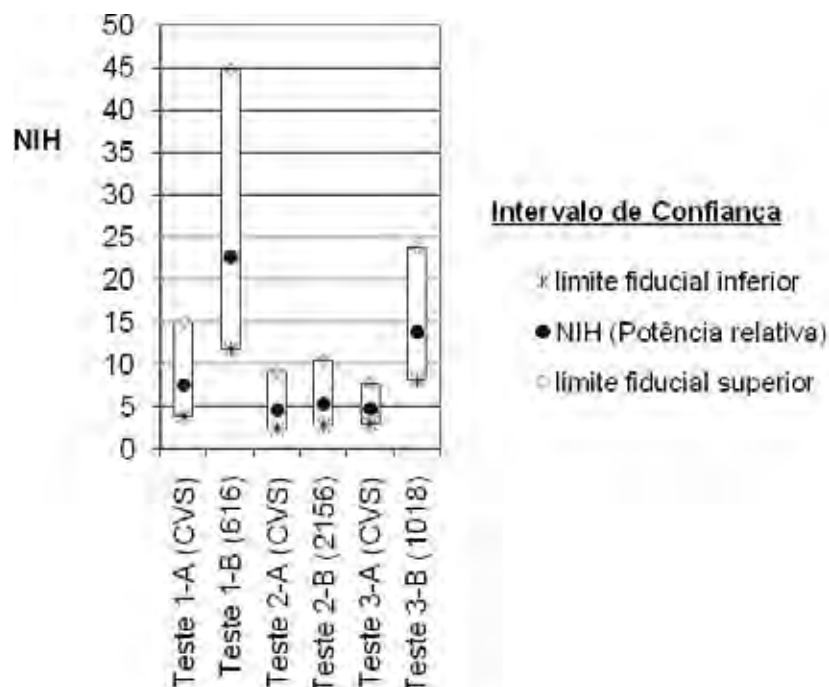


Figura 4. Valores da potência relativa e limites fiduciais dos testes de vacinas contra a raiva, realizados frente a desafios com CVS e com os vírus de campo 616/2002, 2156/2005 e 1018/2006

5. Árvore filogenética

Até o momento, foi enviado pelo Laboratório Central de Diagnóstico do “College of Bioresource Sciences”, da Universidade de Nihon, Japão, a árvore filogenética com resultado parcial, contendo apenas a amostra 616/2002. Esta amostra foi classificada como vírus da raiva relacionado ao morcego hematófago. A figura 4 corresponde à parte da árvore filogenética baseada no gene N (100-998bp), sendo as posições dos nucleotídeos numeradas de acordo com a sequência da amostra PV (Gene bank; Accession No. M13215).

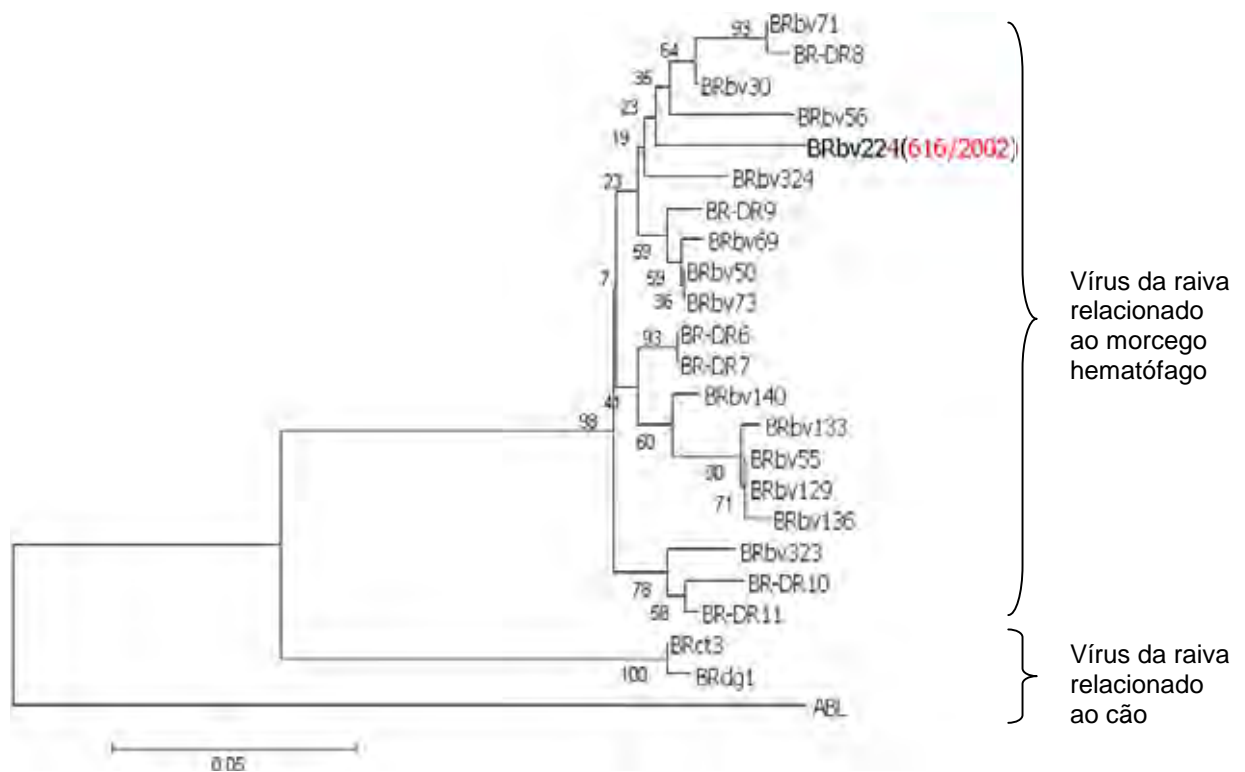


Figura 5. Árvore filogenética baseada no gene N (100-998bp), contendo a amostra de campo 616/2002 (elaborada no Laboratório Central de Diagnóstico do “College of Bioresource Sciences”, da Universidade de Nihon, Japão, 2009)

VI. DISCUSSÃO

Ao realizar a primeira passagem das amostras de vírus de campo em camundongos, os sinais característicos de raiva foram fracos ou ausentes. O alto índice de animais que morreram até quatro dias pós-inoculação indicou a possibilidade de haver elevada contaminação nas amostras 616/2002 e 774/2006. Nesta última, a provável contaminação poderia estar aliada ao fato de ser uma amostra proveniente de equino, com baixa concentração de vírus, o que explicaria a dificuldade em obter uma suspensão viral, na primeira passagem, com concentração suficiente para manifestar a doença na segunda passagem, motivo da inviabilização dessa amostra para uso no experimento. Na segunda passagem das três amostras de vírus restantes, todas provenientes de bovinos, os sinais clínicos se acentuaram, o que pode ser entendido como adaptação dos vírus aos camundongos, diminuição da contaminação e aumento da concentração viral. Os resultados das titulações dessas amostras também apontaram nesta direção.

O teste NIH demonstrou repetibilidade. Além disso, a realização dos testes de potência NIH em duplicata, com desafios paralelos com CVS e vírus de campo, permitiu comparar o comportamento das amostras de vírus de campo a um padrão. Na comparação da relação de sobreviventes por inoculados em cada diluição da vacina teste e da vacina de referência, não ficaram evidentes diferenças de virulência entre as amostras, nem no índice de proteção da vacina. Porém, na comparação das potências relativas foram evidenciados valores maiores quando o desafio foi feito com as amostras de vírus de campo. Entretanto, não se pode afirmar que a vacina seja eficaz contra essas estirpes na espécie alvo, mas pode-se afirmar que não houve indícios de que a vacina poderia induzir proteção insuficiente contra as amostras virais estudadas. Um fator limitante foi que os testes foram realizados em duplicata, porém não foram realizadas repetições das duplicatas para se obter maior consistência nos resultados da análise estatística.

A virulência das amostras de vírus de campo utilizadas não foi maior que a virulência do CVS, em camundongos, como foi possível observar pela comparação da relação de sobreviventes por inoculados. Este resultado está dentro do esperado, pois a estirpe CVS é adaptada a camundongos. Entretanto, a pesquisa de possíveis

variantes de alta virulência é uma das razões de estudos como este, que buscam causas para falhas vacinais.

A potência relativa da vacina frente aos três desafios com amostras de vírus de campo foi sempre maior que a potência com o desafio paralelo com CVS, corroborando a indicação do uso do CVS no teste NIH, pela qualidade do desafio que impõe à vacina testada, e concordando com conclusões de outros autores que defendem que as vacinas utilizadas atualmente são eficazes na proteção contra as diferentes variantes (FEKADU et al., 1988; LODMELL et al., 1995; BERNARDI et al., 2005a). Porém, é importante destacar que as vacinas continuam a ser preparadas a partir de estirpes clássicas, apesar dos conhecimentos atuais sobre a ocorrência de diferentes estirpes de vírus. Portanto, é fundamental na prevenção da infecção rábica a pesquisa da ocorrência de diferentes estirpes e o conhecimento das suas características, bem como sobre a eficácia das vacinas frente a essas estirpes (GERMANO et al., 1990).

Outro fator limitante ao presente estudo foi que apenas uma das três amostras de vírus de campo utilizadas teve sua classificação filogenético realizada a tempo de ser incluída no trabalho, não sendo possível relacionar a variante viral com o índice de proteção da vacina. Apesar de identificada como variante relacionada ao morcego hematófago e de ter resultado na maior potência relativa da vacina quando utilizada no desafio viral no teste NIH, quando comparada às outras amostras de vírus de campo e ao CVS, não se pode inferir que a vacina é eficaz contra essa variante, pois, para isso, é necessário realizar repetições do teste e estudos de eficácia na espécie alvo da vacina (herbívoros). Como houve semelhança estatística entre os valores da potência relativa da vacina quando o desafio foi feito com as amostras 606/2002 e 1018/2006, é de se esperar que pertençam a uma mesma variante. Do mesmo modo, seria interessante verificar se a variante da amostra 2156/2005 está localizada próxima ao CVS, na árvore filogenética, por ter apresentado semelhança estatística no teste de potência da vacina.

A existência de numerosas espécies, distribuídas amplamente no território brasileiro, torna a história natural da raiva, especialmente em morcegos, uma questão ainda a esclarecer, assim como a manutenção de variantes do vírus da raiva em determinadas espécies de morcegos insetívoros permitindo a transposição para outras

espécies animais (“spill-over”) (ROMIJN, 2003). KOBAYASHI et al. (2006), realizaram análise filogenética de 1335 nucleotídeos do gene N, da posição 89-1423, em 19 amostras brasileiras de vírus da raiva, comparadas com o vírus Mokola, o que revelou a existência de variante canina, variante de morcegos insetívoros (com subdivisão em variantes 1, 2 e 3), e variante de morcego hematófago. Considerando o grande número de espécies de morcegos existentes no Brasil, é provável que existam variantes do vírus rábico ainda desconhecidas, o que fortalece a necessidade de estudos continuados a respeito da eficácia das vacinas existentes.

A transmissão do vírus relacionado a morcegos hematófagos parece ser mais prevalente em regiões de baixas altitudes e são limitadas pela distribuição de cadeias de montanhas (KOBAYASHI et al., 2008). Esses autores conduziram análises filogenéticas e geográficas utilizando dados de sequenciamento de 570 isolados de vírus rábico de bovinos oriundos de uma vasta área do Brasil, obtidos entre os anos 1987 e 2006. As variantes genéticas foram plotadas em mapas topográficos do País, sendo que a maioria das amostras analisadas no estudo foi isolada de áreas adjacentes ligadas por rios. O estudo revelou a existência de dezenas de variantes regionais associadas aos morcegos hematófagos, cujos padrões de distribuição foram afetados por montanhas e rios. Os resultados sugeriram que as características epidemiológicas da raiva transmitida por morcegos hematófagos no Brasil parecem estar associadas com as características geográficas e topográficas das áreas nas quais os rebanhos são mantidos, e com fatores que afetam a ecologia dos morcegos. Ressaltam os autores que o conhecimento sobre as características epidemiológicas da raiva transmitida por morcegos hematófagos é muito importante para avaliar a eficácia das medidas de controle contra a transmissão da raiva por morcegos, e que fatores geográficos e topográficos devem ser levados em conta no planejamento de ações que visem a mitigação do problema.

A área a que se refere o estudo acima inclui os Estados de Goiás e Mato Grosso, inclusive os municípios dos quais foram originadas as amostras utilizadas no presente trabalho. Portanto, é de se esperar que a análise filogenética das outras duas amostras seja compatível com o resultado anterior.

É importante destacar que todos os isolados estudados até o momento, no Brasil, pertencem ao genótipo I, portanto, controláveis pela vacinação.

Quanto à queixa dos pecuaristas relativa ao adoecimento de animais vacinados contra a raiva, pode não ter fundamento. Vale ressaltar que falhas vacinais podem ocorrer por razões intrínsecas e extrínsecas à vacina. Como já alertou KOTAIT et al. (1998), no momento da vacinação o animal deve estar hígido para que outros processos metabólicos e patológicos não interfiram na resposta imunológica. Os cuidados na vacinação devem incluir a via de aplicação correta, dose adequada, tipo de vacina e, principalmente, conservação do produto, desde a origem até o momento da vacinação, observando-se a manutenção do resfriamento entre 2°C e 8°C. O congelamento também afeta a qualidade das vacinas (ALBAS et al., 2001).

VII. CONCLUSÕES

A vacina comercial testada foi eficaz, em camundongos, frente ao desafio com as três amostras de campo do vírus da raiva utilizados.

Não houve diferença estatística no grau de proteção conferido pela vacina testada quando comparados os desafios com amostras de vírus de campo aos desafios utilizando o vírus padrão.

Houve semelhança na porcentagem de camundongos sobreviventes por inoculados em todos os desafios, tanto com amostras de vírus de campo quanto com CVS, o que pode indicar que a virulência das amostras testadas não foi maior que a virulência do CVS em camundongos.

O teste NIH apresentou repetibilidade em condições padronizadas.

A potência relativa da vacina frente aos desafios com CVS foi sempre menor que a potência com os desafios paralelos com as amostras de vírus de campo, o que pode indicar que o rigor do desafio padrão é adequado para a avaliação da potência pelo teste NIH e, portanto, para o controle da qualidade de vacinas contra a raiva. Assim, pode-se inferir que as vacinas liberadas para uso são eficazes, e que o fato de animais vacinados contraírem a raiva pode ser explicado por outras falhas no processo de imunização, especialmente a conservação das vacinas desde a fabricação até o momento da aplicação, o manejo do rebanho e a conversão imunológica individual.

Ressalta-se a grande importância da continuidade dos estudos genéticos para se conhecer as variantes virais que circulam na rica fauna do Brasil, e o seu comportamento, sobretudo em relação à eficácia das vacinas utilizadas.

VIII. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; MÁLAGA-ALBA, M. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: GREENHALL, A.M.; SCHMIDT, U. (Ed.). **Natural history of vampire bats**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 208-213.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles communes al hombre y a los animales**. 2 ed. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud, 1986, p.502-526.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles communes 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.

ALBAS, A.; NOGUEIRA, R.M.B.; FONTOLAN, O.L.; ALBAS, K.S.; BREMER NETO, H. Efeito do congelamento sobre imunogenicidade da vacina contra a raiva produzida em tecido cerebral de camundongo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v.34, n.1, p.49-52, 2001.

ALVES, L.M.; SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; RICHTZENHAIN, J.; ITO, F.H. Pathogenesis of rabies vírus by ERA and PV strain administered orally in hamsters (*M. auratus*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v.40, n.1, p.79-84, 2003.

ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y; BOTVINKIN, A. D. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrghyzstan. **Emerging Infectious Disease**. v.9 (3), p.333-337, 2003.

ARITA, G.M.M. **Estudo comparativo entre testes de controle de qualidade de vacinas anti-rábicas inativadas para uso animal e produção experimental da vacina de referência nacional**. 2002. 133 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

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.

AUBERT, M.F.A. Methods for the calculation of titres. In: ____ **Laboratory techniques in rabies**. Meslin, F.-X.; Kaplan, M.M.; Koprowski, H. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. Appendix 3, p. 445-459.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, p.3268-3276, 2001.

BAER, G.M.; CLEARY, W.F. A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. **J. Infect. Dis.**, v.125, p.520-527, 1972.

BAER, G.M. Rabies virus. In: Fields, B.N. et al. **Virology**. New York: Raven, 1985, p.1133-56.

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

BAER, G.M. Evolution of an animal rabies vaccine by use of two types of potency tests. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.8, p.837-840, 1997.

BARTH, R.; DIDERRICH, G.; WEINMANN, E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccines. **Vaccine**, v. 6, p. 369-377, 1988.

BERAN, G.W.; CROWLEY, A.J. Toward worldwide rabies control. **WHO Chronicle**, v.37, p. 192-196, 1983.

BERNARDI, F.; GOMES, A.A.B.; ITO, F.H.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M.; HEINEMANN, M.B.; CORTEZ, A.; SAKAMOTO, S.M.; MAIORKA, P.C. Biological and immunological studies of five Brazilian rabies virus isolates. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.42, p. 307-312, 2005a.

BERNARDI, F.; NADIN-DAVIS, S.A.; WANDELER, A.I.; ARMSTRONG, J.; GOMES, A.A.B.; LIMA, F.S.; NOGUEIRA, F.R.B.; ITO, F.H. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. **Journal of General Virology**, v.86, p. 3153-3162, 2005b.

BIER, O.G.; MOTA, I.; SILVA, W.D.; VAZ, N.M.A. Mecanismo da reatividade imunológica. p. 72-99. In: ____ **Imunologia Básica e Aplicada**. (Guanabara Koogan, ed.), 3ª ed. Rio de Janeiro, 1982, 465p.

BLANCOU, J. La vaccination antirabique des animaux domestiques. In: ____ **Colloque International – Institut Pasteur de Paris. Vaccins et Vaccinations** (Éditions Scientifiques Elsevier, ed.), p. 167-174. Paris, 1986, 441p.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity os *Lyssavirus* genus. **Virology**. v.194, p.70-81, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da Raiva dos Herbívoros**. Manual Técnico, p. 31-33, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros** – Controle da Raiva dos Herbívoros – Manual Técnico – 2005, cap.1-3. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 18 de junho de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica – Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos, cap. 5.26. Disponível em <<http://funasa.gov.br>> Acesso em: 18 de março de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota técnica 02/04/2004**. Disponível em <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em 20 de junho de 2007.

BRASS, D. A. Rabies and rabies-related viruses of Africa. In_____ **Rabies in bats. Natural history and public health implications.** Connecticut: Livia Press, p.263-273, 1994.

CARNEIRO, D. V. M. Transmission of rabies by bats in Latin America. **Bulletin of World Health Organization.** 10. Geneva, p. 775-780, 1954.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Imported human rabies - France, 1992. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.41, n.51, p.953-955, 1992.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Human rabies prevention – United States, 1999: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practice (ACIP). **MMWR**, v.48, n.RR-1, p.1-21, 1999.

CHARLTON, K.M. The pathogenesis of rabies. In: _____ **Rabies.** Campbell J.B. & Charlton K.M. (Eds.). Boston: Kluwer Academic Publishers, p.101-150, 1988.

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

COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Portaria CDA 24 de 25 de setembro de 2001.** Disponível em < <http://www.cda.gov.sp.br> >. Acesso em 25 de abril de 2007.

CORDEIRO, C.C.; SILVA, E.V.; MIGUEL, O.; GERMANO, P.M.L. Avaliação da vacina anti-rábica ERA frente a variantes antigênicas do vírus da raiva em diferentes períodos pós-imunização. **Rev. Saúde Pública.** São Paulo, v.24, n.6, p.512-17, 1990.

CORTES, J.A.; RWEYEMAMU, M.M.; ITO, F.H.; UMEHARA, O.; NETO, R.M.; NETO, D.L.; BALTAZAR, M.C.; VASCONCELOS, S.A.; VASCONCELOS, M.E.P. Immune response in cattle induced by inactivated rabies vaccine adjuvanted with aluminium hydroxide either alone or in combination with avidine. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** v. 12, n.3, p.941-55, 1993.

COSTA W.A.; ÁVILA, C.A.; VALENTINE, E.J.G.; REICHMANN, M.L.A.B.; CUNHA, R.S.; GUIDOLIN, R.; PANACHÃO, M.R.I.; OMOTO, T.M.; BOLZAN, V.L. Profilaxia da raiva humana. In: ____ **2ª ed. São Paulo, Instituto Pasteur**, 2000 (Manuais, 4). 33p.

COUNCIL OF EUROPE. **The probit method**. In: European Pharmacopoeia, 4th Edition, Cap. 4, p. 437-439, 2002.

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. **Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos. Avaliação da patogenicidade e proteção cruzada em camundongos**. 2006. 75f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: ____ **Laboratory techniques in rabies**. Meslin, F.-X.; Kaplan, M.M.; Koprowisk, H. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 7, p. 88-95.

DELPIETRO, H. A.; GURY-DHOMEN, F; LARGHI, O.P.; MENA-SEGURA, C.; ABRAMO, L. Monoclonal antibody characterization of rabies vírus strains isolated in the River Plate Basin. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v.44, p.477-483, 1977.

DIAZ, A.M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A. & SMITH, J. S. Antigenic analysis of rabies virus isolates from Latin America and Caribbean. **Zentralblatt für Veterinärmedizin B**, 1994, 41, p.153-160.

DIAZ, A.M. Suckling-mouse brain vaccine. In:____ **Laboratory techniques in rabies**. Meslin, F.-X.; Kaplan, M.M.; Koprowisk, H. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 21, p. 243-50.

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.

DREESEN, D.W. A global review of rabies vaccines for human use. **Vaccine**, v. 15, p. 2-6, 1997.

ERBOLATO, E.B.; SILVA, E.V.; MIGUEL, O.; SUREAU, P.; GERMANO, P.M.L. Eficácia da vacina anti-rábica ERA em camundongos frente a quatro diferentes variantes antigênicas do vírus da raiva. **Rev. de Saúde Pública**. São Paulo, v.23, n.6, p.447-54, 1989.

ESPESETH, D.A. Production of veterinary vaccines. In: _____ **OIE Manual Office Internatioal of Epizootie**. p. 1-10, 1996.

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

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**, 2002, v. 44, n. 2, p. 91-95.

FEKADU, M.; SHADDOCK, D.W.; SANDERLIN, J.S.; SMITH, J.S. Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage vírus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies and rabies related viruses. **Vaccine**, vol. 6, p. 533-539, 1988.

FENNER, R.; BACHMANN, P.A.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. **Virologia Veterinária**, Zaragoza, Acribia, 1992. p.551-556.

FISHBEIN, D.B. Rabies in humans. In: BAER, G.M. (Ed.). **The natural history of rabies**, 2nd Ed. Florida: CRC Press, 1991. p.520-549.

FRASER, G.C.; HOOPER, P.T.; LUNT, R.A.; Gould, A.R.; GLEESON, L.J.; HYATT, A.D.; RUSSEL, G.M.; KATTENBELT, J.A. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. **Emerging Infect. Dis.**, n. 2, v. 4, p. 327-31, 1996.

FUENZALIDA, E.L.; PALÁCIOS, R.V.H. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirrábica. **Bol. Inst. Bact. Chile**, v. 8, p. 3-10, 1955.

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M.M.; SILVA, E.V. Avaliação de três cepas do vírus rábico, antigenicamente distintas, em camundongos. II-Estudo da disseminação viral por diferentes órgãos. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v.22, n.6, p.473-78, 1988.

GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V.; MIGUEL, O.; PRETO, A.A.; CORDEIRO, C.F. Avaliação em camundongos da vacinas anti-rábicas inativadas frente a variantes antigênicas do vírus rábico. **Arq. Biol. Tecnol.** v. 33, n.3, p.551-60, 1990.

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

GONÇALVES, J.L.S.; VON HUBINGER, M.G.; WERMELINGER, M.C.M.W. Vírus da raiva. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à virologia humana**, Guanabara Koogan, 1ª ed., p.157-164, 2002.

HABEL, K. Prueba de potencia de Habel. In _____ **La Rabia – tecnicas de laboratório**. Kaplan, M.M.; Koprowisk, H. (Ed.). 3ª ed. Geneva: Organizacion Mundial de la Salud (OMS Série de monografias nº 23), 1976. cap. 31, p. 290-291.

HATSHBACH, P. I.: Aspectos Históricos da Raiva Animal e Humana. **A Hora Veterinária**. Ano 9, n. 52, nov-dez, 1989.

HAYASHI, Y.; MORA, E.; CHANDELIER, E.L.; MONTANO, J.A.; OHIO, M. Estudos de proteção cruzada de 24 cepas de vírus rábico isoladas de diferentes espécies animais do Brasil. **Arq. Biol. Tecnol**, n. 27, p. 27-35, 1984.

ITO, M.; ARAI, Y. T.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Genetic characterization and geographical distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v.284, p.214-222, 2001.

JACKSON, A.C. Rabies virus infection: an update. **Jornal of Neurovirology**, v.9, p.253-258, 2003.

JACOB, Y.; BADRANE, H.; CECCALDI, P.E.; TORDO, N. Cytoplasmic Dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. **Journal of Virology**, v. 74, p.10217-10222, 2000.

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

KING, A.A. Studies on the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. 1991. 371f. PhD Tese. University of Surrey, Guildford, UK, 1991.

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

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E. M. S.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **J. Vet. Med. Sci**, v. 67, n. 7: 647-52, 2005.

KOBAYASHI, Y.; OGAWA, A.; SATO, G.; SATO, T.; ITOU, T.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. **Journal of Vet. Med. Sci.**, v. 68, p. 1097-1100, 2006.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; MOCHIZUKI, N.; HIRANO, S.; ITOU, T.; CARVALHO, A.A.B.; ALBAS, A.; SANTOS, H.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC Veterinary Research** (on line journal). v. 4, art. 44, 2008.

doi: 10.1186/1746-6148-4-44 , < <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/4/44>>

KOPROWISK, H. The mouse inoculation test. In: ____ **Laboratory techniques in rabies**. Meslin, F.-X.; Kaplan, M.M.; Koprowisk, H. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 6, p. 80-87.

KOPROWISK, H.; YUSIBOV, V. The green revolution: plants as heterologous expression factors. **Vaccine**, v. 19, p. 2735-2741, 2001.

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

KOTAIT, I.; GONÇALVES, C.A.; PERES, N.F.; SOUZA, M.C.A.M.; TARQUETA, M.C. Controle da Raiva dos Herbívoros. In: ____ 1^a ed. **São Paulo, Instituto Pasteur**, 1998 (Manuais,1).15p.

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

LODMEL, D.L.; SMITH, J.S.; ESPOSITO, J.J.; EWALT, L.C. Cross-protection of mice against a global spectrum of rabies virus variants. **Journal of Virology**, v. 69, p. 4957-4962, 1995.

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.

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

MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M.M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: ____ **Laboratory techniques in rabies**. Meslin, F.-X.; Kaplan, M.M.; Koprowisk, H. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996a. cap. 2, p. 9-27.

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: ____ **Laboratory techniques in rabies**. Meslin, F.-X.; Kaplan, M.M.; Koprowisk, H. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996b. cap. 19, p. 223-233.

MORAIS, N.B.; ROLIM, B.N.; CHAVES, H.H.M.; BRITO-NETO, J.; SILVA, L.M. Rabies in tamarins (*Callithrix jacchus*) in the state of Ceará, Brazil, a distinct viral variant? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p. 609-610, 2000.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLOR, M.A. Rhabdovirus p.405-08. In: ____ **Microbiologia Médica**. (Editora Guanabara Koogan), 3 ed. Rio de Janeiro, 2000, 604p.

NILSSON, M. R. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. **Boletim Oficina Sanitária Panamericana**, v. 68, p. 486-494, 1970.

NOGUEIRA, V. Programa Estadual de Controle da Raiva dos Herbívoros. In: ____ SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. p. 30-31.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Boletín de vigilancia epidemiológica de la rabia em las Américas**, v. 34, 2002. 40p.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Eliminación de la rabia humana transmitida por perros em América Latina: Análise de la situación**. Washington, D.C. OPS, 2005. 73p.

QUEIROZ LIMA, E. A transmissão da raiva bovina pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*. **Brasil Médico**, 48: 38-40, 1934.

REAGAN, K.J.; WUNNER, W.H. Rabies vírus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor: brief report. **Archives of virology**, v.84, p.277-282, 1985.

ROMIJN, P.C.; VAN DER HEIDE, R; CATTANEO, C.A.; SILVA, R. C.; VAN DER POEL, W.H. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the State of Rio De Janeiro, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, p. 81-86, 2003.

ROSNER, F. Rabies in Talmud. **Med. Hist.**, v. 18, p. 198-200, 1974.

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

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

SCHATZMAYR, H.G. Use of plants as vectors for production of biomedical products. **Virus Reviews & Research**, v. 7, p. 21-27, 2002.

SATO, G; ITOU, T.; SHOJI, MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 66, p. 747-753, 2004

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, L. G. Spread of virus within the central nervous system. In: BAER, G.M. **The Natural History of Rabies**. 2nd ed. Boca Raton, USA. RCR Press, p.199-216, 1991.

SHOPE, R. E.; MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K.; CAUSEY, O. R.; KEMP, G. E.; SIMPSON, D. I.; MOORE, D. L. Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus. **Journal of Virology**, v. 6, p. 690-692, 1970.

SILVA, R.A.; CUNHA, R.G. Vacinas anti-rábicas com hidróxido de alumínio e provas para controle de sua eficiência. **Rev. Brasil. Biol.** v. 33, n. 1, p. 127-34, 1973.

SILVA, R.A.; SOUZA, A.M.; PASSOS, J.J. A pesquisa do vírus rábico em morcegos no Brasil. **Veterinária.** Rio de Janeiro, 20:105-114, 1967.

SIZARET, P. General considerations in testing the safety and potency of rabies vaccines. In: ____ **Laboratory techniques in rabies.** Meslin, F.-X.; Kaplan, M.M.; Koprowisk, H. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 36, p. 355-359.

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

SMITH, J.S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis and prevention of the disease in the United States. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 9, p. 166-176, 1996.

STEELE, J.H. History of rabies. In: ____ BAER, G.M. **The natural history of rabies.** New York: Academic Press, 1975. p. 1-28.

THOULOZE, M.I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7181-7190, 1998.

TIZAR, I. Apreensão e processamento de material estranho. p. 14-27. In: ____ **Introdução a Imunologia Veterinária.** (Roca, ed.). 3^a ed. São Paulo, 2000, 329p.

TUFFEREAU, C.; BENEJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A. Low affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies vírus. **EMBO Journal**, v. 17, p. 7250-7259, 1998.

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**. Ed. Academic Press. p. 563-583, 2000.

VAZ, J.A.M.C. **Avaliação oficial da eficácia de vacinas anti-rábicas para uso animal de origens e procedências diferentes**. 1999. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

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

WILBUR, L.A.; AUBERT, M.F.A. The NIH test for potency. In: ____ **Laboratory techniques in rabies**. Meslin, F.-X.; Kaplan, M.M.; Koprowisk, H. (Ed.). 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 37, p. 360-368.

WILDE, H.; HEMACHUDHA, T.; JACKSON, A.C. View point: management of human rabies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, doi: 10.1016/j.trstmh, 2008.

WILLOUGHBY, R.E.; TIEVES, K.S.; HOFFMAN, G.M.; GHASSAYEM, N.S.; AMLIELEFOND, C.M.; SCWABE, M.J.; CHUSID, M.J.; RUPPRECHT, C.E. Survival after treatment of rabies with induction of coma. **New England Journal of Medicine**, v. 35, p. 2508-2514, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO Expert Committee on Rabies. **8th Report**. (WHO- Technical Report Series, 824). Geneva, 1992a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO Expert Committee on Biological Standardization, **Forty-second report** (WHO – Technical Report Series, 822), p. 8-9. Geneva, 1992b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **Rabies**. 2008. Disponível em: <http://who.int/rabies/epidemiology/en/>. Acesso em 21 de abril de 2008.

WUNDERLI, P.S.; SHADDOCK, J.H.; SCHMID, D.S.; MILLER, T.J.; BAER, G.M. The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccines. **Vaccine**, vol. 9, p. 638-642, 1991.

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

ZANETTI, C.R.; FRANCO, M.T.; VASSÃO, R.C.; PEREIRA, C.A.; PEREIRA, O.A.C. Failure of protection induced by a Brazilian vaccine against Brazilian wild rabies viruses. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1745-1756, 1998.