

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE RT-PCR E
INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS
PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA EM
AMOSTRAS MANTIDAS POR LONGOS PERÍODOS EM
DIFERENTES ESTADOS DE CONSERVAÇÃO**

Marissol Cardoso Lopes

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2008

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE RT-PCR E
INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS
PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA EM
AMOSTRAS MANTIDAS POR LONGOS PERÍODOS EM
DIFERENTES ESTADOS DE CONSERVAÇÃO**

Marissol Cardoso Lopes
Orientadora Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz

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

ARAÇATUBA – SP
2008

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

L864c Lopes, Marissol Cardoso
 Comparação entre as técnicas de RT-PCR e inoculação
 intracerebral em camundongos para detecção do vírus da raiva em
 amostras mantidas por longos períodos em diferentes estados de
 conservação / Marissol Cardoso Lopes. - Araçatuba : [s.n.], 2008
 52 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2008
 Orientador: Profa. Luzia Helena Queiroz

 1. Raiva 2. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase
 reversa 3. Viabilidade microbiana 4. Epidemiologia

CDD 636.0896

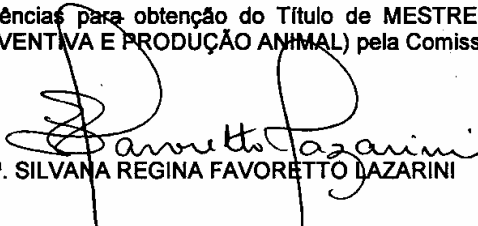
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Comparação entre as técnicas de RT-PCR e inoculação intracerebral em camundongos para detecção do vírus da raiva em amostras mantidas por longos períodos em diferentes estados de conservação

AUTOR: MARISSOL CARDOSO LOPES

ORIENTADOR: Drª. LUZIA HELENA QUEIROZ

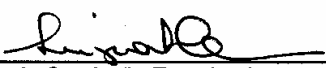
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Drª. SILVANA REGINA FAVORETTO DAZARINI


Dr. AVELINO ALBAS


Drª. LUZIA HELENA QUEIROZ

DATA DA REALIZAÇÃO: 12 de dezembro de 2008.


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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARISSOL CARDOSO LOPES – nascida em 10 de março de 1982, na cidade de Ilha Solteira, SP, médica veterinária formada pela Unesp – Araçatuba no ano de 2006. Foi bolsista de Iniciação Científica do PIBIC-CNPq no período de janeiro a julho de 2004 e da FAPESP no período de agosto de 2005 a julho de 2006, com projetos relacionados à aplicação da técnica de RT-PCR para detecção do vírus da raiva. Realizou a maioria dos seus estágios curriculares na área de diagnóstico laboratorial de enfermidades infecciosas, com destaque para o estágio realizado na Divisão de Raiva do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) em Atlanta-EUA no ano de 2006.

Ingressou no curso de pós-graduação (mestrado) em Ciência Animal na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, no ano de 2007.

No ano de 2008, iniciou participação em projeto de pesquisa financiado pela FAPESP, como bolsista de treinamento técnico III, de acordo com o processo 2008/06408-3.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é MUITO para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Dedico...

Ao meu marido, Arnaldo, por representar meu ponto de equilíbrio e por suas
palavras de incentivo e de amor.

Aos meus pais, Álvaro e Terezinha, pela educação recebida, pelo suporte
emocional e pelos exemplos de honestidade e determinação com os quais
convivi durante toda minha vida.

Aos meus irmãos, Briza e Alvinho, que amo muito e que estão sempre ao meu
lado e nunca me negam nada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois a fé de que existe um ser superior, de intensa bondade e sempre pronto a perdoar, me dá forças para superar os obstáculos e ser uma pessoa melhor.

Aos meus sogros, Gelza e Nino, por terem me recebido de coração aberto, como uma filha, e por me apoiarem em todos os meus projetos de vida.

Aos meus cunhados, Regina, Carol, Patrick, Fabrício e Ives, que são especiais e cuja presença faz toda a diferença na minha vida.

Ao meu sobrinho, Lucas, que com seu sorriso aberto e espontâneo consegue alegrar até o pior dos meus dias.

À minha avó Aneci, que toda a vida desejou que eu conseguisse realizar os meus sonhos e algumas vezes foi quem os tornou realidade.

À minha orientadora, Luzia, pelo aprendizado, pela paciência e pela confiança depositada em mim durante todos esses anos em que me refiro a ela como “minha orientadora”.

Aos professores do mestrado, com quem muito aprendi e por quem tenho imenso respeito.

À Isabel, Fátima e Alexandra da biblioteca da UNESP-Araçatuba Campus de Medicina Veterinária pela paciência e pela colaboração durante toda minha graduação e durante o mestrado.

À professora Silvia Helena Venturolli, pela boa vontade e ajuda com a parte estatística.

Aos amigos Marina, Anivaldo, Tatiane, Dayana, Vivian e Denise, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis e por me provocarem muitas risadas, fazendo com que tudo se tornasse mais fácil e gostoso.

Ao meu marido, meus pais e irmãos, a quem dediquei este trabalho e a quem não posso deixar de agradecer pela imensa importância que representam na minha vida.

À minha cadelinha, Vicky, que brincava de bolinha comigo o tempo todo, enfatizo, o tempo todo em que fiquei no computador redigindo minha dissertação.

A todas as pessoas que passaram por mim, durante essa fase da minha vida, e que, de alguma forma, se fizeram importantes. Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	12
Considerações Gerais	13
Objetivo	19
Referências	21
CAPÍTULO 2.....	28
Comparação entre as técnicas de RT-PCR e inoculação intracerebral em camundongos para detecção do vírus da raiva em amostras mantidas por longos períodos em diferentes estados de conservação	29
ANEXO	47
Anexo A	48

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE RT-PCR E INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA EM AMOSTRAS MANTIDAS POR LONGOS PERÍODOS EM DIFERENTES ESTADOS DE CONSERVAÇÃO.

RESUMO - As análises antigênica e genética são ferramentas importantes para o estudo da epidemiologia da raiva em uma região. A recuperação e reisolamento viral a partir de amostras conservadas por longos períodos em temperatura de congelamento é essencial para estudos retrospectivos. Porém, o tempo de conservação, associado a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, promove uma perda significativa na viabilidade do vírus, condição esta que pode ser contornada com a utilização de técnicas de biologia molecular, como a RT-PCR. Com o objetivo de verificar a viabilidade e detectar o RNA do vírus rábico, 95 amostras com diagnóstico positivo e armazenadas por 4 a 13 anos a -20 e -80°C foram avaliadas por inoculação intracerebral em camundongos e RT-PCR. Apenas 33,6% (32/95) das amostras inoculadas em camundongos foram positivas, enquanto que a RT-PCR detectou o genoma viral em 65,3% (62/95). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) na viabilidade das amostras e na detecção do genoma viral na amostras armazenadas por mais de 10 anos, sendo a porcentagem de positividade de 22,1% e 59,7%, respectivamente. O presente estudo confirma a importância da RT-PCR na detecção do genoma viral em amostras conservadas por longo período de tempo, incluindo aquelas em estado visível de decomposição.

Palavras-Chave: Epidemiologia, Raiva, Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa, Viabilidade Microbiana

**COMPARISON BETWEEN RT-PCR AND MOUSE INOCULATION TEST FOR
RABIES VIRUS DETECTION FROM SAMPLES KEPT FOR LONG PERIODS
AT DIFFERENT CONSERVATION STAGES.**

SUMMARY - The antigenic and genetic analyses are important tools for retrospective study of rabies epidemiology in a region. The recovery and viral re-isolation from samples conserved for long periods in freezing temperature are essential for these studies. However, time conservation, associated with temperature variations, causes a significative virus viability loss. On the other hand, molecular tools, such as RT-PCR, can overcome this condition. For this purpose, 95 positive samples stored for 4 to 13 years at -20 and -80°C were evaluated by intracerebral inoculation in mice and RT-PCR. Of this total, only 33,6% (32/95) had been positive in the intracerebral inoculation, while RT-PCR detected the viral genoma in 65.3% (62/95). It had a significant difference ($p > 0,0001$) in the viability of the samples and the detention of the viral genoma from those samples store for more than 10 years and the percentage of positivity reached 22,1% and 59,7%, respectively. The present study confirms the importance of the RT-PCR technique for detection of viral genoma in old samples, including those in apparent state of decomposition.

Keywords: Epidemiology, Microbial Viability, Rabies, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A raiva é uma das mais antigas enfermidades infecciosas que acometem seres humanos (RUPPRECHT et al., 2002). É uma zoonose de distribuição mundial causada por um vírus pertencente ao gênero *Lyssavirus*, da família Rhabdoviridae e da Ordem Mononegavirales, caracterizado por possuir apenas uma fita de RNA de cadeia simples e sentido negativo (PAEZ et al., 2002).

O vírus já foi isolado de quase todas as ordens de mamíferos, porém os principais reservatórios pertencem principalmente às ordens Carnivora e Chiroptera (RUPPRECHT et al., 2001). É uma doença que ocorre em praticamente todos os continentes e o cão continua sendo o principal reservatório do vírus e transmissor ao homem através de mordeduras que resultam em tratamento pós-exposição, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2004).

A raiva é considerada endêmica no Brasil e alguns ciclos epidemiológicos podem ser identificados considerando-se a variante antigênica: o ciclo aéreo, caracterizado pelas variantes que circulam entre os morcegos (FAVORETTO et al., 1999; KOBAYASHI et al., 2005) e que por sua vez são responsáveis por acometer as espécies herbívoras (HEINEMANN et al., 2002; ITO et al., 2001a; ROMIJN et al., 2003); o ciclo terrestre cujas variantes circulam entre os cães (FAVORETTO et al., 1999; ITO et al., 2001a; FAVORETTO et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2007) e raposas (SHOJI et al., 2006; CARNIELI et al., 2007) e o ciclo intermediário, denominado Silvestre, mais característico da região Nordeste do Brasil, neste circulam as variantes que provavelmente vieram do ciclo aéreo e se albergaram nos sagüis (FAVORETTO et al., 2001).

O modo mais comum de transmissão da raiva é por meio da mordedura (RUPPRECHT et al., 2002), tendo como veículo a saliva. De acordo com Acha e Szyfres (2003), é possível também a infecção de animais por via digestiva e

nasal, tendo sido comprovada a infecção por canibalismo de ratas que se alimentaram de lactentes inoculados com o vírus.

O diagnóstico definitivo de raiva e a confirmação de uma suspeita clínica só podem ser obtidos por testes laboratoriais (KING, 1998; WHO, 2004), sendo que o método laboratorial padrão para diagnóstico da doença é a detecção do antígeno viral pelo teste de Imunofluorescência direta (IFD), descrito por Dean et al. (1996) aliado à prova biológica de inoculação intracerebral em camundongos (KOPROWSKI, 1996)

A conservação da amostra é um ponto crítico para um diagnóstico rápido e acurado e de acordo com David et al. (2002), existem duas causas para a decomposição do tecido nervoso: a primeira é o clima quente e a segunda, o manejo inadequado das amostras durante o transporte até o laboratório. De acordo com Ito et al. (2001b) e Dantas Júnior et al. (2004), um problema sério que ocorre em países tropicais como o Brasil é a rápida degradação das amostras que acaba por comprometer a sensibilidade da IFD.

Embora os resultados positivos na IFD observados em amostras autolisadas sejam corretos e seguros, a confiabilidade do resultado negativo é questionável (ALBAS et al., 1999; LEWIS, 1974; SMITH et al., 1995). Em contrapartida, segundo Rojas Anaya et al. (2006), a IFD requer que o cérebro do animal esteja fresco, ou seja, ele deve ser colhido logo após a morte, pois se houver decomposição, a sensibilidade da técnica diminui.

Albas et al. (1999) em seu trabalho, observou que quando a amostra não é adequadamente conservada começa a ocorrer, a partir de 48 horas, uma perda de sensibilidade da inoculação intracerebral e, após 72 horas, os resultados são negativos.

Ainda, repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, por problemas de rede elétrica, ou devido à própria rotina laboratorial, ou ainda pela utilização de congeladores domésticos, deve ser evitada por causar danos aos tecidos que impossibilitam a detecção posterior do vírus, por esta razão, amostras positivas, mantidas por períodos maiores para serem utilizadas como controles, para estudos epidemiológicos e para outros propósitos, devem ser

armazenadas em temperaturas ultra-baixas (-30 a -80°C), que conservam a atividade viral por vários anos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006; GREENE e RUPPRECHT, 2006).

Desta forma, amostras que são submetidas a condições adversas de temperatura, tanto durante o envio ao laboratório, devido ao manejo inadequado associado ao clima quente, quanto pela conservação inadequada, podem ocasionar uma redução significativa da sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico, devido à degradação do antígeno viral e à perda da viabilidade viral, respectivamente (MARTORELLI, 2004).

Tais condições dificultam o aproveitamento do tecido nervoso para estudos retrospectivos da epidemiologia da raiva, principalmente por meio de testes com anticorpos monoclonais, uma vez que a recuperação e re-isolamento viral em cérebro de camundongos ou cultivos celulares são fundamentais para essa finalidade.

A utilização das técnicas de biologia molecular, particularmente a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido uma alternativa eficiente para o diagnóstico da raiva e para estudos epidemiológicos.

Em se tratando de vírus da raiva, cujo material genético é o RNA, por meio da ação da enzima Transcriptase Reversa é possível obter o c-DNA viral seguido da amplificação pela polimerase em cadeia, numa reação denominada de RT-PCR (ERMINE et al., 1990; SACRAMENTO et al., 1991), que permite o diagnóstico até em amostras em avançado estado de decomposição, para as quais a IFD apresentaria resultados negativos (DAVID et al., 2002; FAVORETTO et al., 2005; ITO et al., 2001b; SOARES et al., 2002). A técnica de RT-PCR pode ser utilizada ainda, com sucesso, para o diagnóstico em amostras cerebrais fixadas em *carnoy* e embebidas em parafina (KULONEN et al., 1999), fixadas apenas em parafina ou conservadas em solução salina de glicerol a 50% (BISWAL et al., 2007) e em amostras fixadas em formalina (WARNER et al., 1997).

Além da RT-PCR, a utilização do nested RT-PCR e hemi-nested RT-PCR (hn-PCR) aumenta a sensibilidade da prova, em relação à RT-PCR

convencional, uma vez que realizam uma segunda amplificação a partir de oligonucleotídeos iniciadores internos aos utilizados na amplificação inicial (KAMOLVARIN et al., 1993; PICARD-MEYER et al., 2004), o que viabiliza o diagnóstico de amostras em estado de decomposição (ARAÚJO et al., 2008).

Ainda, outra vantagem das ferramentas moleculares é que seu produto, ou seja, o c-DNA amplificado, pode ser subsequentemente utilizado para seqüenciamento e análises filogenéticas o que permite uma identificação altamente precisa do vírus isolado de cada amostra (HEATON et al., 1997).

A vantagem da utilização dessas técnicas em amostras em estado de decomposição tem sido demonstrada por diversos autores utilizando-se cérebros de diversas espécies. Kamolvarin et al. (1993) demonstrou em cães e humanos utilizando a RT-PCR, Whitby et al. (1997) em lobos, utilizando a técnica de nested RT-PCR e Heaton et al. (1997), demonstrou em camundongos, utilizando a heminested RT-PCR.

David et al. (2002) obtiveram sucesso em detectar o genoma viral em cérebro de diferentes espécies animais mantidos por até 40 dias em temperatura de 37°C utilizando apenas a RT-PCR, porém com os *primers*, 113 (5' GTAGGATGATATATGGG 3') e o 509 (5' GAGAAAGAACTTCAAGA 3'), além do 304, mesmo utilizado no presente trabalho.

No Brasil, Soares et al. (2002) utilizaram a técnica de heminested RT-PCR e obtiveram resultados positivos em amostras inicialmente negativas na IFD, em amostras em decomposição e em amostras com quantidade mínima de cérebro, como em casos de morcegos de tamanho pequeno.

Outros dois relatos, também do Brasil, descreveram o diagnóstico de raiva, pela técnica de RT-PCR, em cérebro em decomposição de humanos exumados oito dias (FAVORETTO et al., 2005) e 30 dias (OLIVEIRA et al., 2006) após o sepultamento.

Araújo et al. (2008) avaliaram a sensibilidade das técnicas de RT-PCR e heminested RT-PCR na detecção do RNA viral em amostras positivas pelas técnicas de IFD e IICC, conservadas por longos períodos em temperatura de congelamento e posteriormente deixados à temperatura ambiente por 72 horas.

Portanto, os testes moleculares, principalmente a RT-PCR, representam ferramentas importantes por produzirem um diagnóstico mais rápido e definitivo, permitindo uma estratégia de intervenção mais direta (DANTAS JUNIOR et al., 2004) e ainda por possibilitarem estudos epidemiológicos retrospectivos através de amostras de arquivo (BISWAL et al., 2007) e em estado de decomposição.

O Laboratório de Raiva da UNESP de Araçatuba diagnosticou no período de 1993 a 2003, 412 amostras positivas para raiva, sendo 291 da espécie canina, 77 de herbívoros (bovinos, eqüinos, ovinos e outros), 31 de morcegos e 13 de felinos, provenientes de municípios na região de Araçatuba (QUEIROZ DA SILVA et al., 1996; QUEIROZ et al, 2008). Essas amostras permaneceram armazenadas em temperatura de -20°C até o ano de 2000 e a partir deste ano passaram a ser armazenadas em temperatura de -80°C , porém muitas delas já se encontravam em estado de decomposição.

Para estabelecer o objetivo do presente trabalho, partimos da hipótese de que a detecção do genoma viral pela técnica de RT-PCR, é um método diagnóstico por meio do qual se pode obter uma maior positividade, quando se trata de amostras conservadas por longos períodos e em estado de decomposição, quando comparada à inoculação intracerebral em camundongos, técnica esta que segundo Albas et al. (1999) é menos sensível para amostras nestas condições.

2 – OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi detectar o RNA do vírus da raiva utilizando a técnica da reação em cadeia pela polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) e analisar a viabilidade viral pela inoculação intracerebral em camundongos (IICC), em amostras conservadas por congelamento, durante longos períodos e em estado visível de decomposição.

REFERÊNCIAS

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

ALBAS, A.; FERRARI, C.I.L.; QUEIROZ DA SILVA, L.H.; BERNARDI, F.; ITO, F.H. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 1, p. 19–22, 1999.

ARAÚJO, D.; LANGONI, H.; ALMEIDA, M. F.; MEGID, J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. **BMC Reaserch Notes**.

Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/1/17>>. Acesso em: 20 out. 2008.

BISWAL, M.; RATHO, R.; MISHRA, B. Usefulness of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Detection of Rabies RNA in Archival Samples. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, p. 298-299, 2007.

CARNIELI, P.; FAHL, W.O.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.; MACEDO, C.I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R.S.P.; MORATO, R.G.; SPÍNDOLA, R.O.; MACHADO, L.M.; SÁ, J.E.U; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Characterization of rabies virus isolated from canides and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Res.**, v. 131, p. 33-46, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Protocol for postmortem diagnosis of rabies in animals by direct fluorescent antibody testing: A minimum standard for rabies diagnosis in the United States. Disponível em:

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/Professional/publications/DFA_diagnosiss/DFA_protocol-b.htm>. Acesso em: 12 abr. 2006.

DANTAS JUNIOR, J.; KIMURA, L.; FERREIRA, M.; FIALHO, A.; ALMEIDA, M.; GRÉGIO, C.; ROMIJN, P.; LEITE, J. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies vírus detection. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 3, p. 398-400, 2004.

DAVID, D.; YAKOBSON, B.; ROTENBERG, D.; DVERES, N.; DAVIDSON, I.; STRAM, Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Vet. Microbiol.**, v. 87, n. 2, p. 111-118, 2002.

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

ERMINE, A.; LARZUL, D.; CECCALDI, P.E.; GUESDON, J.L.; TSIANG, H. Polymerase chain reaction amplification of rabies virus nucleic acids from total mouse brain RNA. **Mol. Cell. Probes**, v. 4, n. 3, p. 189-191, 1990.

FAVORETTO, S.R.; MARTORELLI, L.F.; ELKHOURY, M.R.; ZARGO, A.M.; DURIGON, E.L. Rabies virus detection and phylogenetic studies in samples from an exhumed human. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, n. 3, p. 413-414, 2005.

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

FAVORETTO, S.R.; MATTOS, C.C.; MORAIS, N.B.; ARAÚJO, F.A.A.; MATTOS, C.A. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*) from the State of Ceará, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 6, p.1062-1065, 2001.

FAVORETTO, S.R.; MATTOS, C.C.; MORAIS, N.B.; CARRIERI, M.L.; ROLIM, B.N.; SILVA, L.M.; RUPPRECHT, C.E.; DURIGON, E.L.; MATTOS, C.A. Rabies virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceará State, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 12, p. 1978-1981, 2006.

GREENE, C.E.; RUPPRECHT, C.E. Rabies and Other Lyssavirus Infections. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders-Elsevier, 2006. chap. 22, p.167-183.

HEATON, P. R.; JOHNSTONE, P.; McELHINNEY, L.M.; COWLEY, R.; SULLIVAN, E.; WHITBY, J.E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related-viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.11, p. 2762-2766, 1997.

HEINEMANN, M.B.; FERNANDES-MATIOLI, F.M.; CORTEZ, A.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; BERNARDI, F.; ITO, F.H.; MADEIRA, A.M.; RICHTZENAHIN, L.J. Genealogical analyses of rabies vírus strains from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiol. Infect.**, v. 128, n. 3, p. 530-511, 2002.

ITO, M.; ARAI, Y.T.; ITOU, K.; SAKAI, T.; ITO, F.H.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v. 284, n. 2, p. 214-222, 2001a.

ITO, M.; ITOU, T.; SAKAI, T.; SANTOS, M.; ARAI, Y.; TAKASAKI, T.; KURANE, I.; ITO, F. Detection of rabies vírus RNA isolated from several species of

animals in Brazil by RT-PCR. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, n. 12, p. 1309-1313, 2001b.

KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMOKE, R.; TIRAWATNPONG, G.; PANPANICH, T.; HEMACHUDIHA, T. Diagnosis of rabies by Polymerase Chain Reaction with nested primers. **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 1, p. 207-210, 1993.

KING, A. A. Rabies. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D. I. H. **Zoonoses**, Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 437-458.

KOBAYASHI, Y.; INOUE, N.; SATO, G.; ITOU, T.; SANTOS, H. P.; BRITO, C. J. C.; GOMES, A. A. B.; SANTOS, M. F. C.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Phylogenetic Characterization of Rabies Vírus Isolates from Carnivora in Brazil. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 69, n. 7, p. 691-696, 2007.

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, p. 647-652, 2005.

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

KULONEN, K.; FEKADU, M.; WHITFIELD, S.; WARNER, C.K. An evaluation of immunoflorescence and PCR methods for detection of rabies in archival carnoy-fixed paraffin-embedded brain tissues. **Zentralbl. Veterianrmed. B.**, v. 46, n. 3, p. 151-155, 1999.

LEWIS, V.J.; THACKER, W.L. Limitations of deteriorated tissue for rabies diagnosis. **Health Lab. Sci.**, v. 11, n. 1, p. 8-12, 1974.

MARTORELLI, L.F. **Diagnóstico laboratorial e diversidade genética do vírus rábico, isolado no Estado de São Paulo, 1989 a 2000**. São Paulo, 104f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2004.

OLIVEIRA, R.; TAKAOKA, N.; BRANDÃO, P.; CARNIELI JUNIOR., P.; MACEDO, C.; CASTILHO, J.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Postmortem confirmation of human rabies source. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 5; p. 867-869, 2006.

PAEZ A.; GARCIA C.; BOSHELL J. Standardization of rabies virus genome amplification for molecular epidemiology studies. **Biomédica**, v.22, n.1, p. 71-75, 2002.

PICARD-MEYER, E.; BRUYÉRE,V.; BARRAT, J.; TISSOT, N.; BARRAT, M.J.; CLIQUET, F. Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus: comparison with other rabies diagnostic methods. **Vaccine**, v. 22, n. 15-16, p.1921-1929, 2004.

QUEIROZ, L.H.; CARVALHO, C.; BUSO, D.S.; FERREIRA, C.I.L.; PEDRO, W.A. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2008 (no prelo).

QUEIROZ DA SILVA, L.H.; FERRARI, C.I.L.; PEIXOTO, Z.M.P.; CUNHA, E.M.S.; GONCALES, C.M. Diagnóstico laboratorial da raiva na região de Araçatuba no período de janeiro/1993 a dezembro/ 1995. **Biológico**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 7-12, 1996.

ROJAS ANAYA, E.; LOSA-RUBIO, E.; BANDA RUIZ, M. V.; HERNÁNDEZ BAUMGARTEM, E. Use of reverse transcriptase chain reaction to determine

the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 18, n. 1, p. 98-101, 2006.

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. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.69, n. 1, p. 81-86, 2003.

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

RUPPRECHT, C.; HANLON, C.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, n. 6, p. 327-343, 2002.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Mol. Cell. Probes**, v. 5, n. 3, p. 229-240, 1991.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; GOMES, A.A.B.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies viruses isolated from wildlife and livestock in Paraíba, Brazil. **Acta Virol.**, v. 50, n. 1, p. 33-37, 2006

SMITH, J. S.; ORCIARI, L; YAGER, P. Molecular epidemiology of rabies in the US. **Semin. Virol.** v. 6, n. 6, p. 387-400, 1995.

SOARES, R.M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S.M.; HEINEMANN, M.B.; CORTES, A.; ALVES, L.M.; MEYER, A.D.; LICHTZENHAIN, L.J. A heminested chain reaction for the detection of brazilian rabies isolates from vampires bats and herbivorous. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 109-111, 2002.

WARNER, C.K.; WHITFIELD, S.G.; FEKADU, M.; HO, H. Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome in situ in formalin-fixed tissues. **J. Virol. Methods**, v. 67, n. 1, p. 5-12, 1997.

WHITBY, J.E.; JOHNSTONE, P.; SILLERO-ZUBIRI, C. Rabies Virus in the Decomposed Brain of an Ethiopian Wolf Detected by Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **J. Wildlife**, v. 33, p. 912-915, 1997.

WHO. **Expert consultation on rabies** : first report. WHO technical report series, 2004. n. 931, p. 121.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

RT-PCR para detecção de RNA do vírus rábico

Comparação entre as técnicas de RT-PCR e inoculação intracerebral em camundongos para detecção do vírus da raiva, em amostras conservadas por longos períodos.

Marissol Cardoso Lopes, Leandro Lima Rossingnolo Venditti e Luzia Helena Queiroz

UNESP - Universidade Estadual Paulista - Curso de Medicina Veterinária –
Campus de Araçatuba – Rua Clóvis Pestana, 793 CEP: 16050-680.

marissolcl@hotmail.com

As análises antigênica e genética são ferramentas importantes para o estudo da epidemiologia da raiva em uma região. A recuperação e re-isolamento viral a partir de amostras conservadas por longos períodos em temperatura de congelamento é essencial para estudos retrospectivos. Porém, o tempo de conservação, associado a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, promove uma perda significativa na viabilidade do vírus, condição esta que pode ser contornada com a utilização de técnicas de biologia molecular, como a RT-PCR. Com o objetivo de verificar a viabilidade e

detectar o RNA do vírus rábico, 95 amostras com diagnóstico positivo e armazenadas por 4 a 13 anos a -20 e -80°C foram avaliadas por inoculação intracerebral em camundongos e RT-PCR. Apenas 33,6% (32/95) das amostras inoculadas em camundongos foram positivas, enquanto que a RT-PCR detectou o genoma viral em 65,3% (62/95). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) na viabilidade das amostras e na detecção do genoma viral nas amostras armazenadas por mais de 10 anos, sendo a porcentagem de positividade de 22,1% e 59,7%, respectivamente. O presente estudo confirma a importância da RT-PCR na detecção do genoma viral em amostras conservadas por longo período de tempo, incluindo aquelas em estado visível de decomposição.

Palavras-chave: Raiva - Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa - Viabilidade Microbiana - Epidemiologia

INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose viral mundialmente difundida e caracterizada por determinar uma encefalomielite aguda e fatal em indivíduos que tiveram contato com a saliva, por mordedura, de outro animal infectado com o vírus rábico (Acha & Szyfres 2003).

É causada por um vírus pertencente ao gênero *Lyssavirus*, da família Rhabdoviridae e da Ordem Mononegavirales, caracterizado por possuir apenas uma fita de RNA de cadeia simples e sentido negativo (Paez et al. 2002). O vírus já foi isolado de quase todas as ordens de mamíferos, porém os principais

reservatórios pertencem principalmente às ordens *Carnivora* e *Chiroptera* (Rupprecht et al. 2001).

O método padrão de diagnóstico para a doença é a detecção do antígeno viral pelo teste de Imunofluorescência direta (IFD) descrita por Dean et al. (1996) aliado à prova biológica de inoculação intracerebral em camundongos (IICC) descrita por Koprowski (1996), com a observação dos sinais clínicos clássicos da raiva. A IFD é uma técnica rápida, de baixo custo e capaz de detectar o antígeno viral mesmo em amostras em estado de decomposição, onde o vírus pode não estar viável (Meslin et al. 1996).

Um sério problema que ocorre em países tropicais como o Brasil é a rápida degradação das amostras, principalmente aquelas que são armazenadas em temperaturas de -20° , sem fixação (Biswal et al. 2007), o que acaba por comprometer a sensibilidade da IFD (Ito et al. 2001 e Dantas et al. 2004) e da inoculação intracerebral em camundongos devido à degradação dos antígenos virais e à perda de sua viabilidade (Martorelli 2004). Tal comprometimento é observado a partir de 48 horas e após 72 horas, onde os resultados passam a ser negativos (Albas et al. 1999).

Por esta razão, as amostras positivas, mantidas por períodos maiores para serem usadas como controles, como arquivos para estudos epidemiológicos posteriores e para outros propósitos (Biswal et al. 2007 e Mizuno et al. 1998) devem ser armazenadas em temperaturas ultra-baixas (-30 a -80°C), pois elas conservam a atividade viral por vários anos. Ainda, a manutenção de amostras em congeladores domésticos, que atingem a

temperatura máxima de -20°C e que estão sujeitos a subseqüentes ciclos de descongelamento, deve ser evitada por causar danos aos tecidos que impossibilitam a detecção posterior do vírus (CDC 2006, Greene & Rupprecht 2006).

A utilização das técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido útil para fins diagnósticos bem como para estudos retrospectivos, particularmente em se tratando de amostras conservadas por longos períodos (Dantas et al. 2004). Além disso, os produtos do PCR podem ser subsequentemente utilizados para seqüenciamento e análises filogenéticas o que permite uma identificação altamente precisa do vírus isolado (Heaton et al. 1997).

Em se tratando de agentes cujo material genético é o RNA, como o vírus da raiva, a reação em cadeia pela polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) e a Heminested RT-PCR, são ferramentas importantes para diagnóstico e para estudos epidemiológicos da doença, a partir de amostras em decomposição (Araújo et al. 2008, David et al. 2002, Favoretto et al. 2005, Heaton et al. 1997 e Soares et al. 2002).

Partindo-se da hipótese de que a detecção do genoma viral, pela técnica de RT-PCR, é um método diagnóstico por meio do qual se pode obter uma maior positividade, quando se trata de amostras conservadas por longos períodos e em estado de decomposição, quando comparada à inoculação intracerebral em camundongos, técnica esta que segundo Albas et al. (1999) é menos sensível para amostras nestas condições. O objetivo deste trabalho foi, portanto,

detectar o RNA do vírus da raiva utilizando a técnica da RT-PCR e analisar a viabilidade viral pela inoculação intracerebral em camundongos (IICC), em amostras conservadas por congelamento, durante longos períodos e em estado visível de decomposição.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção das amostras virais - As amostras selecionadas haviam sido previamente avaliadas como positivas pelas provas de imunofluorescência direta - IFD (Dean et al. 1996) e/ou prova de inoculação intracerebral em camundongos - IICC (Koprowski 1996) pelo Laboratório de Raiva da UNESP de Araçatuba durante o período de 1993 a 2002. Aquelas isoladas durante o período de 1993 a 2000 permaneceram armazenadas em *freezers* a -20°C e, posteriormente, passaram para *freezer* a -80°C; aquelas isoladas após 2000, já foram armazenadas diretamente a -80°C. Foram considerados dois grupos de amostras: aquelas armazenadas por mais de 10 anos (desde 1993 a 1996) e armazenadas por menos de 10 anos (1997 a 2002) tendo como referência o ano de início do trabalho (2006).

Desse banco de amostras foi selecionado um total de 95, sendo 23 de bovinos, 02 de eqüinos, 12 de felinos, 57 da espécie canina e um muar. Como amostras controle positivo foram utilizados cérebros de camundongos inoculados com a cepa CVS (Challenge Virus Standard) do vírus rábico e como controle negativo, cérebro de camundongo normal.

Inoculação intracerebral em camundongos (IICC) - Empregou-se a prova biológica de acordo com o protocolo desenvolvido por Koprowski (1996), utilizando camundongos albinos suíços jovens (21 a 25 dias) e peso entre 11 a 15g, os quais foram observados durante 30 dias para a verificação dos sintomas típicos da raiva (emagrecimento, arqueamento do dorso, incoordenação motora, paralisia ascendente e morte).

Os cérebros dos camundongos que vieram a óbito no início do período de observação ou sem sintomatologia característica, foram submetidos ao teste de IFD para diagnóstico de raiva.

O tempo médio de sobrevida (TMS) dos camundongos inoculados foi calculado como a média do número de dias decorridos entre o aparecimento dos sintomas e a morte dos animais após a inoculação.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Técnica de RT-PCR - O RNA viral foi extraído usando Trizol LS[®] (Gibco-BRL), seguindo-se as instruções do fabricante.

O c-DNA foi obtido utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 10g (5' CTA CAA TGG ATG CCG AC 3') e 304 (5' TTG ACG AAG ATC TTG CTC AT 3') direcionados a regiões específicas do gene N, a 10 pMol/ul, previamente descritos (Smith 1995, De Mattos 1999), enzima (RT) M-MLV

(Invitrogen®) para retro-transcrição, DNTPs (10mM), DTT (0,1M) e tampão RT (5X). A mistura foi incubada por uma hora a 42°C. Para a amplificação, o c-DNA viral foi adicionado a uma mistura contendo os *primers* 10g e 304, enzima Taq polimerase, DNTPs (1,25mM) e tampão PCR (10X) com MgCl₂. A amplificação ocorreu em termociclador (DNA Thermal Cycler, MJ Research, USA) por 5 minutos a 94°C e em seguida submetidos a 35 ciclos de 94° C por 45", 55 ° C por 45" e 72 °C por 90", sendo a extensão final a 72 °C por 5 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio. As bandas de aproximadamente 1500 pb foram evidenciadas em trans-iluminador contendo luz ultra-violeta e, então, fotografadas.

As amostras que resultaram negativas no primeiro teste foram submetidas a pelo menos um novo teste confirmatório.

Análise estatística - Foram realizados cálculos de média e porcentagem e empregados o teste t para amostras não pareadas e o teste de duas proporções (Zar 1999) para comparar a porcentagem de positividade das amostras em relação ao tempo de congelamento. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico SAS® (Statistical Analyses System).

RESULTADOS

Das 95 amostras testadas, a viabilidade viral, indicada pela positividade na IICC, foi confirmada em 33.6% (32/95) e o RNA viral foi detectado em 65.3% (62/95) delas (Tabela 1).

Tabela 1

Positividade das amostras de cérebro de animais às técnicas de inoculação intracerebral em camundongos (IICC) e reação em cadeia pela polimerase por ação da enzima transcriptase reversa (RT-PCR) em relação ao ano de isolamento

Ano	Inoculação intracerebral em camundongos (IICC)		RT-PCR		
	TMS (dias)	Positividade		Positividade	
		%	NP/NT	%	NP/NT
1993	12	25	1/4	25	1/4
1994	16	19,4	6/31	64,6	20/31
1995	16	17,8	5/28	53,6	15/28
1996	12	35,7	5/14	71,4	10/14
1997	17	100	3/3	100	3/3
1998	16,5	100	2/2	100	2/2
2000	16	72,7	8/11	81,8	9/11
2002	13	100	2/2	100	2/2
Total		33,6	32/95	65,3	62/95

TMS = Tempo Médio de Sobrevida **NT** = número total **NP** = número de positivas.

O tempo médio de sobrevivência (TMS) dos camundongos variou de quatro a 23 dias (dados não apresentados). Quando as amostras foram agrupadas segundo o ano em que foram isoladas (Tabela 1), observou-se que a média do TMS dos animais variou de 12 a 17 dias. Entretanto, não foi observada diferença significativa ($p=0,28$) no TMS dos camundongos inoculados com amostras armazenadas por mais de 10 anos (TMS = 14,2 dias) em relação àqueles inoculados com amostras com menos de 10 anos (TMS = 15,7 dias).

A porcentagem de camundongos mortos, de acordo com o tempo de armazenamento, variou de 12,5% a 100%. Foi observado que, para as amostras de 1993, uma dentre quatro foi positiva na IICC e a porcentagem de mortos foi de 12,5% e das duas amostras datadas de 2002, ambas foram positivas para o mesmo teste com 100% de mortalidade (dados não apresentados).

A Figura 1 ilustra um gel de eletroforese de RT-PCR do vírus da raiva, com formação de bandas de aproximadamente 1500pb, revelando amostras fortemente positivas e outras fraco-positivas. Dentre as amostras positivas apenas para a RT-PCR, destacou-se uma proveniente de cérebro de um muar conservado desde 1994 (M84/05). A amostra 380/95 (Figura 1), de cérebro de cão, que apresentou resultado negativo pela IICC, foi a única positiva pela RT-PCR apenas no teste confirmatório.

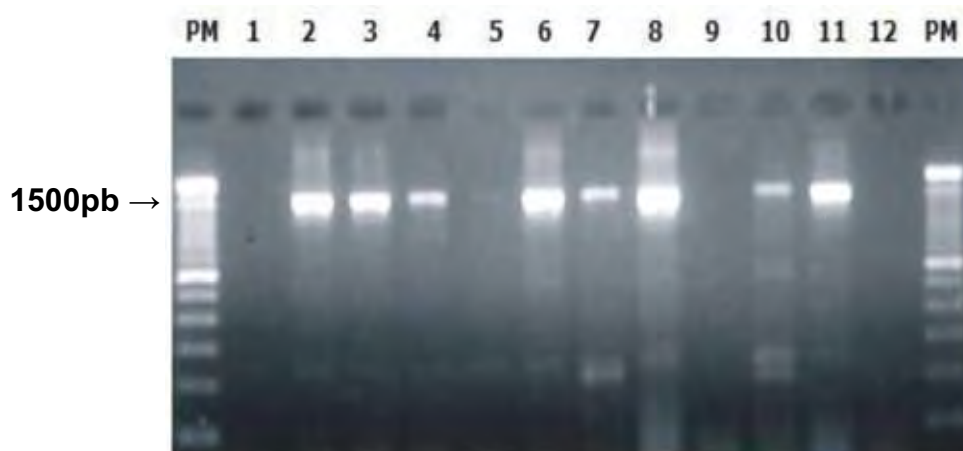


Fig. 1: Eletroforese em gel de agarose a 2%. Produto de amplificação por PCR de fragmento de c-DNA de 1500pb. **PM)** peso molecular de 100pb (Invitrogen®); amostras negativas: **1)** M18/93, **9)** M328/95; amostras positivas: **2)** M45/93, **3)** M07/94, **4)** M15/94, **5)** M336/94 (fraco positiva), **6)** M420/94, **7)** **M380/95**, **8)** M24/94, **10)** **M85/94**; **11)** controle positivo (CVS) e **12)** controle negativo (cérebro de camundongo normal).

Considerando o total de amostras estudadas, a porcentagem de positividade pela técnica de RT-PCR foi estatisticamente maior ($p < 0,0001$) do que a observada pela inoculação intracerebral. Porém, quando as amostras foram analisadas de acordo com o tempo de armazenamento, ou seja, por mais de 10 anos (1993 a 1996) e menos de 10 anos (1997 a 2002), foi verificado que a diferença estatisticamente significativa ocorreu devido às amostras armazenadas por mais de 10 anos, cuja porcentagem de positividade foi de 59,7% para a RT-PCR enquanto que para a IICC foi de apenas 22,1%, como ilustrado na Figura 2.

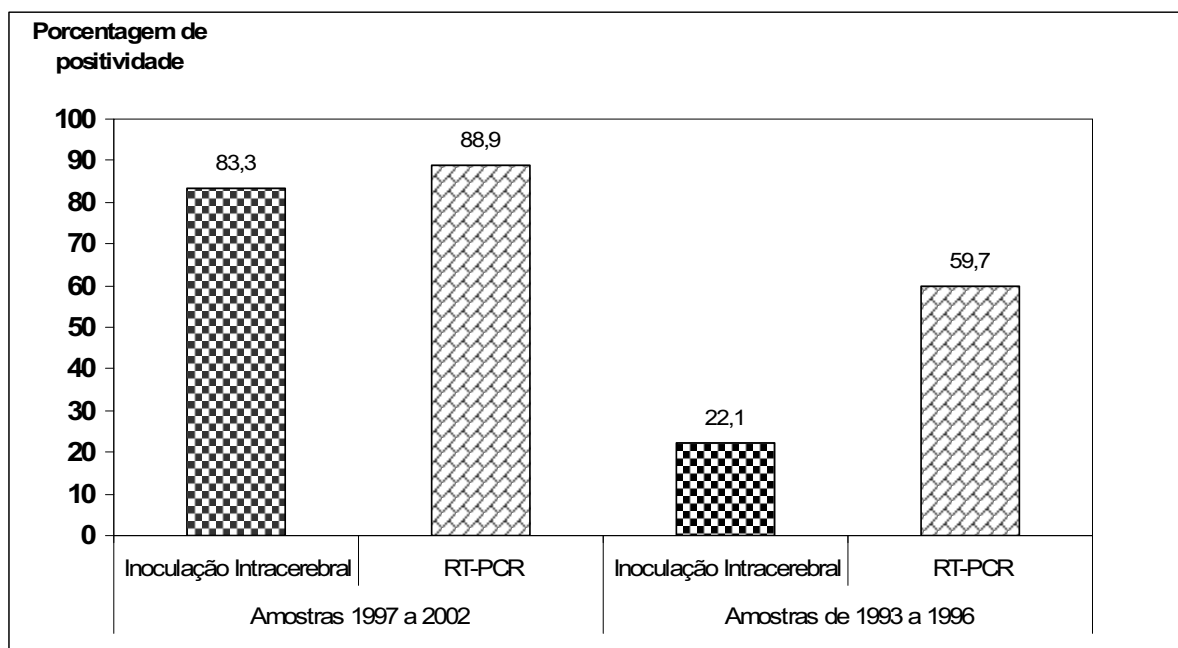


Figura 2: Comparação entre a porcentagem de positividade para a raiva por meio da reação em cadeia pela polimerase por ação da enzima transcriptase reversa (RT-PCR) e da inoculação intracerebral em camundongos (IICC) em amostras de cérebro armazenadas por mais de 10 anos e por menos de 10 anos.

DISCUSSÃO

A porcentagem de amostras viáveis obtida pela prova de inoculação em camundongos (33,6%) foi muito inferior ao observado por Martorelli (2004) que relatou 80,3% de amostras positivas dentre aquelas conservadas por longo período, em temperatura de congelamento, porém, a autora não fez nenhuma relação entre o tempo de conservação e o resultado da viabilidade viral.

Na rotina de diagnóstico de raiva, observa-se que quando se tratam de amostras positivas em perfeito estado de conservação, o período de incubação nos camundongos inoculados é de cinco dias, podendo variar de sete a 23 dias, de acordo com a espécie animal (Koprowski, 1996; Peixoto et al. 2000, Cunha et al 2006). Uma vez que a morte ocorre entre um a três dias após o início dos sintomas, o TMS para camundongos inoculados com amostras em bom estado de conservação é, em geral, de sete a dez dias. Observamos que, com as amostras armazenadas por longos períodos, as médias dos TMS foi consideravelmente maior (12 a 17 dias), devido ao tempo e as condições de armazenamento do tecido nervoso que acaba por diminuir a virulência do vírus. O mesmo foi observado em relação à porcentagem de mortos que foi maior para os camundongos inoculados com amostras conservadas por menos tempo. Tal resultado foi provavelmente devido ao fato de que as amostras com mais de 10 anos passaram a maior parte desse período em temperatura de -20°C, enquanto que as com menos de 10 anos ficaram armazenadas durante a maior parte do tempo à temperatura de -80°C.

Araújo et al. (2008) pesquisaram a positividade, pela RT-PCR e heminested RT-PCR, de amostras deixadas à temperatura ambiente por 72 horas e encontraram o valor de 33,3%, bastante inferior ao encontrado no presente trabalho, mesmo em se tratando das amostras com mais de 10 anos de armazenamento, cuja porcentagem de positividade foi de 59,7%. Tal discrepância pode ser atribuída às diferenças de protocolo e dos *primers* (P510

e P937) utilizados, que permitem a detecção de fragmentos menores (Soares et al. 2002).

Biswal et al. 2007, pesquisou o genoma do vírus da raiva em seis amostras de cérebro humano, com diagnóstico indefinido, e obteve 100% de positividade. Porém, apesar de suas amostras estarem armazenadas por cinco a seis anos à temperatura de -20°C, elas estavam conservadas em solução salina de glicerol a 50%, que promove uma melhor preservação do tecido nervoso. No presente trabalho as amostras estavam congeladas em condições naturais, sem o uso de conservantes, como o glicerol.

A vantagem da utilização de técnicas moleculares na detecção do genoma do vírus da raiva em cérebros em decomposição foi demonstrada por Kamolvarin et al. (1993) em cães e humanos, por Whitby et al. (1997) em lobos, utilizando a técnica de nested RT-PCR, por Heaton et al. (1997), em camundongos, utilizando a heminested RT-PCR, por Dantas et al. (2004), em amostras de herbívoros e morcegos, com a RT-PCR e também em seres humanos exumados oito dias (Favoretto et al. 2005) e 30 dias (Oliveira et al. 2006) após o sepultamento.

Entretanto, em todos esses trabalhos citados, as amostras encontravam-se em estado de decomposição natural ou experimental. Neste trabalho, as amostras utilizadas estavam em estado de decomposição devido ao tempo de conservação em temperaturas inadequadas (-20°C) e devido aos ciclos de congelamento e descongelamento ao qual foram submetidas, condição esta que se assemelha à realidade dos laboratórios que se utilizam de amostras

perecíveis para diagnóstico e para estudos retrospectivos. Não foi encontrado na literatura, até o presente momento, estudos com amostras nas condições aqui apresentadas. Ainda, este é o primeiro relato da detecção do RNA do vírus da raiva pela RT-PCR em amostra de muar armazenada por mais de dez anos e em estado de decomposição.

Os resultados obtidos confirmam e ressaltam que a RT-PCR é mais eficiente para detecção do vírus da raiva em amostras de cérebro de animais conservadas por longos períodos em condições inadequadas e, portanto, em estado de decomposição. Portanto, as técnicas moleculares são ferramentas que podem contribuir sobremaneira para estudos epidemiológicos retrospectivos da raiva.

REFERÊNCIAS

- Acha P, Szyfres B 2003. Rabia. In: Acha PN, Szyfres B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*. 3. ed. Whashington: Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. p 351-383.
- Albas A, Ferrari C, Queiroz da Silva L, Bernardi F, Ito F 1999. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. *Rev Soc Bras Med Trop* 32, 19–22.
- Araújo D, Langoni H, Almeida M, Megid J 2008. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus

detection in stored and decomposed samples. *BMC Reas Notes* Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/1/17>>. Acesso em: 20 out. 2008.

Biswal M, Ratho R, Mishra B 2007. Usefulness of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Detection of Rabies RNA in Archival Samples. *J Infect Dis* 60, 298-299.

Centers for Disease Control and Prevention [homepage on the Internet]. Atlanta: Protocol for Postmortem Diagnosis of Rabies in Animals by Direct Fluorescent Antibody Testing. A Minimum Standard for Rabies Diagnosis in the United States. [updated 2006 Apr 16; cited 2008 Sep 17]. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/Professional/publications/DFA_diagnosis/DFA_protocol-b.htm

Cunha EMS, Queiroz Da Silva LH, Lara MCCSH, Nassar AFC, Albas A, Sodre MM, Pedro WA 2006. Bat rabies in the North-northwestern regions of São Paulo State – Brazil, 1997-2002. *Rev Saúde Pública* 40:6, 1082-86,

Dantas J, Kimura L, Ferreira M, Fialho A, Almeida M, Grégio C, Romijn P, Leite J 2004. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies vírus detection. *Arq Bras Med Vet Zootec* 56, 398-400.

David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dveres N, Davidson I, Stram Y 2002. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet Microbiol* 87, 111-118.

Dean J, Abelseth M, Atanasiu P 1996. Fluorescent antibody test in: Meslin F, Kaplan M, Koprowisk H. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneva H WHO-World Health Organization, Switzerland. 476pp.

De Mattos A, De Mattos C, Loza-Rubio E, Aguilar-Setién A, Orciari L, Smith J 1999. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: Implications for Transmission Dynamics and Human Risk. *Am J Trop Med* 61: 587-597.

Favoretto S, Martorelli L, Elkhoury M, Zargo A, Durigon E 2005. Rabies virus detection and phylogenetic studies in samples from an exhumed human. *Clin Infect Dis* 41: 413-414.

Greene C, Rupprecht C 2006. Rabies and Other Lyssavirus Infections. In Greene C, *Infectious diseases of the dog and cat*, St Louis, p.167-183.

Heaton P, Johnstone P, McElhinney L, Cowley R, O'Sullivan E, Whitby J 1997. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. *J Clin Microbiol* 35: 2762-2766.

Ito M, Itou T, Sakai T, Santos M, Arai Y, Takasaki T, Kurane I, Ito F 2001. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *J Vet Med Sci* 63: 1309-1313.

Kamolvarin N, Tirawatnpong T, Rattanasiwamoke R, Tirawatnpong G, Panpanich T, Hemachudiha T 1993. Diagnosis of rabies by Polymerase Chain Reaction with nested primers. *J Infect Dis* 167: 207-210.

Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, Itou T, Santos P, Brito C, Gomes B, Santos C, Silva V, Mota S, Ito H, Sakai T 2007. Phylogenetic Characterization of Rabies Virus Isolates from Carnivora in Brazil. *J Vet Med Sci* 69: 691-696.

Koprowski H 1996. The mouse inoculation test. In WHO-World Health Organization, *Laboratory techniques in rabies*, Geneva Switzerland, p. 476.

- Martorelli L 2004. *Diagnóstico laboratorial e diversidade genética do vírus rábico, isolado no Estado de São Paulo, de 1989 a 2000*. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 104 pp.
- Meslin F, Kaplan M, Koprowisk H 1996. *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed, WHO-World Health Organization, Geneva, 476 pp.
- Mizuno N, Nagamura H, Iwamoto K 1998. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn Mol Pathol* 7: 202-208.
- Oliveira R, Takaoka N, Brandão P, Carnieli P, Macedo C, Castilho J, Carrieri M, Kotait I 2006. Postmortem confirmation of human rabies source. *Emerg Infect Dis* 12: 867-869.
- Paez A, Garcia C, Boshell J 2002. Standardization of rabies virus genome amplification for molecular epidemiology studies. *Biomédica* 22: 71-75.
- Peixoto ZMP, Cunha EMS, Sacramento DRV, Souza MCAM, Silva LHQ, Germano PM, Kroeff SS, Kotait I 2000. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Braz J Microbiol*, 31:1, p. 72-75.
- Rupprecht C, Stöhr K, Meredith C 2001. Rabies. In Williams E, Barker I, *Infectious disease of wild mammals*, Iowa, p. 3-36.
- SAS Institute Inc 1999. *The SAS-system for windows*: release 8.2 (software). Cary, NC, USA.
- Smith J, Orciari L, Yager P 1995. Molecular epidemiology of rabies in the US. *Semin Virol* 6: 387-400.

Soares R, Bernardi F, Sakamoto S, Heinemann M, Cortes A, Alves L, Meyer A, Lichtzenhain L 2002. A heminested chain reaction for the detection of brazilian rabies isolates from vampires bats and herbivorous. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 109-111.

Whitby J, Johnstone P, Sillero-Zubiri C 1997. Rabies Virus in the Decomposed Brain of an Ethiopian Wolf Detected by Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J Wildlife Dis* 33: 912-915.

Zar JH 1999. *Biostatistical analysis*, New Jersey, 663pp.

ANEXO

ANEXO A

Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Escopo e política

INFORMAÇÕES GERAIS

As Memórias do Instituto Oswaldo Cruz são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, para não causar atrasos na publicação sugerimos que sejam checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às Memórias requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos, no seguinte endereço: <http://submission.scielo.br/index.php/mioc/login>.

Por meio desse serviço você pode submeter o artigo e acompanhar o status do mesmo durante todo o processo editorial. Garantindo rapidez e segurança na submissão do seu manuscrito e agilizando o processo de avaliação.

O manuscrito deverá ser preparado de acordo com as [Orientações aos Autores](#).

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o *copyright* do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelos telefones (+55-21-2598.4335/2561-1442), fax (+55-21-2280-5048), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br).

Formato e estilo

O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um *software* para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e figuras deverão vir em documentos separados.

Deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: endereço completo somente do autor correspondente

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Notas de rodapé: indicando a fonte de financiamento e mudança de endereço

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>.

• **No texto, usar o sobrenome do autor e a data:**

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é: (Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado: Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

• **Nas referências, usar os seguintes estilos:**

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Livro ou Tese

Forattini OP 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B (Euphorbiaceae), PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London, p. 390-398.

Artigo de revista na Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6): [about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA

Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Base de dados na Internet

Acesso aberto:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Acesso fechado:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Parte de uma base de dados na Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

• **Ilustrações:** figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) ou na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da

legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

- Tabelas: devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

- **Comunicações breves:** devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

- **Formato alternativo:** Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

- uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista, assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração.

- uma declaração de **copyright** fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.
- **Taxas:** a revista não cobra taxas para publicação.
- **Provas:** serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.