

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO EM
GAMBÁS (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) NOS
MUNICÍPIOS DE TORRE DE PEDRA, BOFETE E
ANHEMBI – SÃO PAULO**

THAIS SILVA BACCHIEGA

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CIRCULAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO EM GAMBÁS
(*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) NOS MUNICÍPIOS
DE TORRE DE PEDRA, BOFETE E ANHEMBI – SÃO
PAULO**

THAIS SILVA BACCHIEGA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jane Megid

Thais Silva Bacchiega

Avaliação da circulação do vírus rábico em gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) nos municípios de Torre de Pedra, Bofete e Anhembi – São Paulo.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Orientador

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Flávia Karina Delella

Membro

Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Cláudia Valéria Seullner Brandão

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 5 de maio de 2014.

“O pessimista vê dificuldade em cada oportunidade.
O otimista vê a oportunidade em cada dificuldade.”

Winston Churchill

Ao meu pai Alfronter Bacchiega Junior e minha mãe

Mirtes Silva Bacchiega pelos ensinamentos,

formação de caráter e exemplos de dignidade.

As minhas queridas irmãs Maria Cecilia Bacchiega e Andrea Silva Bacchiega, e aos

sobrinhos Miguel Angelo Bacchiega Bueno e Bianca Bacchiega Banov pelo apoio

moral.

DEDICO

A meu noivo Camillo Ferrarezi Giachini pelo amor, cumplicidade,

companheirismo, paciência e pela força

inesgotável nos momentos difíceis.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela saúde e felicidade concedida em minha vida.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – FMVZ – UNESP – Botucatu pela oportunidade de realização do mestrado.

A Professora Dra. Jane Megid e o Professor Dr. Carlos Roberto Teixeira pela excelente orientação, amizade e confiança na realização do presente trabalho.

A todos os Professores que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Ao CCZ São Paulo, por realizar a sorologia, e por estar sempre pronto a ajudar.

Aos meus pais pelo exemplo de vida, honestidade, apoio incondicional e compreensão durante todos os períodos de minha vida.

As minhas irmãs Maria Cecília Bacchiega Bueno e Andrea Silva Bacchiega pelo apoio e amizade sincera.

A meu noivo Camillo Ferrarezi Giachini pelo amor, cumplicidade, companheirismo, paciência e pela força inesgotável nos momentos difíceis.

Agradeço em especial a Marina Gea Peres que me auxiliou e ajudou no projeto e se mostrou sempre disposta a colaborar e a esclarecer minhas dúvidas. Trouxe por meio de seu conhecimento grandes contribuições para a realização do meu trabalho e para o meu conhecimento científico.

A todos os produtores rurais que autorizaram a realização da pesquisa em suas propriedades, e aos “mateiros” que trabalharam arduamente, mesmo debaixo de chuva, com tamanho empenho.

A todos os animais (gambás) amostrados, por nos cederem amostras de sangue e soro, por proporcionarem momentos de emoção, e pelos ensinamentos atingidos.

Meu agradecimento especial a todas as pessoas cujos nomes foram omitidos, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da espécie, sexo e idade, segundo municípios amostrados.....	26
Tabela 2 – Distribuição da classificação sorológica por amostra, segundo o município.....	26
Tabela 3 – Distribuição descritiva da classificação sorológica, segundo propriedade amostrada.....	27
Tabela 4 – Distribuição da classificação sorológica, segundo a espécie e sexo.....	27
Tabela 5 – Distribuição descritiva da classificação sorológica, segundo a idade.....	27
Tabela 6 – Distribuição da classificação sorológica, segundo fatores de risco.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corpúsculo de Negri em célula nervosa.....	3
Figura 2 – Estrutura do vírus da raiva	5
Figura 3 – Esquema dos ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva	12
Figura 4 – <i>Didelphis albiventris</i> , <i>Didelphis aurita</i> e procedimentos realizados com os animais.....	23
Figura 5 – Mapa dos locais de amostragem.....	25

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
1	1
2	2
2.1	2
2.2	4
2.3	6
2.4	6
2.5	7
2.5.1	7
2.5.2	7
2.5.3	7
2.5.4	8
2.5.5	9
2.5.5.1	10
2.5.5.2	10
2.5.5.3	10
2.5.5.4	11
2.6	12
2.6.1	12
2.6.2	12
2.7	13
2.7.1	14
2.7.2	15
2.7.3	16
2.7.4	16
2.7.5	17
CAPÍTULO 2 - Trabalho Científico	19

Resumo.....	20
-------------	----

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL.....	35
----------------------	----

CONCLUSÕES GERAIS.....	36
------------------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
---------------------------------	----

BACCHIEGA, T. S. **Avaliação da circulação do vírus rábico em gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) nos municípios de Torre de Pedra, Bofete e Anhembi – São Paulo**. Botucatu, 2014. 46p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A raiva é uma zoonose, que se caracteriza como uma encefalite aguda e letal. Atualmente, sabe-se que o vírus da raiva possui vários ciclos epidemiológicos e diversos animais podem servir como seus reservatórios, perpetuando-o no ciclo silvestre e urbano. Esse estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de anticorpos neutralizantes (AN) contra a raiva no soro de gambás das espécies *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* por meio da técnica de soroneutralização (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* - RFFIT). A pesquisa foi conduzida nas cidades de Anhembi, Torre de Pedra e Bofete, localizadas no centro oeste de São Paulo. Soro de 67 animais, a maioria do sexo masculino e na idade adulta, foram avaliados. A positividade para anticorpos neutralizantes antirábicos foi de 17,9%. Esse resultado evidencia a circulação do vírus da raiva em gambás e serve de alerta tanto à comunidade científica quanto às autoridades governamentais envolvidas nas pesquisas e controle da raiva.

Palavras-Chave: Animais silvestres, *Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita*, epidemiologia, gambás, raiva, vírus rábico.

BACCHIEGA, T. S. **Evaluation of circulating rabies virus in opossums (*Didelphis albiventris* and *Didelphis aurita*) in the municipalities of Torre de Pedra, Bofete and Anhembi - São Paulo.** Botucatu, 2014. 46p. Dissertation (Master) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Rabies is a zoonotic disease, which is characterized as an acute and lethal encephalitis. Currently, it is known that rabies virus has several cycles and several epidemiological animals may serve as reservoirs of the virus perpetuating it in wild and urban cycle. This study aimed to evaluate the presence of antirabies neutralizing antibodies (NA) in the serum of the opossum *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* by means of a virus neutralizing (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* - RFFIT). The survey was conducted in the cities of Anhembi, Torre de Pedra and Bofete, located in the center west of São Paulo. Sera from 67 animals were examined, most males in adulthood. The percentage of animals that presented neutralizing antibodies was 17.9%. This result shows the circulation of the rabies virus in skunks and serves to alert both the scientific community and government authorities involved in the research and rabies control.

Keywords: Wild animals, *Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita*, epidemiology, opossum, rabies, rabies virus.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade caracterizada por encefalite aguda fatal tanto para animais quanto para os seres humanos. O agente etiológico envolvido é um vírus RNA, neurotrópico, pertence ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae* (RUPPRECHT et al., 2001; RUPPRECHT et al., 2002). Devido a sua evolução letal, ao elevado número de casos em humanos, bem como grande número de pessoas submetidas anualmente ao tratamento anti-rábico após exposição ao vírus, a raiva continua sendo um problema de saúde pública em todo o mundo (RUPPRECHT et al., 2002).

A falta de sistemas adequados de informação e vigilância epidemiológica na maioria dos países, não permite o conhecimento da real magnitude do problema (BELLOTO, 2000). No mundo, estima-se que 10 milhões de pessoas submetam-se anualmente ao tratamento anti-rábico após exposição a algum animal suspeito de raiva e que o número de mortes anuais causadas pela doença esteja entre 40.000 a 70.000 casos, lembrando-se que estimativas mais elevadas são verificadas em países com altas densidades populacionais da África e Ásia, lugares onde a raiva é endêmica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

As principais fontes de infecção e reservatórios do vírus rábico, em vários países europeus e no Canadá, são os animais silvestres. Nos Estados Unidos, após a criação de um programa de prevenção da raiva que consistia na vacinação de cães, que se iniciou na década de 1920, o índice de ocorrência em animais domésticos decresceu, aumentando, porém o número de casos em animais silvestres, principalmente em guaxinins, gambás, raposas e morcegos (RUPPRECHT et al., 1995). Desde 1990, as espécies silvestres representam mais de 90% dos casos de raiva notificados (KING, 1998). Um quadro semelhante ao ocorrido nos Estados Unidos e na Europa pode desenvolver-se no Brasil e em outros países da América, pois tem se observado a diminuição de casos em animais domésticos e o aumento da incidência em animais silvestres, nos últimos anos. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde dos 428 casos de raiva humana registrados no Brasil entre os anos de 1999 e 2012, 28% foram causados por agressões de animais silvestres, dentre eles, morcegos, saguis, raposas e guaxinins (BRASIL, 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da doença

O nome raiva origina-se do grego, na qual é chamada de Lyssa ou Lytta que significa loucura (STEELE e FERNANDEZ, 1991). Dois mil anos a.C., no Código *Eshnunna*, escrito na Mesopotâmia, já existiam os primeiros relatos da raiva em humanos, bem como os valores que deveriam ser pagos à família cujo ente que viesse a óbito em decorrência de mordidas de cães portadores do vírus (WILKINSON, 2002).

Demócrito, em 500 a.C., foi o primeiro a descrever o quadro clínico da raiva canina e Aristóteles, no século IV a.C., escreveu no livro “História Natural dos Animais” que os cães acometidos pela raiva ficavam irritados e os animais atacados por esses cães também adquiriam a doença. Aristóteles, no entanto, acreditava que o ser humano não era acometido pela raiva animal (BAER, 2007).

O filósofo Celsius, no século I d.C., estudou vários aspectos da raiva, salientando o papel da saliva dos animais raivosos na transmissão da doença para o homem. Celsius propôs que animais como gatos e macacos, poderiam transmitir a doença ao homem. Para o tratamento dos animais feridos por animais raivosos, recomendava o uso de ventosas para a sucção do “veneno” inoculado e, em seguida, a cauterização com substâncias cáusticas corrosivas ou ferro em brasa. Para o combate da hidrofobia, recomendava-se colocar o doente dentro de um tanque, de modo que ele ingerisse água, desaparecendo, simultaneamente, a sede e o medo da água. Esses procedimentos foram usados até o fim do século XIX (DEAN et al., 1963).

No ano de 900 d.C. a raiva silvestre foi descrita na Europa. Um urso acometido pela doença agrediu vinte lenhadores, em Lyon, na França. Em consequência das mordeduras seis lenhadores desenvolveram raiva e foram mortos por sufocamento, método com que “piedosamente” se resolviam os casos de raiva humana naquela época (BRAVO, 1978).

Em 1271, na França, ocorreu a primeira grande epidemia de raiva. Lobos com raiva invadiram cidades e vilarejos atacando rebanhos e pessoas. Em 1500, a Espanha foi assolada pela raiva canina. Em 1604, a doença se disseminou por toda a Europa Central. Na Inglaterra, o reconhecimento da doença no país, se deu em 1735 (WILKINSON, 2002) e no século XIX, a doença voltou a ganhar grandes proporções na Europa, principalmente na França, Inglaterra e Alemanha (BAER et al., 1990).

Nas Américas, a primeira referencia feita à raiva foi no ano de 1514, pelo capitão Fernandez de Oviedo, durante a conquista da península mexicana de Yucatan.

Fernandez de Oviedo, capitão espanhol, atribuiu a morte de vários soldados à raiva, após esses terem sido atacados por morcegos (BAER, 2007).

Em 1804, na Alemanha, Zinke fez a primeira abordagem científica, inoculando saliva de cães com raiva em cães saudáveis, induzindo-os a contrair a raiva (BAER et al., 1990). O médico veterinário Galtier, em 1879, estudou a indução de proteção imunológica em cabras e carneiros, através da inoculação de extrato de tecido nervoso de animais com raiva (WILKINSON, 2002). Baseado nos trabalhos de Galtier, Pasteur (1881) desenvolveu a primeira vacinação contra a raiva para humanos no dia 06 de julho de 1885 (PASTEUR, 1886).

Em 1903, o médico e biólogo francês Paul Remlinger (1871–1964) demonstrou que o agente causador da raiva era um ultravírus, vírus bem pequeno, capaz de passar através de um filtro de poros ultrafinos. Também em 1903, o patologista e microbiologista italiano Adelchi Negri identificou microscopicamente inclusões eosinofílicas virais no citoplasma das células nervosas, conhecidas atualmente como corpúsculos de Negri (Figura 1). Os corpúsculos de Negri são uma das formas de detecção laboratorial da raiva, através da observação microscópica das células cerebrais (PEIXOTO et al., 2000).

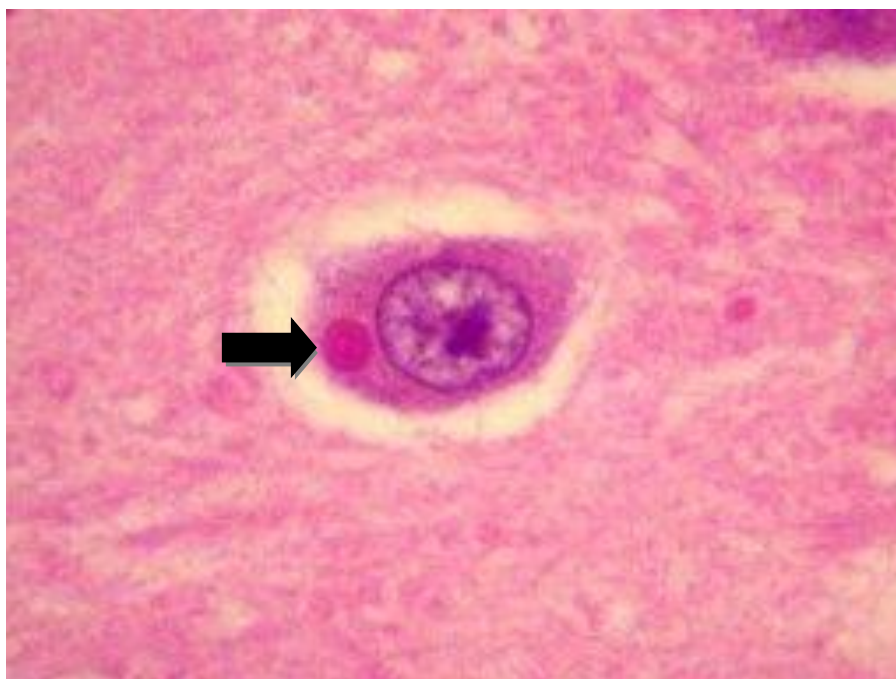


FIGURA 1. Corpúsculo de Negri em célula nervosa. Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/taneuraiva.html>

Em 1911, foi diagnosticada, no Estado de Santa Catarina, a raiva parálitica dos bovinos. Corpúsculos de Negri foram identificados no tecido de cérebros de bovinos mortos por uma doença, até o momento, desconhecida. Em 1916, o governo catarinense contratou veterinários alemães, os quais identificaram o vírus da raiva no cérebro de morcegos hematófagos capturados na região. Muitas contestações se sucederam após essas descobertas, pois a comunidade científica mundial relutava em aceitar que os morcegos pudessem ser “reservatórios” do vírus da raiva (BRASIL, 2009). Em 1934, Esperidião Queiroz Lima demonstrou que os morcegos hematófagos eram os grandes responsáveis pela transmissão da raiva em herbívoros. Em 1935, Silvio Torres e colaboradores também demonstraram a participação dos morcegos hematófagos na transmissão da raiva aos herbívoros. Pawam, em 1936, comprovou a experiência dos veterinários brasileiros que afirmaram que os morcegos hematófagos poderiam transmitir o vírus rábico ao homem (OPORTO et al., 2009).

Para o pesquisador Avila Pires (1965) a raiva é uma doença que provavelmente já existia de forma endêmica, entre os animais silvestres, em áreas recém colonizadas. O aumento das condições artificiais criadas pelo homem, além dos grandes rebanhos concentrados em áreas reduzidas e desmatadas possibilitou o surgimento de surtos epizooticos de grandes proporções entre os animais domésticos (SILVA, 2000).

2.2 Etiologia

A raiva é causada por um vírus RNA envelopado pertencente a ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. A família *Rhabdoviridae* é dividida nos gêneros *Vesiculovirus* e *Lyssavirus*, o qual inclui o vírus da raiva (VAN REGENMORTEL et al., 1997).

A partícula do vírus da raiva apresenta formato de bala de revólver com diâmetro médio de 75 nm e comprimento de 100-300 nm, variando de acordo com a amostra em questão (SWANEPOEL, 2004).

O vírion, partícula completa do vírus rábico, apresenta-se como um cilindro formado pelo genoma disposto em formato de mola e envolto por uma proteína denominada nucleoproteína (N), o conjunto forma um nucleocapsídeo helicoidal com o RNA e a proteína N fortemente unidos (SOUZA et al., 2007). O nucleocapsídeo e algumas moléculas de outras três proteínas estruturais (P, M e L) são circundados pelo envelope viral, derivado de membranas celulares. Nesse envelope estão inseridas moléculas de glicoproteína trimérica denominada “G”, cujas moléculas o atravessam e

são projetadas para a parte externa no vírion (Figura 2) (BATISTA et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

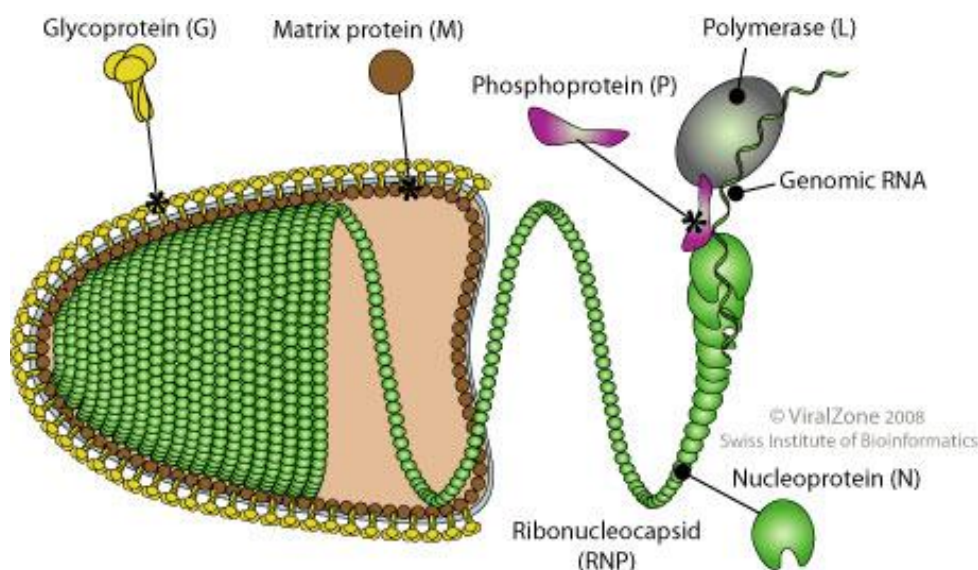


FIGURA 2: Estrutura do vírus da raiva.

Fonte: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/2.html

O gênero *Lyssavirus* apresenta sete genótipos sendo o vírus da raiva (RABV) pertencente ao genótipo 1. O RABV é o vírus protótipo do Gênero *Lyssavirus*, designado como genótipo 1 e é o único do gênero que causa a raiva (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE, 2009). As amostras pertencentes ao gênero *Lyssavirus* são muito semelhantes e incluem outros vírus denominados “vírus relacionados à raiva” (“rabies-like”), que não causam raiva, mas uma doença neurológica muito semelhante à raiva, também chamadas de lissavirose (FAUQUET et al., 2007). Os “vírus relacionados à raiva” possuem semelhança antigênica com o vírus da raiva e também têm sido isolados de quirópteros. Os *Lyssavirus* de quirópteros são, aparentemente, mais antigos evolutivamente do que os *Lyssavirus* de carnívoros. O vírus da raiva pode ter sido originado por eventos de trocas de hospedeiro que ocorreram a partir de lissavírus de morcego (BRADANE e TORDO, 2001).

Lagos bat virus (LBV, genótipo 2) é encontrado em morcegos em parte do continente Africano, causa doença neurológica fatal em cães, gatos e mangustos (*Atilax paludinosus*). O *Mokola virus* (MKL, genótipo 3) tem sido isolado de roedores e musaranhos no continente Africano, não é encontrado em morcegos e seu reservatório é desconhecido. Pode causar doença fatal em cães, gatos e humanos, mesmo após

vacinação. Anticorpos contra o *Mokola vírus* tem sido detectados em animais saudáveis. O *Duvenhage virus* (DUVV, genótipo 4) ocorre entre morcegos no continente Africano, pode causar doença neurológica fatal em pessoas. O *European bat Lyssavirus* (EBLV-1, genótipo 5) é muito semelhante ao *Duvenhage vírus*, porém é encontrado somente no continente Europeu. Posteriormente foi identificado o EBLV-2 (genótipo 6), esses genótipos tem sido relacionados a casos clínicos em animais (ovelhas) e humanos. O *Australian bat Lyssavirus* (ABLV, genótipo 7) foi isolado somente na Austrália e tem sido relacionado a casos fatais em humanos (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009).

Em 2003, novos vírus foram sugeridos para constituírem os genótipos 8 a 11: genótipo 8 (*Aravan virus*-ARAV); genótipo 9 (*Khujand virus*-KHUV), genótipo 10 (*Irkut virus*-IRKV) e o genótipo 11 (*West Caucasian bat virus*-WCBV) (BOTVINKIN et al., 2003; KUSMIN et al., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

2.3 Resistência a agentes físicos e químicos

Pelo fato do vírus ser envelopado, é sensível a detergentes e solventes lipídicos, como o éter e o clorofórmio. Sua resistência fora do hospedeiro é baixa, sendo rapidamente inativado a temperaturas altas (50° C por 15 minutos, 35 segundos a 60° C). É sensível a luz solar, radiação ultravioleta, hipoclorito de sódio, soda cáustica (2%), sabões, formalina (10%), glutaraldeído (2%), fenóis (5%), ácidos e bases em extremos de pH. O vírus pode se manter estável por muito tempo em temperaturas abaixo de 4°C, a -70°C pode se manter viável indefinidamente (BATISTA et al., 2007).

2.4 Distribuição geográfica

Mais de 55.000 pessoas morrem de raiva pelo mundo, anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Enquanto grande parte dos diagnósticos baseia-se apenas em sinais clínicos e assim, a doença torna-se pouco notificada e, apesar de a maioria dos casos surgirem na Ásia e na África, a raiva está se expandindo pelo mundo (CLIFTON, 2010).

A raiva está presente em mais de 150 países em todos os continentes. Mais de 95% das mortes humanas são observadas na Ásia e na África, principalmente em áreas rurais. A raiva terrestre não está presente na Oceania, no Japão e em alguns países da Europa Central e Ocidental. Nenhum caso foi descrito na Antártida ou na Nova Zelândia (KNOBEL et al., 2005).

2.5 Patogenia e sinais clínicos

2.5.1 Transmissão

A forma de exposição, mais comum e também mais perigosa, ao vírus da raiva ocorre através da mordida de um animal raivoso. Outro tipo de exposição acontece quando o vírus, através da saliva ou de outro material potencialmente infeccioso, é introduzido em cortes na pele ou nas membranas mucosas (exposição sem mordida). O contato indireto, através do manuseio do animal infectado com sangue, urina, fezes não constitui um meio importante de exposição. A transmissão entre humanos acontece exclusivamente como resultado de transplante de órgãos ou tecidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005).

A transmissão do vírus rábico através de aerossóis é possível, somente, em casos onde existem grandes quantidades de partículas do vírus suspensas no ar, como em cavernas superpovoadas por morcegos. Em condições experimentais, demonstrou-se que o vírus rábico pode ser transmitido pela ingestão de alimentos contendo saliva de animais infectados. Especula-se que a ingestão pode desempenhar papel importante na transmissão do vírus entre animais selvagens. Embora o vírus seja inativado pelo calor, o consumo de carne e leite de animais infectados não é recomendado (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE, 2009).

2.5.2. Incubação

O período de incubação do vírus da raiva é muito variável em infecções naturais. Fatores como a amostra do vírus envolvido, local da mordedura, carga viral, susceptibilidade da espécie exposta e imunidade da vítima podem influenciar no período de incubação. Em média, o período de incubação é de duas a 12 semanas, porém períodos superiores a um ano já foram relatados (MAYR e GERREIRO, 1972). Em geral, mordidas próximas a cabeça resultam em período de incubação mais curto do que mordidas nas extremidades (RADOSTITS et al., 2002).

2.5.3 Replicação no hospedeiro

Uma vez no hospedeiro, o vírus se replica nas células musculares, próximas ao local da lesão, antes de invadir o sistema nervoso central (SNC). A replicação é necessária antes da invasão do SNC pelo vírus (MORIMOTO et al., 1999). Logo após a infecção, dificilmente o vírus é detectado, pois não estimula o sistema imune, mas pode ser neutralizado por anticorpos (OIE, 2009). Ocasionalmente, pode ocorrer a penetração

direta do vírus no SNC, sem a replicação prévia no músculo (SHANKAR et al., 1991). Após a replicação local, o vírus é conduzido pelas terminações nervosas motoras até os nervos periféricos, através da transmissão célula-célula pelas junções sinápticas e passagem direta do vírus através de conexões intercelulares, chegando ao SNC (IWASAKI, 2000; JACOB et al., 2000).

Após a infecção do SNC o vírus se espalha via nervos periféricos para os tecidos não neuronais, disseminando-se por todo o organismo. A replicação do vírus se dá nas glândulas salivares e a sua excreção através da saliva é o principal mecanismo de disseminação e perpetuação na natureza (SCHNEIDER, 1991).

2.5.4 Sinais Clínicos em humanos

Em humanos, os primeiros sintomas podem incluir sinais clínicos inespecíficos como febre, dores no corpo, desconforto, prurido e alterações sensoriais no ponto de entrada do vírus. Após alguns dias, surgem sintomas como ansiedade, confusão e agitação, os quais evoluem para insônia, comportamento anormal, hipersensibilidade a luz e ao som, delírio, alucinação, paralisia parcial, hipersalivação, dificuldade de deglutição, espasmo na faringe quando exposta a líquidos e convulsões. A forma “furiosa” cursa com hiperexcitabilidade, disfunção autonômica e hidrofobia, já a forma “paralítica” é caracterizada por paralisia (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE, 2009).

A transmissão entre humanos acontece exclusivamente como resultado de transplante de órgãos ou tecidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005).

Dentre as atividades que podem predispor ao risco de transmissão estão: mordidas, beijos, contato direto de saliva com membrana mucosa ou pele lesionada, compartilhamento de utensílios de higiene pessoal e cigarros. Não se sabe qual o período de eliminação do vírus, antes do surgimento dos primeiros sintomas, portanto, profilaxia pós-exposição é recomendada para pessoas que entraram em contato com o indivíduo infectado 14 dias antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE, 2009).

2.5.5 Epidemiologia

O vírus da raiva é encontrado em todo o mundo, com algumas exceções, principalmente em ilhas. Alguns países incluindo Reino Unido, Irlanda, Noruega, Suíça, Japão, Islândia, Nova Zelândia, Singapura e a maior parte da Malásia, Papua Nova Guiné, as ilhas do Pacífico e algumas ilhas da Indonésia tem se mantido livre de casos de raiva clássica (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE, 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), um país é considerado livre da raiva, se não houve casos autóctones adquiridos em humanos ou animais durante os últimos dois anos, na presença de uma vigilância adequada e regulamentos de importação. Usando esta definição, vários outros países são considerados livres de raiva. Em alguns casos, essas nações têm realizado programas de vacinação anti-rábica nos animais silvestres, mas são suscetíveis a reintrodução do vírus de países vizinhos.

A listagem oficial da OIE deve ser consultada para conhecimento da lista atual de países e áreas livres de raiva, pois esse *status* pode mudar anualmente. Por exemplo, a raiva foi recentemente introduzida na ilha de Bali (Indonésia), que tinha sido considerada livre da doença por muitos anos. A presença dos *lissavírus (rabies-like)* não impede uma nação de ser listada como livre de raiva. Não há relatos de isolamento desses vírus nas Américas (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE, 2009).

A ampla distribuição do vírus se deve, em parte, a sua alta capacidade de adaptação, adotando como reservatório diferentes espécies animais. Nas Américas, todas as amostras de vírus do gênero *Lyssavirus* isoladas, pertencem ao genótipo 1, o qual compreende a todas as amostras clássicas do vírus da raiva (BRADANE e TORDO, 2001; BERNARDI et al., 2005; KISSI et al., 1995).

Atualmente, sabe-se que o vírus da raiva possui vários ciclos epidemiológicos que estão interligados, e envolvem diversas espécies de mamíferos, sendo o homem o elo final de todas as cadeias. Na natureza, o vírus da raiva é mantido por ciclos inter-relacionados, denominados ciclos “urbano e silvestre”, “aéreo e rural” (Figura 2). O ciclo urbano refere-se à raiva em cães e gatos domésticos, o ciclo aéreo refere-se a raiva em morcegos. O ciclo rural refere-se a raiva dos herbívoros, envolvendo, principalmente, bovinos e equinos e no qual o principal

vetor é o morcego hematófago. O ciclo silvestre refere-se à raiva associada a espécies silvestres (BATISTA et al., 2007).

2.5.5.1 Ciclo urbano

O ciclo urbano da raiva tem como hospedeiro o cão doméstico (CARNIELI JUNIOR et al., 2008). Devido à estreita relação entre cães e humanos, o caráter zoonótico da raiva é mais evidenciado nesse ciclo. Cães também podem ser infectados por amostras de vírus da raiva que têm como hospedeiros naturais outras espécies, principalmente, morcegos (CARNIELI JUNIOR et al., 2006; CARRIERI et al., 2001). A raiva nas áreas urbanas encontra-se controlada e até mesmo erradicada nos países em que as campanhas de vacinação contra a raiva vêm sendo aplicadas de forma maciça e sistemática, mas ainda é o principal ciclo de transmissão para o homem na maioria dos países asiáticos e africanos (BATISTA et al., 2007). No Brasil, as regiões Norte e Nordeste ainda apresentam casos de raiva canina, principalmente devido às dificuldades em conseguir uma cobertura vacinal mínima na população canina (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009).

2.5.5.2 Ciclo rural

O ciclo rural está relacionado à transmissão da raiva para os animais de produção como bovinos, ovinos, caprinos e equinos. Nos países latino americanos o principal reservatório do vírus, neste ciclo, é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, embora o cão também possa ser um potencial transmissor para os herbívoros. O risco de transmissão para os seres humanos é muito menor neste ciclo, no entanto, tornam-se vulneráveis os indivíduos que manipulam estes animais como tratadores e veterinários (KOTAIT et al., 2009).

2.5.5.3 Ciclo aéreo

Das 140 espécies de morcegos identificadas no Brasil, 31 apresentaram vírus da raiva. Os quirópteros são altamente móveis e a capacidade de certas espécies de se adaptar em ambiente urbano e abrigar-se em habitações humanas aumentam a probabilidade de contato com humanos e animais domésticos (UIEDA, 1996).

A raiva em morcegos apresenta um ciclo epidemiológico independente dos ciclos existentes nos mamíferos terrestres. Os morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*)

são os principais hospedeiros do vírus no ciclo aéreo ou silvestre-aéreo. A espécie bovina é a fonte principal de alimento do *D. rotundus*, mas não raro, atacam outras espécies a busca de alimentos (ROEHE et al., 1997; GONÇALVES et al., 2002; DA ROSA et al., 2006). Existem outras espécies de morcegos hematófagos conhecidas, a *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*, os quais se alimentam de sangue de aves (RUSCHI, 1957). Essas duas espécies podem ser infectadas com o vírus da raiva, mas sua participação na manutenção dos ciclos da infecção é irrelevante.

2.5.5.4 Ciclo silvestre

No ciclo silvestre, o vírus pode utilizar como reservatórios naturais diferentes espécies animais, as quais podem variar em função da fauna e localização geográfica. Variantes diferentes podem infectar uma mesma espécie em diferentes nichos. Na Europa o reservatório natural do vírus no ciclo silvestre é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), na América do Norte, além das raposas, os cangambás (*Mephitis mephitis*) e guaxinins (*Procyon sp.*) também são hospedeiros do vírus. No Brasil, a raposa cinzenta (*Dusicyon vetulus*) foi comprovada ser hospedeira natural de uma variante do vírus (BERNARDI et al., 2005). Outros hospedeiros também são citados, como: jaritatacas (*Conepatus sp.*), guaxinins (*Procyon sp.*), saguis (*Calithrix sp.*), o sagui-de-tufo branco (*Callithrix jacchus*), o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e a raposinha-do-mato (*Pseudoplex vetulus*) (FAVORETTO et al., 2000; BERNARDI et al., 2005; SATO et al., 2006; CARNIELI JUNIOR et al., 2008).

Os roedores não são reservatórios do vírus da raiva. Pequenos roedores (por exemplo, esquilos, ratos, camundongos, hamsters, cobaias e gerbilos) e lagomorfos (incluindo coelhos e lebres) raramente são infectados com o vírus da raiva e não existem relatos da transmissão de raiva desses animais para seres humanos (EIDSON et al., 2005).

No Brasil, tem-se observado aumento na incidência de casos de raiva em animais silvestres. No ano de 1999, foram registrados 37 casos em animais silvestres, sendo quatro em morcegos hematófagos, seis em morcegos não hematófagos, 15 em raposas, três em cangambás, um em macaco e oito em espécies não identificadas (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 1999). No ano de 2002, o número de casos se elevou para 89, sendo 12 morcegos hematófagos, dois em morcegos não hematófagos e 55 não identificados, cinco cangambás, 13 raposas, dois animais de outras espécies (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2002). Em 2003,

somente em morcegos, foram registrados 113 casos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2003). Durante o período de 2002 a 2006, a raiva foi diagnosticada em 169 morcegos hematófagos, 565 não hematófagos, 17 saguis, 195 raposas e sete outras espécies silvestres (WADA et al., 2008).

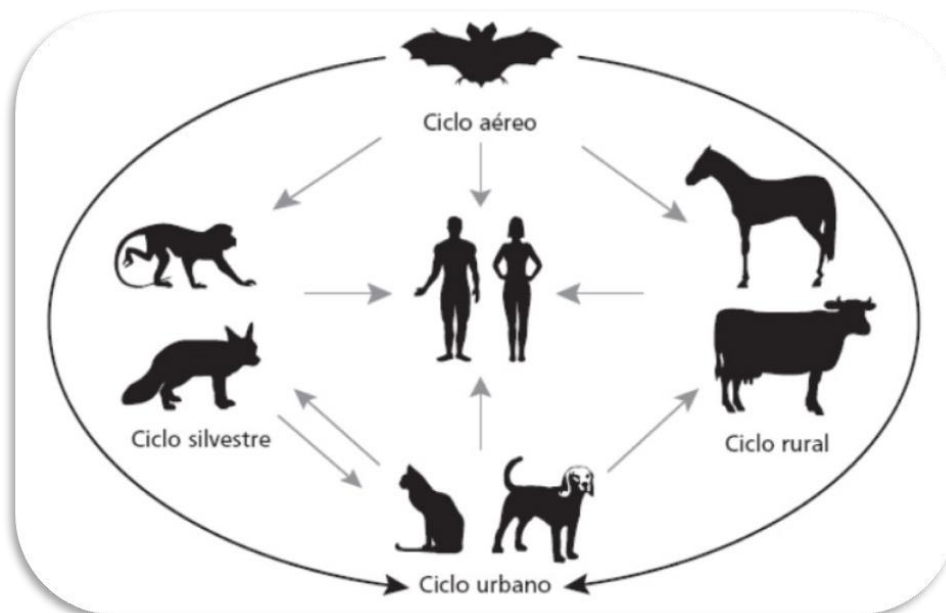


FIGURA 3: Esquema dos Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva. Fonte: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/2185/raiva.htm>.

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico não é conclusivo, levando em conta somente a suspeita da doença, uma vez que os sinais podem variar de animal para animal e também entre as espécies. Existem outras doenças, intoxicações e distúrbios que podem causar sinais clínicos semelhantes ao da raiva, portanto, o diagnóstico final deve ser dado com base em resultados laboratoriais (BRASIL, 2009).

2.6.2 Diagnóstico Sorológico

Testes sorológicos não são empregados rotineiramente para diagnóstico de raiva em animais, nesse caso, após o exame *pos mortem* é possível colher tecido do sistema nervoso central e a detecção de antígenos é eficaz. Em humanos, onde o diagnóstico *ante mortem* é absolutamente relevante e o acesso ao sistema nervoso central é

difícil, a avaliação de anticorpos é importante para o diagnóstico (BATISTA et al., 2007).

A elevação dos títulos de anticorpos no líquido céfalo-raquidiano é considerado positivo em casos suspeitos da doença. Os testes também são úteis na comprovação de contato de populações não vacinadas com o vírus da raiva, demonstrando que o mesmo pode circular em determinados hospedeiros sem causar a morte imediata do animal (BATISTA et al., 2007). A detecção dos anticorpos contra o vírus é realizada através da técnica de soro-neutralização (SN) (CARDOSO et al., 2004).

2.7 Raiva em animais silvestres

O controle da raiva em animais silvestres tem crescido em complexidade nas últimas quatro décadas e esses animais têm substituído os cães como reservatórios primários da doença (DIETZSCHOLD et al., 2008). A principal característica da aproximação entre os seres humanos e os animais silvestres infectados é a perda de medo por parte dos silvestres quanto ao ser humano, em alguns casos, animais silvestres raivosos se apresentam anormalmente dóceis. A aproximação de animais silvestres de habitações também é comum quando esses estão acometidos pela doença (DUARTE e DRAGO, 2005).

Em 2010, nos Estados Unidos, os casos de raiva em animais silvestres corresponderam a 92,1% de todos os registros de casos de raiva em animais. Os guaxinins (*Procyon*) representam 36,5% do total de registros, seguidos pelos gambás (*Mephitis mephitis*) com 23,5%, morcegos com 23,2%, raposas (*Vulpes vulpes*) com 7% e outros animais como roedores e lagomorfos com 1,8% dos registros (BLANTON et al., 2010).

Devido a sua alta prolificidade, a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) se tornou um dos principais reservatório do vírus rábico, na Europa e América do Norte (MACDONALD, 1980). Em um estudo da raiva em raposas na Europa, admite uma propagação do vírus de 20 a 60 km por ano e uma prevalência de 2 a 10%. Segundo Carey (1985), índices entre 1 e 5% são considerados epidêmicos.

Nos últimos anos, a maioria das pesquisas sobre o controle da raiva silvestre tem se concentrado no desenvolvimento de métodos de vacinação oral da raiva selvagem. Entre 1989 e 1995, vários milhões de doses de vacina foram dispersos na Europa Ocidental para a vacinação de raposas vermelhas, levando à eliminação da raiva

silvestre de grandes áreas, que foram livres consequentemente da vacinação (PASTORET et al., 1998).

No continente Norte Americano, várias espécies silvestres são consideradas reservatórios naturais do vírus. Nas regiões árticas e subárticas do Canadá e Alasca, a raposa do ártico (*Alopes lagopus*) desempenha papel importante na perpetuação do vírus, juntamente com a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*).

Os principais reservatórios silvestres do vírus da raiva no Brasil são: quirópteros (principal espécie: *Desmodus rotundus*), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), raposa (*Dusicyon vetulus*), saguis (*Callithrix jacchus*) e outras 35 espécies de morcegos, estas espécies são consideradas as de maior importância para saúde pública (KOTAIT et al., 2007). Animais silvestres não devem ser mantidos como animais de estimação (NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS, 2007) ou serem acessíveis ao público. Os sinais clínicos nos animais silvestres variam conforme as espécies, os canídeos silvestres na maioria das vezes raiva furiosa, semelhante a dos cães. Nos morcegos pode ocorrer uma fase de excitabilidade seguida de paralisia principalmente das asas, o que faz com que esses animais deixem de voar (INSTITUTO PASTEUR, 2002).

2.7.1 Quirópteros - *Desmodus rotundus*

Os morcegos configuram um dos mais importantes reservatórios silvestres para variantes do vírus da raiva transmitida aos seres humanos e outros animais. A transmissão do vírus da raiva pode ocorrer a partir de pequenas ou imperceptíveis mordidas de morcegos (SMITH et al., 1992; MESSENGER et al., 2003).

O *D. rotundus* é um quiróptero muito ágil e furtivo, sendo considerada uma das espécies mais evoluídas em relação ao sistema nervoso central (BHATNAGAR, 2008). Os morcegos hematófagos, como o *D. rotundus*, pertencem à família *Phyllostomidae*, subfamília *Desmodontinae* da subordem *Microchiroptera* (REIS et al., 2007). *D. rotundus* ocorrem desde Sonora, Nuevo León e Tamaulipas, no México, Ilha Margarita, na Venezuela, Trinidad, Bolívia, norte do Chile, Brasil, Paraguai, Uruguai até o norte da Argentina (PERACCHI et al., 2006).

D. rotundus não hibernam, porém o consumo alimentar e a atividade muscular diminuem quando ficam expostos a baixas temperaturas (WIMSATT e GUERRIERE, 1962). Eles são notívagos, geralmente se abrigam em locais escuros e úmidos

(TADDEI, 1983) e de difícil acesso, podendo dividir esses abrigos com outras espécies de morcegos (ARELLANO-SOTA, 1988).

As colônias de *D. rotundus*, geralmente, são pequenas, porém já foram registradas aglomerações com mais de 2000 morcegos (WILKINSON, 1988). A ocorrência é maior em regiões de serra com muitas cavernas, onde o serviço de vigilância e controle da agricultura tem dificuldade de acesso aos seus abrigos (UIEDA, 1996). O crescimento desordenado das cidades e o esgotamento das fontes naturais de abrigos e alimentos têm levado os morcegos a colonizarem novos nichos ecológicos, se aproximando, inclusive, do homem. Abrigos artificiais como túneis, bueiros, casas abandonadas, cisternas, minas abandonadas, entre outros, podem perfeitamente albergar colônias (GONÇALVES, 1996).

A inserção de novos indivíduos nas colônias, limpeza mútua, deslocamentos dos indivíduos entre abrigos e reorganização das colônias podem ser considerados a base da transmissão e da dinâmica da raiva entre morcegos que, certamente, reflete na dinâmica da enfermidade em bovinos (LORD, 1992; GOMES et al., 2005). O conjunto de colônias de *D. rotundus* é composto por uma colônia principal e pequenas colônias satélites e existe interação entre os indivíduos de diferentes colônias, o que possibilita a transmissão do vírus da raiva (WILKINSON, 1988).

2.7.2 Cachorro do mato (*Cerdocyon thous*)

O cachorro do mato é um carnívoro de porte médio e hábitos noturnos. A espécie se distribui pela Colômbia, Venezuela e Brasil (nordeste, centro-oeste, sudeste e sul), Paraguai, Uruguai e norte da Argentina. Quanto à dieta, são onívoros (BERTA, 1982). No nordeste brasileiro, de 1990 a 2005, um total de 173 casos de raiva foi relatado em *Cerdocyon thous*, 25 em *Callithrix jacchus* (sagui comum) e seis em *Procyon cancrivorus* (guaxinim). Durante esse período, em 13 dos 40 casos humanos registrados no Ceará, a vida selvagem era a fonte de infecção (FAVORETTO et al., 2001). Segundo Carnieli Junior et al. 2008, acreditava-se que a raposa fosse o principal reservatório do vírus da raiva na região nordeste, porém com o avanço dos estudos pode-se comprovar que o principal reservatório é o cachorro do mato.

2.7.3 Raposa (*Dusicyon vetulus*)

A raposa do campo é um canídeo de porte médio encontrado somente no Brasil, principalmente na área do Cerrado, sendo a única espécie de mamífero carnívora considerada endêmica a este bioma (LANGGUTH, 1975). Raposas são solitárias, formando casais apenas no período reprodutivo. O primeiro isolamento do vírus rábico de raposa foi feito por Santos e Passos em 1947 (BARROS et al., 1989). Existem registros da doença, em raposas, nos Estados do Ceará (BARROS et al., 1989), Paraíba (OLIVEIRA et al., 2001), Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (ARAÚJO, 2002). No Ceará, são comuns os casos de raiva em animais silvestres, principalmente na raposa (*Dusicyon vetulus*), canídeo comumente encontrado naquela região (BARROS et al., 1989). No semi-árido nordestino, o animal silvestre mais envolvido em agressões à humanos é a raposa. No sertão nordestino, é comum a criação de raposas, como animais de estimação (BARROS et al., 1989).

2.7.4 Saguis (*Callithrix jacchus*)

A família *Callitrichideos* acolhe os menores primatas antropóides do mundo, com peso inferior a 1 Kg e são divididos em quatro gêneros: *Callimico* sp., *Callithrix* sp., *Saguinus* sp., *Leontopithecus* sp. A atividade destes animais é intensa, passam a maior parte do tempo se locomovendo (MIRANDA, 1997) e gastam mais de 60% do dia em atividades de forrageamento (ERWIN e SACKETT, 1990).

O *Callithrix jacchus*, também conhecido como sagui-de-tufo-branco pode ser encontrado em diferentes *habitats*, como a costa Atlântica, a Caatinga da região Nordeste e o Cerrado da região Central (COIMBRA FILHO, 1984). Os saguis-de-tufo-branco alimentam-se de grande variedade de matéria vegetal (sementes, flores, frutos e néctar) e animal (artrópodes, moluscos, filhotes de aves e mamíferos, anfíbios e pequenos lagartos). São gumívoros, alimentam-se da goma que roem com seus incisivos inferiores, de árvores gumíferas (EMMONS e FEER, 1997).

Animais dessa espécie são capturados para serem mantidos como animais de estimação, principalmente na região Nordeste. Os saguis-de-tufo-branco foram introduzidos em várias matas do Brasil. Sua adaptação em outras formações florestais e a intensa utilização desse organismo como “doméstico” terminou por introduzi-lo em vastas áreas do território da América Latina (EMMONS e FEER, 1997; SUSSMAN e KINZEY, 1984). Na região Nordeste, vários casos de raiva humana (n=8) têm sido associados a esse animal, em um dos casos, o animal se aproximou da residência e

atacou um dos moradores. Nos demais casos, os animais eram mantidos como animais de estimação (MORAIS, 1998).

2.7.5 Gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*)

A ordem *Didelphimorphia* é constituída de várias famílias, mas a família *Didelphidae*, a qual inclui gambás, cuícas, jupatis e cuícas-d'água, é exclusivamente americana, e a única com representantes brasileiros, como os gambás e espécies menores, dos gêneros *Metachirus*, *Philander*, *Marmosa*, *Caluromys*, *Monodelphis*, *Lutreolina* e *Chironectes* (CARVALHO, 1995).

Segundo Fonseca et al. (1996) existem três espécies de gambás no Brasil: *Didelphis albiventris*, o qual possui orelhas brancas e pode ser encontrado no Cerrado, na Caatinga e no Pantanal, *Didelphis aurita*, encontrado comumente na Mata Atlântica, e *Didelphis marsupialis*, proveniente da Amazônia, ambos possuem orelhas de cor preta. O gambá pode receber nomes populares em diferentes regiões do Brasil, como sariguê na Bahia, saruê em Minas Gerais, mucura na Amazônia, raposa ou raposinha em São Paulo, Paraná e Santa Catarina (SILVA e ROSSI 2003). Segundo Silva (1984), o que difere as espécies *D. albiventris* e *D. aurita* é apenas a cor do pavilhão auditivo.

Didelphis albiventris é uma das espécies de mamíferos silvestres mais comuns no Brasil Central. Além disso, é frequentemente observada em ambientes antrópicos rurais e urbanos, sendo uma das espécies de mamíferos silvestres de maior contato com humanos. Conforme Silva e Rossi (2003) o gambá é um animal de hábitos noturnos, que se adapta facilmente à presença humana, por isso, pode ser visto com frequência em áreas rurais.

O gambá-de-orelha-preta, *Didelphis aurita* é uma das espécies de marsupiais mais comuns na Região Neotropical. Sua distribuição geográfica abrange a área entre o Estado do Alagoas e o Estado de Santa Catarina, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul, ocorrendo também no Paraguai e na Província de Misiones, na Argentina (CÁCERES e MONTEIRO-FILHO, 2001) podendo ser encontrado em ambientes rurais e urbanos.

Quanto à dieta, ambas as espécies são consideradas generalistas, pois se alimentam de frutos, pequenos vertebrados, ovos, insetos e outros invertebrados. (MARINHO FILHO et al., 1998).

A interação do homem com gambás é antiga: de fato, esses animais resistem bem à ação antrópica no meio ambiente, adaptam-se aos forros das casas, ocos de árvores e

outros abrigos; sobrevivem utilizando restos alimentares do homem. Atualmente, a tendência é de considerá-los como sinantrópicos. E mais, são os únicos mamíferos que permanecem em áreas muito devastadas (JANSEN, 2006).

Segundo Malta e Luppi (2007), os gambás são resistentes ao vírus da raiva, uma vez que após a inoculação em diversos animais, somente alguns apresentaram alterações neurológicas. Após a inoculação de amostras desses animais em camundongos, todos os resultados foram negativos. Experimentos demonstram que esses animais podem ser sensíveis a inoculação do vírus por aerossóis, mas resistentes a inoculação por via intramuscular (BEAMER et al., 1960; CONSTANTINE e WOODALL, 1966; CONSTANTINE, 1967).

Sabe-se que o gambá pode desempenhar papel de reservatório natural do vírus rábico, porém pouco conhecimento se tem a respeito. Diante disso, foi realizado um estudo, apresentado no Capítulo 2, denominado: **Avaliação da circulação do vírus rábico em gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) nos municípios de Torre de Pedra, Bofete e Anhembi – São Paulo**. Esse manuscrito foi redigido de acordo com as normas editoriais da revista Emerging Infectious Diseases (EID) (ISSN 1080-6059) e teve como objetivo analisar a prevalência de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva em 67 gambás capturados em áreas de fragmentos florestais pequenos e grandes na área rural, na região de Botucatu, São Paulo.

CAPÍTULO 2 – TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado a revista Emerging Infectious Diseases (EID). Normas disponíveis em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/>

Evaluation of circulation of rabies virus in opossums (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) in the municipalities of Torre de Pedra, Bofete and Anhembi – São Paulo.

T. S. Bacchiega¹; M. G. Peres¹; L. F. A. Martorelli³; A. P. Kataoka³; C. R. Teixeira²; J. Megid¹

1. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP- Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo, Brazil CEP:18618-970
e-mail: jane@fmvz.unesp.br

2. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP- Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo, Brazil CEP:18618-970

3. Centro de Zoonoses, Laboratório de Zoonose e Doenças por Vetores. Rua Santa Eulalia, 86, São Paulo, São Paulo, Brazil, CEP: 02031-020
(Centro de Zoonoses, Laboratório de Zoonoses e Doenças Vetores)

Abstract

The presence of neutralizing antibodies (NA) against the rabies virus in the serum of the opossum species *Didelphis albiventris* and *Didelphis aurita* was investigated by applying the technique of serum neutralization (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test - RFFIT*). The research was conducted in the cities of Anhembi, Torre de Pedra and Bofete, located in center west of São Paulo. Sera of 67 animals was examined, mostly male adults. The percentage of animals with anti-rabies antibodies was 17.9%. This result shows the circulation of the rabies virus in opossums and is an alert both to the scientific community and the governmental authorities involved in research and control of rabies.

Keywords: neutralizing antibodies, *Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita*, epidemiology, rabies.

Introduction

Canine rabies is controlled in southern and southeastern Brazil and the number of cases has decreased in the rest of the country (15). In the state of São Paulo, southeastern Brazil, the epidemiologic profile of rabies has been observed in the last years, with considerable decrease in cases of dogs and cats, resulting from the vaccination campaigns and increase of the disease in herbivores and wild animals (12). This reality is also observed in other states, mainly in the Northeast, where it is common to rear wild animals, among them foxes (*Dusicyon vetulus*) and marmosets (*Callithrix jacchus*), as pets, although this practice is considered a crime by IBAMA (Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources). The close relation between men and wild animals increases the risk of transmission of rabies to humans and domestic animals. Although there are no reports of opossum (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) as pets in Brazil, the increasing fragmentation of the remaining woods in the outskirts cities has caused the approach of opossums to the urban areas. The restriction of their home area, the reduction of their natural predators and the reproductive success of the species, allied to the great adaptation to the urban environment are the main reasons of the increasing populations of opossum in cities and surroundings (14).

The opossums are frequently observed in rural and urban anthropic environments, being one of the species of wild mammals with greater contact with humans (11). Therefore, the present work aimed to investigate the presence of neutralizing antibodies (NA) for the rabies virus in opossums (*Didelphis albiventris* and *Didelphis aurita*) in the municipalities of Torre de Pedra, Bofete e Anhembi – SP, as a measure of epidemiological surveillance of rabies. These municipalities were chosen due to the cases of rabies in cattle in this region.

Materials and Methods

The experimental protocol approved by the Ethics Committee on Animal Use (n ° 112/2010 CEUA) Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu.

Survey of epidemiological data

In order to investigate the sampled rural properties, epidemiological data were collected. The following risk factors were assessed: the presence of dogs vaccinated against rabies or not, and presence of wild animals (bats and opossums) in the common areas of the property.

Sampled cities

Samples were collected in three cities: Torre de Pedra (23 ° 14'58 .76" S48 ° 11'39 .49" W), Bofete (23 ° 05'54 .51" S48 ° 11'26 .61" W) and Anhembi (22 ° 47'09 .11" S48 ° 07'30 .90" W) (Figure 4). These cities were chosen because of cases of rabies in herbivores (cattle), and the large amount of bat shelters in this region. The sampling used in this study was non-probabilistic convenience and due to the lack of information on the total number of population of opossums and the prevalence of the disease among animals.

Animals

In the period May to September 2012, 52 white ear opossums (*Didelphis albiventris*) (Figure 4A) and black ear 15 opossums (*Didelphis aurita*) (Figure 4B) were captured, yielding a total of 67 animals. For capture, welded steel traps type Tomahawk 150x60x60cm (Brand - Sisbio, 23918-1) were used (Figure 4C), and as bait, fruit and chunks of chicken were used. After capture, the animals were chemically contained with tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride (Zoletil 50 ®) in doses of 5 to 10 mg / Kg (Figure 4D). The blood collection was performed by puncture of the jugular vein with 5 ml syringe and stored in a sterile tube without anticoagulant

(*Vacuttainer*). The animals were identified by shaving of the head (Figure 4E) region. After these procedures and recovery from the anesthetic, the animals were released into the wild again.

The blood was sent to the Department of Veterinary Hygiene and Public Health, UNESP-Botucatu, where he was subjected to centrifugation and the serum was stored in Eppendorf tubes ® at -20 ° C.



Figure 4. A) *Didelphis albiventris* (white ear opossum). B) *Didelphis aurita* (opossum black ear). C) Welded steel trap type Tomahawk. D) Chemical containment of animals. E) Identification of animals with shaving of the head region. Source: personal archive.

Serology

The serum of animals was tested by serum neutralization (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test - RFFIT) (SMITH et al., 1973) in the laboratory of rabies of the Center for Zoonosis Control (CCZ-SP), according to the methodology described by Almeida et al. (2001). Titers of $NA \geq 0,25$ IU/mL were considered positive and titers of $NA < 0.25$ IU / mL were considered negative.

Statistical analysis

For the analysis of the results the test Goodman of contrasts among and within multinomial populations (5%) (9, 10) was used.

Results

Six farms were sampled in the city of Torre de Pedra, 12 in the city of Bofete and 16 in the city of Anhembi (Figure 5). Of the 67 serum samples, 12 (17.9%) ($p < 0.05$), presented NA, eight of them (11.94%) had titers of 0.25 IU / mL, three (4.48%) 0.33 IU/mL and one (1.49%) presented titer of 0.5 IU/mL.

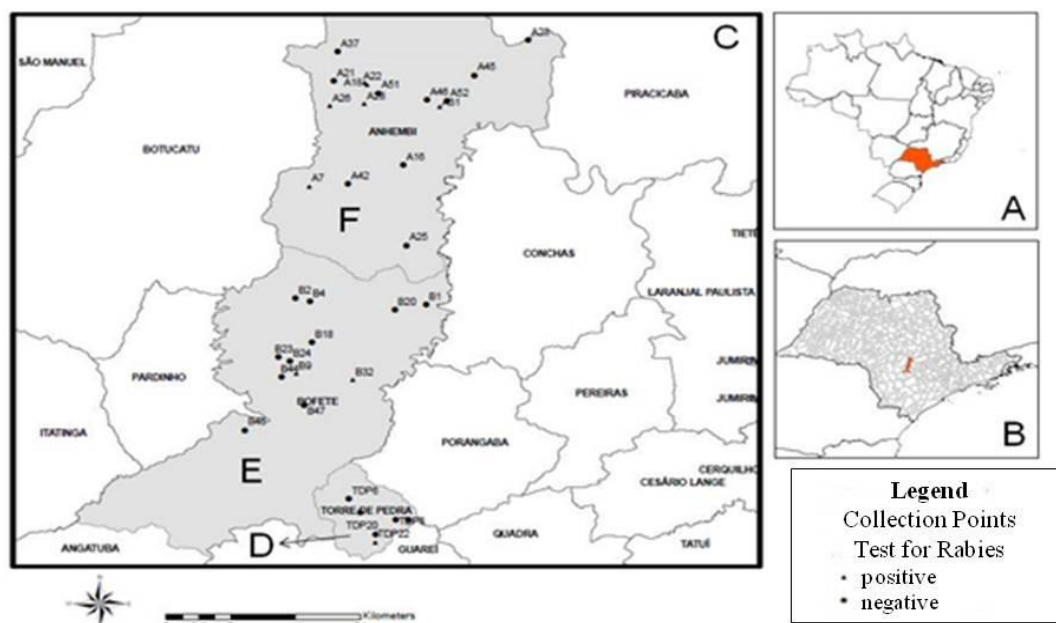


Figure 5. Map of collection sites. A) Map of Brazil with the state of São Paulo in orange. B) Map of the State of São Paulo with Torre de Pedra, Bofete and Anhembi in orange. C) Map of the State of São Paulo showing the collection site; The triangle dots correspond to positive properties for rabies serology and circular dots the negative ones in Torre de Pedra (D), Bofete (E), Anhembi (F). Source: personal archive.

In the city of Torre de Pedra, six animals were captured in different properties, two of the species *Didelphis aurita* and four of the species *Didelphis albiventris* ($p \geq 0.05$), of these, only one was female ($p < 0.05$), four of the animals were adults, one was a young and one was a joey ($p \geq 0.05$), (Table 1). Only one adult male *Didelphis albiventris*, presented NA for rabies ($p < 0.05$), with the titer of 0.25 IU/mL (Table 2).

In the city of Bofete 30 blood samples were collected, of which 13 from the species *Didelphis aurita* and 17 from the species *Didelphis albiventris* ($p \geq 0.05$), of these, six were females and 24 males ($p < 0.05$), in a total of 19 adult animals, 11 young opossums and no joeys ($p < 0.05$) (Table 1). Three samples, two taken on the same property, had titers of 0.25 IU/mL ($p < 0.05$) (Table 3), being one an adult male of the species

Didelphis albiventris. The other positive samples (n = 2) were the animals of the species *Didelphis aurita*, one adult female and one adult male (Table 4).

In the city of Anhembi 31 blood samples were collected, all of them from the *Didelphis albiventris* (p <0.05), these included 17 females and 14 males (p ≥ 0.05) (Table 1). The age distribution showed 54.8% of adult and 45.2% of young animals. Of these, eight animals (p <0,05) (Table 2), from six different properties (Table 3) presented NA to the rabies virus, four samples with titers of 0.25 IU/mL, three with titers of 0.33 IU/mL and one with titer of 0.5 IU/mL.

Table 1. Distribution of species, sex and age, according sampled municipalities.

Item	Municipalities		
	Anhembi	Bofete	Torre de Pedra
Species			
<i>D. albiventris</i>	31(100.00)bB	17(56.67)aA	4(66.67)abA
<i>D. aurita</i>	0(0.00)aA	13(43.33)bA	2(33.33)abA
Total	31	30	6
Sex			
Female	17(54.84)bA	6(20.00)aA	1(16.67)aA
Male	14(45.16)aA	24(80.00)bB	5(83.33)bB
Total	31	30	6
Age			
Adult	17(54.84)aB	19(63.33)aB	4(66.66)aA
Joey	0(0.00)aA	0(0.00)aA	1(16.67)aA
Young	14(45.16)aB	11(36.67)aB	1(16.67)aA
Total	31	30	6

^{a-b} Different lowercase letters in the line and different capital letters in the column differ significantly by Goodman (p<0.05).

Table 2. Distribution of serological classification of NA per sample according to municipality.

Item*	Municipalities		
	Anhembi	Bofete	Torre de Pedra
0	23(74.19)aB	27(90.00)aB	5(83.33)aB
1	8(25.81)aA	3(10.00)aA	1(16.67)aA
Total	31	30	6

*0= Titers <0,25 IU/mL 1= Titers ≥0,25 IU/mL

^{a-b} Different lowercase letters in the line and different capital letters in the column differ significantly by Goodman (p<0.05).

Table 3. Descriptive distribution of serologic classification, by sampled property.

Item*	Municipalities		
	Anhembi	Bofete	Torre de Pedra
0	10(74.19)	10(90.00)	6(83.33)
1	6(25.81)	2(10.00)	1(16.67)
Total	16	12	6

*0= Titers <0,25 IU/mL 1= Titers ≥0,25 IU/mL

With the exception of the city of Anhembi, animals of both species ($p \geq 0.05$), (Table 1) were sampled, between species, there was no difference ($p \geq 0.05$), in the positivity rate (Table 4). With regard to sex, in the cities of Bofete and Torre de Pedra a higher number of males was captured ($p < 0.05$), but the positivity rate did not differ between sexes ($p \geq 0.05$), (Table 4).

More adults and young animals were captured compared to the number of joeys ($P < 0.05$). Among the total number of adults sampled, 25% had neutralizing antibodies to rabies virus, in contrast to 7.69% of the young animals (Table 5).

Table 4. Distribution of serological classification according to species and sex.

Species	Class*		
	0	1	Total
<i>D. albiventris</i>	42(80.77)aB	10(19.23)aA	52
<i>D. aurita</i>	13(86.67)aB	2(13.33)aA	15
Sex			
Female	19(79.17)aB	5(20.83)aA	24
Male	36(83.72)aB	7(16.28)aA	43

*0= Titers <0,25 IU/mL 1= Titers ≥0,25 IU/mL

^{a-b} Different lowercase letters in the line and different capital letters in the column differ significantly by Goodman ($p < 0.05$).

Table 5. Distribution of serological classification according to age

Age	Class*		
	0	1	Total
Adult	30(75.00)	10(25.00)	40
Joey	1(100.00)	0(0.00)	1
Young	24(92.31)	2(7.69)	26

*0= Titers <0,25 IU/mL 1= Titers ≥0,25 IU/mL

Epidemiological data - associations between risk factors and positivity.

In most of the sampled properties the presence of dogs was registered, and 60 opossums were captured on properties that held anti-rabies vaccination of dogs ($p < 0,05$). Among these samples, 10 (16.67%) presented NA to the rabies virus, and from the remaining samples ($n = 7$) collected from farms where vaccination was not practiced two (28.57%) were positive (Table 6).

Regarding the presence of bats and opossums, most samples were collected on properties where the presence of the same was reported, and most of the samples showed no antibodies to the rabies virus ($p < 0,05$). The number of samples taken from properties that reported assaults of bats to domestic animals was similar ($p \geq 0,05$), and the proportion of positive samples did not differ between the properties ($p \geq 0,05$). In both cases, the number of positive samples was lower than negative samples ($P < 0,05$) (Table 6).

Table 6. Distribution of serological classification according to risk factors.

Classification	Class*		Total
	0	1	
Presence of dogs**			
No	1(100.00)	0(0.00)	1
Yes	54(81.82)	12(18.18)	66
Presence of dogs vaccinated against rabies			
No	5(71.43)aA	2(28.57)aA	7
Yes	50(83.33)aB	10(16.67)aA	60
Presence of bats			
No	13(72.22)aB	5(27.78)aA	18
Yes	42(85.71)aB	7(14.29)aA	49
Bats assaulting domestic animals			
No	26(81.25)aB	6(18.75)aA	32
Yes	29(82.86)aB	6(17.14)aA	35

*0= Titers $< 0,25$ IU/mL 1= Titers $\geq 0,25$ IU/mL

** Descriptive distribution

^{a-b} Different lowercase letters in the line and different capital letters in the column differ significantly by Goodman ($p < 0,05$).

Discussion

Serological tests have been used to prove the contact of unvaccinated populations with the rabies virus, indicating that it may occasionally circulate on certain hosts without necessarily cause death, either by inducing infections with long incubation period or by induction to the state of carrier or reservoir (2). In this study we showed that the percentage of animals with NA for the rabies virus was high (17.9%). The opossum is a nocturnal animal and usually has solitary habit; males tend to travel more, especially during the breeding season (13). Stratification by sex showed a predominance of males captured in relation to females, but no difference in the prevalence of NA between the sexes, as found by Almeida et al. (2001). We found a higher number of positive samples from adult animals indicating the animals contact with the virus later in life.

Almeida et al. (2001) conducted a study to determine the prevalence of NA among wild animals captured in the state of São Paulo. Of the species, marsupials accounted for 45% of the total, represented by the species *Didelphis marsupialis*, *D. albiventris* and *Lutreolina crassicaudata*. The prevalence of NA among marsupials was 13%, which is relatively lower than that found in the present study. In addition, Almeida and collaborators reported that among the 32 marsupials that had NA in the serum, 17 opossums had high titers of antibodies (1.1-3.2 IU/mL).

In this study, we found titers below those reported by Almeida et al. (2001), with a maximum titer of 0.5 IU/mL presented by only one animal (1.49%). The remaining animals presented titers among 0.25 IU/mL (11.94%) and 0.33 IU/mL (4.48%). It must be accounted that opossums are less susceptible to the rabies virus, but the infection can develop and produce antibodies (17).

The route of infection of opossums by the virus is unknown and not reported in the literature. Both *D. albiventris* as *D. aurita* have nocturnal habits, they move at floor level, but can reach the treetops with ease (13). These animals are considered synanthropic, adapt well to ceilings of houses, hollows of trees and other shelters. As for food, they are omnivorous and opportunistic, primarily consume invertebrates, birds, seeds and fruits (4). The habitat, eating and behavioral habits can cause the opossums to have contact with bats.

Although the proportion of positive samples was similar between properties that reported the presence of bats, it is speculated that opossums can become infected with the virus on assaults by bats, by ingestion, by sharing food with bats, especially fruit (3), or even by ingestion of them. Gardner et al. (1992) claim that possums may feed on bats opportunistically. Gazarini et al. (2008) were the first to record in Brazil, *Didelphis albiventris* attacks to the bats of the species *Artibeus lituratus* species. Castro et al. (2011) observed an individual of the species *Didelphis marsupialis* preying two individuals of the species *Artibeus planirostris* in mist nets. Contagion by inhalation should also be taken into consideration, since both species use natural (hollows and trees, caves and rocks) and artificial (liners homes and abandoned homes) refuges (8) atmosphere where the virus particles may be dispersed in the air (1). Although, studies are needed involving the genetic characterization of the virus in both species to enable further inferences on the subject.

In Brazil, several cases of human rabies have been attributed to contact with wild animals, especially by the rearing of them as pets (6). Although there is no record of rearing of opossums as pets (1), the progress of cities and the consequent destruction of the natural habitat of these marsupials mean that there is the approach among them and the human species (11). Approximately half of the samples of our work have been

collected on properties that have reported the presence of opossums nearby houses or sheds. Opossums rarely bite humans, although accidents may happen and there may be exposure to the rabies virus, since there is no knowledge of the dynamics of the virus in the species concerned.

The restriction of their home area, the reduction of their natural predators and reproductive success of the species allied to great adaptation to the urban environment are the main reasons for the increasing population of possums in cities and surroundings (14). Currently, the domestic dog can be considered a predator to possums, and encounters between them result in death for the possums. Most animals sampled (66/67) was captured on properties that had the dog as a pet, but not all owners make the anti-rabies vaccination of animals. In assaults, dogs can be bitten by opossums, as a defense of these and thus exposed to the rabies virus.

This study demonstrated that possums have neutralizing antibodies to rabies virus, indicating that the animals had contact with the virus. This finding serves to warn the scientific community and governmental authorities involved in the control of urban and sylvatic rabies, since opossums represent one of the most abundant species of wild mammals of Brazil's ecosystem.

References

1. Almeida MF, Massad E, Aguiar EAC, Martorelli LFA, Joppert AMS. Neutralizing antirabies antibodies in urban terrestrial wildlife in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 2001;37:394–398.
2. Batista HBCR, Franco AC, Roehle PM. Raiva: uma breve revisão. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2007;35:125-144.

3. Beran GW. Rabies and infection by rabies related viruses. In: Beran GW, editor. Handbook of zoonoses, Second Edition, Viral zoonoses. Florida: CRC Press, 1994: 134
4. Cáceres, NC. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum *Didelphis albiventris* in southern Brazil. Studies on neotropical fauna and environment. 2002;37:97-104.
5. Castro IJ, Silva CR, Costa AJS, Martins ACM. Predação oportunista de *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) e *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758) (Chiroptera, Phyllostomidae) por marsupiais e anuro na APA do Rio Curiaú, Amapá, Brasil. Acta Amaz. 2011;41:171-174.
6. Favoretto SR, Mattos CC, Morais NB, Alves Araújo FA, Mattos CA. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. Emerg Infect Dis. 2001;7:1062–65.
7. Gardner AL, Handley CO, Wilson DE. Survival and relative abundance. In: Handley CO, Wilson DE, Gardner AL, editors. Demography and natural history of de common fruit bat, *Artibeus jamaicensis*, on Barro Colorado Island, Panama. Washington: Smithsonian Contribution to Zoology, 1992:53-76.
8. Gazarini J, Brito JEC, Bernardi I. Predações oportunísticas de morcegos por *Didelphis albiventris* no sul do Brasil. Chiroptera Neotropical. 2008;14:408-411.
9. Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrast among multinomial populations. Annals of Mathematical Statistics. 1964;35:716-725.
10. Goodman LA. On Simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. Technometrics. 1965;7:.247-254.

11. Jansen AM. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editors. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: FioCruz, 2006;167-173.
12. Instituto Pasteur. Raiva: aspectos gerais e clínica, São Paulo, Brazil. 2009 Feb 20 [cited 2014 Jul 09]. http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/manual_08.pdf.
13. Loretto D, Vieira MV. The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826). J. Mammal. 2005;86:287–293.
14. Queiroz, LRS. 100 Animais brasileiros. São Paulo: Editora Moderna; 1997.
15. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária. Guia de vigilância epidemiológica, Brasília, Brazil. 2009 Oct 12 [cited 2014 Jul 09]. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_epidemio_2010_web.pdf
16. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bulletin of the World Health Organization, 1973;48:535–541.
17. World Health Organization. WHO Expert Committies on rabies: sixth report, Geneva, Sueden. 1973 Oct 2 [cited 2014 Jul 09]. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_523.pdf

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL

O controle da raiva em animais silvestres tem crescido em complexidade nas últimas quatro décadas e esses animais têm substituído os cães como reservatório primário da doença (DIETZSCHOLD et al., 2008). A dinâmica do vírus rábico entre os animais silvestres parece bem esclarecida em países desenvolvidos, de tal forma que a Suíça conseguiu *status* de livre do vírus com ajuda da vacinação de animais silvestres. No Brasil, não se tem a verdadeira dimensão da raiva silvestre. No nordeste existem muitos casos de raiva transmitida por morcegos hematófagos e também por animais silvestres domesticados e criados como animal de estimação (FAVORETTO et al., 2001).

Pouco se sabe à respeito do papel do gambá no ciclo silvestre na raiva, de qual forma e via ele se infecta e se pode transmitir o vírus à outros animais, incluindo humanos. O que se tem conhecimento é que esses animais são resistentes à inoculação do vírus rábico por via intramuscular, mas apresentam maior sensibilidade pela inoculação nasal de partículas do vírus (BEAMER et al., 1960). A infecção por via digestiva também tem sido admitida para animais silvestres. O fato de esses animais predarem morcegos, de forma oportunista, pode ser um indício da forma de infecção dos mesmos. Embora a predação oportunista não reflita uma relação que ocorra naturalmente entre essas espécies, pode indicar a ocorrência de consumo de um animal com dificuldades de locomoção, situação comumente vista em morcegos acometidos pelo vírus rábico.

O Brasil é um país de grandes extensões geográficas o que permite uma grande diversidade cultural e étnica. Até o momento, não existem registros de criação de gambás como animais de estimação, porém em alguns estados, derivados como gordura (ALVES et al., 2010) e ossos são utilizados como produtos medicinais. Em Natal, Rio Grande do Norte, a carne do gambá é utilizada como tratamento para dores lombares e problemas renais (OLIVEIRA et al., 2010). Em Pernambuco os ossos são usados para tratar osteoporose (ALVES et al., 2009). Esses fatos aliados a questão de que os gambás se adaptam muito bem a presença humana, facilitando assim o contato e possíveis acidentes se tornam de extrema importância do ponto de vista epidemiológico, principalmente após a revelação dos

índices de prevalência de anticorpos neutralizantes para o vírus rábico encontrados nos estudos desenvolvidos na espécie.

CONCLUSÕES GERAIS

O vírus da raiva circula nas espécies *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*.

O índice de prevalência de anticorpos neutralizantes para o vírus rábico é alto quando comparado com outras espécies silvestres conhecidas como reservatórios do vírus rábico (morcegos e primatas não humanos).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N; SZYFRES, B. **Zoonosis enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: Organización Pan americana de La Salud, 2003.

ALVES, R.R.N; OLIVEIRA, M.; DA, G.G; BARBOSA, R.R.D.; LOPEZ, L. C. S. An ethnozoological survey of medicinal plants commercialized in the markets of Campina Grande, NE Brazil. **Human Ecology Review**, v. 17, p. 11-17, 2010.

ALVES, R. R. N.; NETO, N. A. L.; BROOKS, S. E; ALBUQUERQUE, U. P. Commercialization of animal-derived remedies as complementary medicine in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 600-608, 2009.

ARAÚJO, F. A. A. Raiva humana no Brasil: 1992-2001. 2002. 90f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2002.

ARELLANO-SOTA, C. Biology, ecology, and control of the vampire bat. **Review Infectious Disease**, v. 10, n. 4, p. 615-619, 1988.

BAER, G. M.; BELLI W. J.; FISHBEIN, D. B. Rhabdoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Virology**. New York: Raven Press, 1990, p. 883-930.

BAER, G. M. History of the rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W.H. (Ed). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007.

BARROS, J. S.; FREITAS, C. E. A. A. de; SOUSA, F. S. Raiva em animais silvestres no estado do Ceará particularmente na raposa (*Dusicyon vetulus*). **Zoonoses Revista Internacional**, v. 1, n. 1, p. 9-13. 1989.

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 125-144, 2007.

BELLOTO, A.J. Situação da raiva no mundo e as perspectivas de eliminação raiva transmitida pelo cão na América Latina. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. p. 20-21.

BERNARDI, F. et al. 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, n. 11, p. 3153-3162, 2005.

BERTA, A. *Cerdocyon thous*. **Mammalian Specie**, n. 186, p. 1-4, 1982.

BHATNAGAR, K. P. The brain of the common vampire bat, *Desmodus rotundus murinus* (Wagner, 1840): a cytoarchitectural atlas. **Brazilian Journal Biology**, v. 68, n. 3, p. 583-599. 2008.

BLANTON, J.D.; DUSTYN P.; DYER, J, CHARLES, RUPPRECHT, E. Rabies surveillance in the United States during 2010. Public Veterinary Medicine: Public Health. **JAVMA**, v. 239, n. 6, p. 773-783, 2011.

BOTVINKIN, A.D.; POLESCHUK, E.M.; KUZMIN, I.V.; BORISOVA, T.I.; GAZARYAN, S.V.; RUPPRECHT, C.E. Novel lyssavirus isolated from bat in Russia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 1623-1625, 2003.

BRADANE, H.; TORDO, N. Host switching in lyssavirus history from the chiroptera to the carnivora orders. **Journal of Virology**, v. 75, p. 8096-8104, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Controle da Raiva dos Herbívoros**. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2013.

BRAVO, T.C. Investigación documental de la primera epidemia de rabia registrada en la República Mexicana en 1709. **Epoca**, v. 20, n. 6, p. 705-716, 1978.

CÁCERES, N.C.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Food habits, home and activity of the common opossum (*Didelphis marsupialis*) in a forest fragment of southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 36, n. 2, p. 85-92, 2001.

CARDOSO, T.C. et al. Rabies neutralizing antibody detection by indirect imunoperoxidase serum neutralization assay performed on chicken embryo related cell line. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 531-534, 2004.

CAREY, A.B. Multispecies rabies in the Easter United States. In: BACON, P.J. **Population dynamics of rabies in wildlife**. Orlando: Academic Press, 1985. p. 23-41.

CARNIELI JUNIOR, P. et al. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **The Virus Research**, v. 120, n. 1-2, p. 113-120, 2006.

CARNIELI JUNIOR, P. et al. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **The Virus Research**, v. 131, n. 1, p. 33-46, 2008.

CARRIERI, M.L. et al. Canine and feline rabies in the Espírito Santo do Pinhal City, São Paulo, transmitted bay bats. **Virus Reviews and Research**, v. 6, p. 176, 2001.

CARVALHO, J.C.M. **Atlas da fauna brasileira**. São Paulo: Companhia Melhoramentos, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION CDC. Human rabies - Mississippi. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 55, n. 8, p. 207–208, 2005.

CLIFTON, M. How not to fight a rabies epidemic: a history in Bali. **Asian Biomed**, v. 4, p. 663–670, 2010.

COIMBRA FILHO, A.F. Situação atual dos calitriquídeos que ocorrem no Brasil. In: MELLO, M.T. (Ed). **A primatologia no Brasil**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Primatologia, 1984. p. 15-33.

CONSTANTINE, D.G.; WOODALL, D.F. Transmission experiments with bat rabies isolates: reactions of certain Carnivora, opossum, rodents, and bats to rabies virus of red bat origin when exposed by bat bite or by intramuscular inoculation. **American Journal Veterinary Research**, v. 27, n. 116, p. 24–32, 1966.

CONSTANTINE; D.G. Rabies transmission by air in bat caves. Washington: **US Public Health Service**, 1967. p. 1-51 (Publicacion, 1617).

DA ROSA, E.S. et al. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1197-1202. 2006.

DEAN, D.J.; BAER, G.M.; THOMPSON, W.R. Studies on the Local Treatment of Rabies- Infected Wounds. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 28, p. 477-86, 1963.

DIETZSCHOLD, B.; LI, J.; FABER, M.; SCHNELL, M. Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virology*, v. 3, n. 5, p. 481–490, 2008.

DUARTE, L.; DRAGO, M.C. **A raiva**. 2005. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Universidade de Évora, Portugal, 2005.

EIDSON, M. et al. Rabies virus infection in a pet guinea pig and seven pet rabbits. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 227, p. 932–935, 2005.

EMMONS, L.H.; FEER, F. Monkeys (primates): Neotropical rain-forest mammals, a field guide. 2. ed. Chicago: University of Chicago Press, 1997. p. 105-145.

ERWIN, J.; SACKETT, G.P. Effects of management methods, social organization, and physical space on primate behavior and health. *American Journal o Primatology*, v. 20, p. 23-30, 1990.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF J.; DESSELBERGER U.; BALL, L.A. **Virus taxonomy**: Report of the Intenational Committee on Taxonomy of Viruses. Sand Diego: Academic Press, 2007.

FAVORETTO, S.R. et al. Antigenic Typingof, Brazilian rabies vírus samples isoled From animals and humans, 1989 – 2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 91-95, 2000.

FONSECA, G.A.B.; HERRMANN, G.; LEITE, Y.L.R.; MITTERMEIER, R.A.; RYLANDS, A.B.; PATTON, J.L. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. 2. ed. Arlington: Conservation International & Fundação Biodiversitas, 1996 (Occasional paper, n. 4).

GOMES, M.N.; UIEDA, U.; LATORRE, M.R.D.O.. Influência do sexo de indivíduos da mesma colônia no controle químico das populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 38-43, 2005.

GONÇALVES, C.A. Controle de populações de morcegos hematófagos no Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto Pasteur**, v. 1, n. 2, p. 45-49. 1996.

GONÇALVES, M.S.A.; NETO, R.S.; BRAZIL, T.K. Outbreaks and agressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats on northeastern Brazil. Revista **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 461-464. 2002.

IWASAKI, Y. Spread of virus within the central nervous system. In: **The Natural History of Rabies**. Boca Raton: CRC Press, p. 121-132. 2000.

JACOB, Y.; BADRANE, H.; CECCALDI, P.E.; TORDO, N. Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. **Journal Virology**, v. 74, n. 21, p. 10217-22. 2000.

JANSEN, A.M. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cúcas. ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FioCruz, 2006. p. 167-173.

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

KISSI, B.; TORDO, N.; BOURHY, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. **Virology**, v. 209, n. 2, p. 526-537, 1995.

KNOBEL, et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 5, p. 360-368, 2005.

KOTAIT, I. et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 2-8, 2007.

KUSMIN, I.V.; OCIARI, L.A.; ARAI, Y.T.; SMITH, J.S.; HALON, C.A.; KAMEOKA, Y. e RUPPRECHT, C.E. Bat lyssavirus (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G genes sequences. **Virus Research**, v. 97, p. 65-79. 2003.

LORD, R.D. Seasonal reproduction of vampire bats and its relation to seasonality of bovine rabies. **Journal Wild Diseases**, v. 28, n. 2, p. 292-294, 1992.

MACDONALD, D.W. Rabies and wildlife. A biologist's perspective. In: MACDONALD, D.W. **Rabies and wildlife: a biologist's perspective**. Oxford: Earth Resources Research Limited, Oxford University Press, 1980. 151p.

MALTA, M.C.C.; LUPPI, M.M. Marsupialia – Didelphimorphia (Gambá, Cuíca) In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

MARINHO FILHO, J.; RODRIGUES, F.H.G.; GUIMARÃES M.M. **A Fauna de Vertebrados da Estação Ecológica de Águas Emendadas**. Brasília: Sematec, 1998.

MAYR, A.; GUERREIRO, M.G. **Virologia Veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Sulina, 1972. p. 437.

MESSENGER, S.L. et al. Emerging pattern of rabies deaths and increased viral infectivity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 151–154, 2003.

MIRANDA, G.H.B. Observações preliminares sobre a atividade do mico estrela (*Callithrix penicillata*), no cerrado denso e cerradão da reserva ecológica do IBGE, Brasília, DF. In: LEITE; L.L.; SAITO, C. H. **Contribuição ao conhecimento ecológico do cerrado**. Brasília: UCL-UnB, 1997. 325p.

MORAIS, N.B. Wild rabies in Ceará and its implications for public health. Virus: reviews and research. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 1998, São Lorenzo. **Proceedings...** v. III, São Lorenzo, Mato Grosso, 1998. v. 3, suppl. 1.

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

NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. Compendium of animal rabies prevention and control. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, p. 833-40, 2007.

OLIVEIRA, E.S.; TORRES, D.F.; BROOKS, S.E.; ALVES, R.N.N. The Medicinal Animal Markets in the Metropolitan Region of Natal City, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 54-60, 2010.

OLIVEIRA, A.G.F. et al. Comportamento biológico de amostras de vírus rábico isoladas de raposa (*Dusicyon vetulus*), na região do semi-árido do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, **Anais...** 28., 2001, Salvador.

OPORTO, J.S. et al. Manual de zoonoses. CRMW-PR, 2009. v. 1, 1. ed. Disponível em: <www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos>. Acesso em: 22 ago. 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Vigilancia epidemiologica de la rabia en las Americas**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA, 1999. (Boletim, v. 31).

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Vigilancia epidemiologica de la rabia en las Americas**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA, 2002. (Boletim, v. 34).

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Vigilancia epidemiologica de la rabia en las Americas**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA, 2003. (Boletim, v. 35).

PASTEUR, L. Resultats de l'application de la methode pour prevenir la rage apre`s morsure. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, 1886.

PASTORET, P.P.; BROCHIER, B. Epidemiology and elimination of rabies in Western Europe. **The Veterinary Journal**. v. 156, p. 83-90, 1998.

PEIXOTO, Z.M.P. et al. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31. n. 1. p. 72-75, 2000.

PERACCHI, A.L.; LIMA, I.P.; REIS, N.R.; NOGUEIRA, M.R.; FILHO, H.O. Ordem Chiroptera. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 2006. p. 162-164.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**. Ordem Chiroptera. Ribeirão Preto: Ed. Logos, 2007. 212 p.

ROEHE, P.M.; PANTOJA, L.D.; SHAEFER, R.; NARDI, N.B.; KING, A.A. Analysis of brazilian rabies virus isolated with monoclonal antibodies to *Lyssavirus* antigens. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 288-292. 1997.

RUPPRECHT, C.E. et al. The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 4, p. 107-114, 1995.

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

RUSCHI, A. Dois casos de sanguivorismo de *Desmodus Rotundus* e *Dyphilla eucaudata spix*, no homem e outras observações sobre quirópteros hematófagos e acidentalmente hematófagos. **Boletim do DIPAN**, v. 6, p. 6-16. 1957.

SATO, G. et al. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. **Archive of Virology**, v. 151, n. 11, p. 2243-2251, 2006.

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

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de vigilância epidemiológica**.

7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em:<

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_epidemio_2010_web.pdf

SHANKAR, V.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSK, H. Direct entry of rabies virus into central nervous system without prior local replication. **Journal of Virology**, v. 63, p. 2736-2738. 1991.

SILVA, F. **Mamíferos Silvestres**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 1984. 246 p.

SILVA, J.; ROSSI, R.V. Gambá. 2003. Disponível em: <www.editorasaraiva.com.br>. Acesso em: 10 out. 2012.

SILVA, L.P. **Desequilíbrio ecológico e a raiva dos herbívoros no município de Luis Alves**. 2000. 24 f. Monografia (Especialização em Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2000.

SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody **Bulletin of the World Health Organization**, v. 48, p. 535-541, 1973.

SMITH, J.S. et al. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 296–307, 1992.

SOUZA, J.C.P.S.; GITTI, C.B.; NOGUEIRA FILHO, V.S. **Curso sobre controle da raiva silvestre (*D. rotundus*) no Brasil**. Rio de Janeiro: Organização Pan-Americana da Saúde, 2007. Disponível em: <<http://ww3.panaftosa.org.br/Comp/MAPA/29314.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2013.

STEELE, J.H.; FERNANDEZ, P.J. History of rabies and global aspects. In: BARE, G.M. (Ed). *The Natural History of Rabies*. 2. Boca Raton: **CRC Press**, 1991. p. 1–26.

SUSSMAN, R.W.; KINZEY, W.G. The ecological role of Callitrichidae: a review. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 64, p. 419-449. 1984.

SWANEPOEL, R. Rabies. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. **Infection diseases of livestock**. 2. ed. Cape Town: Oxford University Press, 2004. v. 2. cap.99, p.1123-1182.

TADDEI, V.A. Morcegos: algumas considerações sistemáticas e biológicas. **Boletim Técnico – Cati**, v. 172, p. 1-31. 1983.

UIEDA, W. Biologia e dinâmica populacional de morcegos hematófagos. In: **Curso de Atualização em raiva dos herbívoros**, 2., 1996, Curitiba. **Anais...** v. 2, p. 63 – 87.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, VERONESI, R.; FOCACCIA, R. In: *Tratado de infectologia*. São Paulo: **Atheneu**, 1997. v. 2. 1764p.

WADA, M.Y.; OLIVEIRA, A.A.; TEIXEIRA, T.S.; SILVA, A.C.S.; PEREIRA, L.R.M.; OLIVEIRA, R.C. Ascensão da Raiva silvestre no Brasil. In: 44 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2008. Disponível em: <http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/eventos/posteres/2008/rsbmt_4supl.1/154.pdf> Acesso em 5 out. 2013.

WILKINSON, G.S. Social organization and behavior. In: GREENHALL, A.M., SCHIMIDT, U. (Eds.). **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press, 1988. p. 85-97

WILKINSON, L. History of rabies. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, H. (Ed.). **Rabies**. New York: Academic Press, 2002. p. 1-22.

WIMSATT, W.A.; GUERRIERE, A. Observations on the feeding capacities and excretory functions of captive vampire bats. **Journal Mammalian**, v. 43, p. 17-18, 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Consultation on Rabies. Geneva: WHO, 2007. (Technical Report Series, 931). Disponível em: <http://www.who.int/Rabies/ExpertConsultationOnRabies/pdf>. Acesso em: 04 abr. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies vaccines position paper. **The Weekly Epidemiological Record**, v. 32, n. 85, p. 309–320, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Essential rabies maps**. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: http://www.who.int/rabies/rabies_maps/en/. Acesso em: 7 mar. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies. Geneva: WHO, 2001. p. 51-56. (Fact sheets, n.99).