

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE
(PCR) PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS RÁBICO EM AMOSTRAS
ANIMAIS ARMAZENADAS POR DIFERENTES PERIODOS E
SUBMETIDAS À DECOMPOSIÇÃO.**

DANIELLE BASTOS ARAUJO

**BOTUCATU – SP
Junho 2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE
(PCR) PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS RÁBICO EM AMOSTRAS
ANIMAIS ARMAZENADAS POR DIFERENTES PERIODOS E
SUBMETIDAS À DECOMPOSIÇÃO**

DANIELLE BASTOS ARAUJO

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

Orientadora: Profa. Dra. Jane Megid

**BOTUCATU – SP
Junho 2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Araújo, Danielle Bastos.

Avaliação da reação em cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção do vírus rábico em amostras animais armazenadas por diferentes períodos e submetidas à decomposição / Danielle Bastos Araujo. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientadora: Jane Megid

Assunto CAPES: 50502034

1. Raiva - Diagnóstico 2. Vírus - Técnica

CDD 616.953

Palavras-chave: Decomposição; Diagnóstico; Estudos retrospectivos; heminested RT-PCR; PCR; Raiva; Vírus rábico.

**Este trabalho é dedicado aos meus pais Emilson Araujo e Mara Bastos
Araujo por tudo o que fizeram por mim. Desde sempre...**

AGRADECIMENTOS

À todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na conclusão dessa importante etapa.

À toda minha família, avós, irmãos, tios e principalmente à minha tia Katty Bastos pela ajuda durante todos esses anos de estudo.

À minha orientadora Profa. Dra. Jane Megid pela oportunidade, orientação e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ - Unesp por ceder as amostras utilizadas neste trabalho e o laboratório onde realizei a fase inicial do experimento.

À Dra. Marilene F. de Almeida do Centro de Controle de Zoonoses - CCZ - de São Paulo por ceder parte das amostras utilizadas neste projeto.

À Dra. Adriana Cortez do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP sempre disponível para a solução das minhas dúvidas.

Ao pós-graduando Rodrigo Costa da Silva do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses do Departamento da Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ - Unesp pela grande ajuda no desenvolvimento do projeto piloto.

À Professora Luzia Aparecida Trinca do Departamento de Bioestatística da Unesp – Campus de Botucatu pela ajuda na estatística para o desenvolvimento do projeto e análise dos dados.

Às amigas, Janaina Biotto Camargo, Marcela Mendes Ribeiro, Vitória Gonçalves de Souza e Juliana G. Machado e Acácia Elias pelo apoio, amizade e risadas durante os anos de mestrado, e também os de graduação.

Aos amigos e pós-graduandos Vanessa Riezs Salgado, Nair Cavalcanti de Lira, Cristiane Nozaki e Francisco Feliciano Júnior pela ajuda no laboratório e também fora dele.

À todos os pós-graduandos e residentes do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública: Luciana, Camile, Gustavo, Patrícia, Juliano, André, Tatiana, Simone, Haroldo, Amanda, Andreza, Audrey, Taís, Ana Paula, Wellington, Cátia, Luciano, Marcela, Melissa e Roberto pelo companheirismo durante todo esse tempo.

Ao médico veterinário Francisco Pereira Neto e aos funcionários do Escritório de Defesa Agropecuária de Botucatu: Roberto Augusto dos Santos, Sueli e Adalberto Bogatti pelo auxílio durante o convênio no município de Pereiras.

Às amigas Nadiege Amaral, Silvana Cunha, Priscila Marta Andrini e aos funcionários da Casa da Agricultura e Prefeitura do Município de Pereiras por toda a ajuda e amizade no período que trabalhei nesse município.

Aos professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ – Unesp: Antonio Carlos Paes, Marcio Garcia Ribeiro, Luis Carlos de Souza e Paulo Francisco Domingues, que me acompanham desde a graduação.

Aos funcionários do departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ - Unesp: Jairo Zucari, Benedito, Fernando, Adriana Pavan, Rita, Mércia, Dora, Rodrigo Carrera, Pardal, José Wanderlei Forlin e Sérgio Fávero pela disposição em ajudar em diversos momentos.

Às funcionárias Selma Maria e Meire da Biblioteca do Campus de Botucatu da Unesp, pelas correções das referências e confecção da ficha catalográfica.

Às funcionárias da seção de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, Denise A. Fioravante Garcia, Maria Regina T. Forlin e Maria A. Manuel, por serem sempre atenciosas e prestativas.

À FUNDUNESP pelo auxílio pesquisa cedido para a realização deste projeto.

Danielle Bastos Araujo

Avaliação da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção do vírus rábico em amostras animais armazenadas por diferentes períodos e submetidas à decomposição

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação Sanidade Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp – Campus de Botucatu para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: 21/06/2007

Banca Examinadora

Prof. Titular Hélio Langoni

Ass.

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

Ass.

Prof. Dra. Jane Megid

Ass.

SUMARIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVOS GERAIS	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. MATERIAIS	34
4.1.1. AMOSTRAS	34
4.1.2. CONTROLES	34
4.1.3. ENZIMAS	35
4.1.4. PRIMERS	35
4.2. MÉTODOS	36
4.2.1. MACERADOS	36
4.2.2. EXTRAÇÃO DO RNA	36
4.2.3. OBTENÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)	37
4.2.4. AMPLIFICAÇÃO	38
4.2.5. HEMINESTED	38

	PÁGINA
4.2.6. ELETROFORESE	39
4.2.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
4.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5. RESULTADOS	42
5.1. RESULTADOS GLOBAIS	42
5.2. RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5.2.1. AMOSTRAS DESCONGELADAS	52
5.2.2. AMOSTRAS EM DECOMPOSIÇÃO	52
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- FIGURA 1.** Eletroforese das amostras submetidas à Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) e heminested RT-PCR pra o diagnóstico da raiva.

44

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

- TABELA 1.** Resultados comparativos entre os testes de Imunofluorescência Direta (IFD), Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC), “Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR), “Heminested RT-PCR” (hnRT-PCR) e Total de Amostras Positivas para as Técnicas Moleculares na detecção do vírus rábico em amostras cerebrais congeladas por diferentes períodos, descongeladas e submetidas à decomposição. Botucatu, 2007. 43
- TABELA 2.** Resultados comparativos das provas de “Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) “Heminested RT-PCR” (hnRT-PCR) e Total de Amostras Positivas para as técnicas moleculares nas amostras cerebrais de diferentes espécies animais, previamente positivas, congeladas por diferente períodos, descongeladas e submetidas à decomposição considerando-se o ano de congelamento. Resultados expressos em número de amostras positivas/ total de amostras analisadas (porcentagem). Botucatu, 2007. 47

- TABELA 3. Espécies animais, local de procedência, resultados das provas de Imunoflorescência Direta (IFD), Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC), “Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) e “Heminested RT-PCR (hnRT-PCR) utilizadas para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais de animais congeladas por diferentes períodos, descongeladas e submetidas à decomposição. Botucatu, 2007. 48**
- TABELA 4. Resultados da “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) segundo o resultado da Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC) para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais mantidas em congelamento por diferentes períodos. Botucatu, 2007 53**
- TABELA 5. Resultados da “Heminested Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (hnRT-PCR) segundo o resultado da Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC) para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais mantidas em congelamento por diferentes períodos. Botucatu, 2007 54**

TABELA 6. Resultados da “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) segundo o resultado da Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC) para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais em decomposição. Botucatu,2007	54
TABELA 7. Resultados da “Heminested Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (hnRT-PCR) segundo o resultado da Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC) para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais em decomposição. Botucatu, 2007.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.C. – Antes de Cristo

C.V.S. – Challenge Virus Strain

DEPC – Dietil pirocarbonato

DNA – Ácido desoxiribonucleico

°C – Graus Centígrados

hnRT-PCR – Heminested Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

IFD – Imunofluorescência Direta

IC – Inoculação em camundongos

mM –Milimolar

nm - nanômetro

OIE – Organisation Mondiale de la Santé Animale (Organização Mundial de Sanidade Animal)

pmols – picomols

RNA - Ácido ribonucleico

RT-PCR – Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

U – Unidades

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

µL – Microlitros

ARAUJO, D.B. **Avaliação da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção do vírus rábico em amostras animais armazenadas por diferentes períodos e submetidas à decomposição.** Botucatu, 2007, 74p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A utilização de métodos sensíveis e específicos para o diagnóstico da raiva constitui uma importante ferramenta para o controle e profilaxia dessa enfermidade. A Reação em Cadeia pela Polimerase através de Transcriptase-Reversa (RT-PCR) tem sido utilizada com bons resultados no diagnóstico do vírus rábico, mesmo quando as amostras estão em estágio de decomposição. Adicionalmente as técnicas moleculares têm sido utilizadas para estudos epidemiológicos possibilitando um melhor conhecimento da epidemiologia viral. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as técnicas de RT-PCR e hnRT-PCR para a detecção do vírus rábico em estudos retrospectivos, para isso foram avaliadas 101 amostras cerebrais de diferentes espécies animais armazenadas por diferentes períodos, recém-descongeladas e mantidas em temperatura ambiente por 72 horas para decomposição. Os resultados das técnicas de RT-PCR e hnRT-PCR foram comparados com resultados prévios da Imunofluorescência Direta (IFD) e Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC). Das 50 amostras positivas testadas, 26 (52%) apresentaram resultados positivos para a RT-PCR e 45 (90%) com a associação da hnRT-PCR quando realizadas em amostras recentemente descongeladas. Das amostras em decomposição foram analisadas 48 previamente positivas; onde 17 (34,3%) apresentaram resultado positivo para a RT-PCR e 36 (75%) com a associação da hnRT-PCR. Não foram encontrados resultados falso-positivos nas amostras negativas submetidas às técnicas de biologia molecular. A hnRT-PCR apresentou maior sensibilidade em relação à RT-PCR nas amostras recém-descongeladas e em decomposição. Os resultados sugerem a viabilidade de sua aplicação em estudos retrospectivos em materiais descongelados e decompostos.

Palavras-chave: Decomposição, Estudos retrospectivos, Heminested RT-PCR, PCR, Raiva, Vírus rábico.

ARAÚJO, D.B. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) in detection of rabies virus in animal samples stored for different periods and submitted to decomposition. Botucatu, 2007. 74p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The use of methods, both sensitive and specific, for rabies diagnosis are important tools for the control and prophylaxis of the disease. Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) has been used in rabies diagnosis with good results, even in decomposed materials. Additionally, molecular techniques have been used for epidemiological studies and better knowledge of viral epidemiology. The aim of this work was to evaluate the RT-PCR and hnRT-PCR in rabies virus detection in retrospective studies. RT-PCR and hnRT-PCR were evaluated in 151 brain samples from different animal species, thawed and left at room temperature for 72 hours for decomposition. The RT-PCR and hnRT-PCR results were compared with previous results from Fluorescent Antibody Test and Mouse Inoculation Test. From the 50 positive fresh samples, 26 (52%) were positive for RT-PCR and 45 (90%) for hnRT-PCR. From the 48 positive decomposed samples, 17 (35, 3%) were positive for RT-PCR and 36 (75%) for hnRT-PCR. No false-positives results were found in the negative samples submitted to the molecular techniques. These results show that the hnRT-PCR was more sensitive than RT-PCR, and both techniques presented lower sensitivity in decomposed samples. The hnRT-PCR presented greater sensitivity than the standard techniques (IFD e IC) in decomposed materials for rabies diagnosis. These results suggest the viability of the application of molecular techniques in thawed and decomposed materials for retrospective studies.

Key-words: Decomposition, Heminested RT-PCR, PCR, Rabies, Rabies virus, Retrospective studies.

1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade infecto-contagiosa de caráter zoonótico responsável por milhares de mortes de seres humanos e animais em todo o mundo. A utilização de métodos diagnósticos sensíveis e específicos, e a caracterização epidemiológica do vírus rábico são importantes ferramentas para seu controle e profilaxia. A técnica de RT-PCR tem sido utilizada com êxito no diagnóstico da raiva, mesmo nas amostras em estado deficiente de conservação, possibilitando adicionalmente a caracterização epidemiológica do vírus através da análise de seus produtos. Este trabalho pretendeu avaliar as técnicas de RT-PCR e heminested RT-PCR para a detecção do genoma do vírus rábico em amostras animais armazenadas por diferentes períodos e submetidas à decomposição.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A raiva é uma enfermidade de origem viral, caráter zoonótico, que cursa com sintomatologia nervosa e praticamente 100% de letalidade. A transmissão ocorre por meio de mordeduras e arranhões em contato com a saliva de animais infectados podendo, também, ocorrer a infecção pela inalação de partículas virais. É responsável anualmente por cerca de 55.000 mortes e 10 milhões de tratamentos pós-expositivos em todo o mundo (WHO, 2006).

É considerada uma das mais antigas enfermidades noticiadas em humanos. Sua correlação com a mordida de “cachorros loucos” é relatada no código de Eshmuna na Babilônia no século 24 a.C. (RUPPRECHT et al., 2002), porém somente no século 19 obteve-se a confirmação de seu modo de transmissão, época também em que Louis Pasteur desenvolveu a primeira vacina anti-rábica através da obtenção do vírus fixo por atenuação do vírus de rua (KOPROWSKI, 1995).

O agente etiológico da raiva é um RNA vírus pertencente a ordem *Mononegavirales*, ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae* (PRINGLE, 1991). Apresenta forma cilíndrica (projétil) com diâmetro de 45 a 100 nm e comprimento de 100 a 430 nm, revestido por um envelope constituído de uma membrana lipoprotéica apresentando projeções de glicoproteína viral. Possui RNA de fita simples, linear, não segmentado e com polaridade negativa (WOLDEHIWET, 2002).

O RNA viral compreende cinco genes que codificam cinco diferentes proteínas. A Nucleoproteína (N), altamente conservada, essencial para a propagação viral e um importante alvo para diagnóstico; a glicoproteína (G) que participa da adsorção viral e funciona como um alvo para a produção de anticorpos neutralizantes; a polimerase (L) que participa da síntese do RNA viral; a fosfoproteína (P) importante na replicação, transcrição e transporte axoplasmático e a proteína de membrana (M) ou matriz proteína (RUPPRECHT et al., 2002).

Através do sequenciamento e da análise do gene que codifica a nucleoproteína estabeleceu-se a classificação do gênero *Lyssavirus* em seis diferentes genótipos. No genótipo 1 encontram-se as cepas clássicas dos vírus rábicos, e nos cinco demais os chamados “vírus rábicos relacionados”; *Lagos Bat Virus* (genótipo 2), *Mokola Virus* (genótipo 3), *Duvenhage Virus* (genótipo 4), *European Bat Lyssaviruses* - EBL1 (genótipo 5) e EBL2 (genótipo 6) (BOURHY et al.,1993).

Em 1996 sugeriu-se a existência de um sétimo genótipo, *Australian Bat Lyssavirus* (ABL), isolado de morcegos frugívoros na Austrália (GOULD et al., 1998); e mais recentemente considera-se a existência de quatro novos genótipos: *Aravan*, *Khujand*, *Irkut* e *West Caucasian Bat Virus* (VÁSQUEZ-MÓRON et al., 2006), perfazendo um total de 11 genótipos para o vírus rábico.

A sequência de aminoácidos encontrada na proteína N é a mais conservada entre os diferentes genótipos. Por esse motivo, o gene N é o mais analisado nos estudos filogenéticos do vírus rábico (BOURHY et al.,1993), embora o gene responsável pela codificação da glicoproteína (gene G) também seja bastante estudado em razão de suas propriedades antigênicas.

A análise da seqüência do gene que codifica a glicoproteína (G) descrita por Badrane et al. (2001), mostrou evidências de que os *Lyssavirus* podem ainda ser divididos em dois filogrupos com diferentes características de patogenicidade e imunogenicidade. No primeiro filogrupo encontram-se os genótipos 1, 4, 5, 6 e 7, enquanto o segundo filogrupo compreende os genótipos 2 e 3. Os vírus representantes do primeiro filogrupo demonstraram ser patogênicos em camundongos através de inoculação por via intracerebral e intramuscular, enquanto os vírus do segundo filogrupo apresentaram patogenicidade apenas através da via intracerebral.

Todos os mamíferos são susceptíveis ao vírus, em especial os da ordem *Carnivora* e *Chiroptera*. Os cães e gatos são os agentes do ciclo urbano da raiva. No ciclo silvestre, que acomete principalmente animais silvestres e de criação, os animais que atuam como reservatórios e transmissores variam de

acordo com a região (WOLDEHIWET, 2002). Na América Latina os morcegos hematófagos são os principais responsáveis pelo ciclo silvestre, provocando importantes perdas econômicas (ARELLANO-SOTA, 1988) e se caracterizando como importantes transmissores da raiva humana (DE MATTOS et al., 1999; WARNER et al., 1999; Rosa et al., 2006; SATO et al., 2006).

Atualmente os morcegos não hematófagos vêm apresentando uma importância emergente (FAVI et al., 2002). No Brasil, variantes do vírus rábico foram isoladas não apenas dos morcegos hematófagos, mas também de morcegos frugívoros e insetívoros (CUNHA et al., 2005; LANGONI et al., 2005). Até o presente momento, no entanto, não existem relatos de casos de infecção humana por variantes de morcegos insetívoros (KOBAYASHI et al., 2005).

O programa de vacinação anti-rábica anual para cães e gatos permitiu o controle do ciclo urbano. Foi registrado um decréscimo de 82% nos casos de raiva em humanos entre os anos de 1993 e 2002 nas Américas (BELOTTO et al., 2005). No entanto, o ciclo silvestre vem adquirindo importância cada vez maior. No ano de 2004 foram registrados 29 casos de raiva em humanos no Brasil sendo que 23 destes foram transmitidos por morcegos hematófagos. E em 2005 todos os casos de raiva animal registrados no Estado de São Paulo foram diagnosticados em animais de interesse econômico ou animais silvestres (INSTITUTO PASTEUR, 2006a-b). Esse aumento do número de casos no ciclo silvestre pode resultar no acometimento de diversas espécies animais e até mesmo humanos, além de acarretar em grandes prejuízos econômicos (DE MATTOS et al., 1999; SCHAEFER et al., 2002; ROMJIN et al., 2003).

O vírus rábico apresenta caráter neurotrópico e provoca uma infecção aguda no sistema nervoso central. O vírus pode se replicar nas fibras musculares no local da lesão antes de atingir os nervos periféricos, de onde migra até o sistema nervoso central através dos neurônios motores e sensoriais. Ao atingir o sistema nervoso central ocorre uma intensa replicação seguida pela migração centrífuga a partir da qual o vírus pode ser encontrado nas glândulas salivares, humor aquoso e pele (KOPROWSKI, 1995).

A enfermidade é caracterizada por uma disfunção progressiva do sistema nervoso central, e deve fazer parte do diagnóstico diferencial de qualquer paciente com sinais de comprometimento neurológico. Para o diagnóstico deve-se considerar a história clínica, epidemiologia e sintomatologia. O diagnóstico definitivo, porém, só pode ser realizado através de exames laboratoriais, que devem ser rápidos, sensíveis, específicos e de baixo custo.

A primeira prova laboratorial para o diagnóstico da raiva a ser utilizada foi a pesquisa de inclusões citoplasmáticas, os Corpúsculos de Negri, em células nervosas descrita por Sellers e Fellow em 1927. A presença dos Corpúsculos de Negri é patognomônica, mas a detecção de sua presença através das técnicas de histopatologia é possível em somente 50 a 80% dos animais positivos (WOLDEHIWET, 2005).

Essa técnica foi então substituída pela Imunofluorescência Direta (IFD) descrita por Goldwasser e Kisling em 1958. A IFD é até hoje o procedimento mais utilizado para a detecção do vírus rábico, devido ao fato de ser rápida, de baixo custo e simples de ser realizada; além de apresentar elevada sensibilidade (BOURHY et al., 1989).

Um único teste, no entanto, com resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção. Por isso a IFD deve ser realizada simultaneamente com a inoculação do material suspeito, por via intracerebral (IC), em camundongos de 3 a 4 semanas de idade (OIE, 2004). O método da IC foi desenvolvido por Webster e Dawson em 1935 e é capaz de detectar pequenas quantidades de vírus rábico, permitindo seu isolamento para posteriores estudos. O isolamento viral em culturas celulares, como células de neuroblastoma de camundongos (N2A), pode ser utilizado com a mesma finalidade (RUDD e TRIMARCHI, 1989).

A Organização Mundial da Saúde (WHO) recomenda os métodos de IFD e de IC ou isolamento viral em culturas celulares para o diagnóstico da raiva. A IC deve ser realizada em paralelo com a IFD e a técnica de imunofluorescência

deve ser ainda utilizada para a confirmação dos resultados positivos da IC (WHO, 1992).

Embora a técnica de IFD seja a técnica padrão para o diagnóstico da raiva, em razão de todas as vantagens já citadas, sua sensibilidade fica prejudicada quando a amostra se apresenta em um estado deficiente de conservação (ARSLAM et al., 2004). No estudo realizado por Valentini et al. (1991) observou-se uma maior dificuldade no diagnóstico pela técnica de IFD após incubação das amostras por 18 horas em temperatura ambiente (25°C).

Brito (2002) avaliou a técnica de Imunofluorescência Direta para o diagnóstico da raiva em amostras em decomposição e observou uma sensibilidade de 43,48% nessas amostras, enquanto a sensibilidade foi de 100% nas amostras a fresco. No mesmo estudo, a avaliação da prova de IC apresentou uma sensibilidade de 39,13% nas amostras em decomposição e de 100% nas amostras analisadas a fresco.

Em estudo realizado por Albas et al. (1999) com a utilização de técnicas de IFD e IC para o diagnóstico da raiva em amostras em decomposição, observou-se também perda de acurácia a partir de 72 horas de decomposição devido ao aumento no número de resultados falso-negativos.

As técnicas de IC e isolamento viral em cultivo celular também apresentam elevada sensibilidade e os resultados são obtidos em poucos dias de incubação, mas dependem da viabilidade do vírus, o que pode representar um problema no caso da necessidade de tratamento pós-expositivo em seres humanos atacados por animais suspeitos (CHHABRA et al., 2005). Adicionalmente, as amostras em estado de decomposição além de não apresentarem vírus viáveis, podem apresentar bactérias e/ou toxinas que tornam inviáveis a inoculação em camundongos e o isolamento viral em cultivos celulares (LEWIS e THACKER, 1974; PICARD-MEYER et al., 2004).

A utilização das técnicas de biologia molecular, em especial da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) pode ser uma alternativa eficiente para o

diagnóstico da raiva. Descrita primeiramente por Saiki e colaboradores em 1985 a PCR tem possibilitado importantes avanços no diagnóstico e estudo dos agentes infecciosos. A prova permite a detecção e amplificação de sequências específicas do genoma de um microorganismo, ainda que o agente se encontre em quantidades muito pequenas na amostra ou não esteja viável (BELÁK e BALLAGI-PORDÁNY, 1993).

No caso do vírus rábico que é composto por RNA, utiliza-se a técnica de RT-PCR onde se obtêm o DNA complementar ao RNA para então realizar-se sua amplificação. Inúmeros trabalhos foram realizados utilizando-se a RT-PCR no diagnóstico da raiva, comprovando que esta técnica apresenta elevada sensibilidade e especificidade (ERMINE et al., 1990; SACRAMENTO et al., 1991; ITO et al., 2001b; DANTAS JR et al., 2004; BORDIGNON et al., 2005).

O RNA é uma molécula facilmente degradável por ação das RNAses que se encontram amplamente distribuídas em pele e secreções. Adicionalmente, ao se trabalhar com RNA, alguns procedimentos devem ser observados em decorrência da liberação de RNAses durante a lise celular e também da contaminação com essas enzimas durante a preparação o que pode comprometer a extração desse RNA. Dentre os procedimentos podemos citar a manipulação de todo o material com luvas, utilização de plásticos e reagentes RNase “free” e utilização de água da melhor qualidade possível (MiliQ ou tratada com DEPC à 0,01%) (SAMBROOK, 2001).

A utilização da hemi-nested RT-PCR (hnRT-PCR) e nested RT-PCR aumenta a sensibilidade da prova ao realizar uma segunda amplificação a partir de um ou dois *primers* internos aos utilizados na amplificação inicial (KAMOLVARIN et al., 1993; HEATON et al., 1997; PICARD-MEYER et al., 2004; VÁZQUEZ-MORÓN et al., 2006).

Soares et al. (2002) utilizaram a técnica de hnRT-PCR para o diagnóstico do vírus rábico em morcegos hematófagos e várias espécies de herbívoros, demonstrando concordância com os resultados obtidos na IFD e IC.

O maior problema da utilização das técnicas de nested e heminested RT-PCR é a presença de falso-positivos em decorrência da contaminação com o DNA proveniente da primeira amplificação; por isso devem ser observados alguns procedimentos como a utilização de laboratórios e equipamentos separados na realização da etapa de nested (DAVID et al., 2002).

Conforme demonstrado por Kulonen et al. (1999), a RT-PCR pode ser utilizada com sucesso para o diagnóstico em amostras cerebrais fixadas em carnoy ou embebidas em parafina. A técnica também se mostrou eficiente na detecção do vírus rábico em amostras fixadas em formol por 16 anos (WACHARAPLUESADEE et al., 2006), o que pode facilitar a conservação e envio de amostras provenientes de locais distantes dos centros diagnósticos.

Amostras clínicas além do tecido nervoso, como saliva e líquido cefaloraquidiano, também podem ser utilizadas para a detecção do vírus rábico pela técnica de hnRT-PCR, demonstrando neste caso concordância com os exames realizados post-mortem pelas técnicas tradicionais e permitindo o diagnóstico ante-mortem (CREPIN et al., 1998). Macedo et al. (2006) também utilizaram a técnica de RT-PCR no diagnóstico da raiva a partir de amostras da pele do pescoço obtendo bons resultados.

De Lima et al., (2005) empregaram a hnRT-PCR para detecção do vírus rábicos em diversos tecidos de camundongos inoculados experimentalmente, demonstrando eficiência da técnica no estudo da distribuição viral.

No estudo realizado por Lopes et al. (2006) para a detecção do vírus rábico em amostras congeladas por longo período de tempo (de 1993 a 2002) a positividade na RT-PCR foi de 65,3% enquanto que na IC essa positividade foi de 33,6%; o que demonstra que a RT-PCR pode ser de grande utilidade no estudo de amostras armazenadas em congelamento.

A RT-PCR é capaz de detectar o vírus rábico nas amostras em estado deficiente de conservação, mesmo em casos em que a IFD e a IC apresentam

resultados negativos, situação bastante comum em países de clima tropical (ROJAS, 2006).

Kamolvarin et al. (1993) encontraram positividade em amostras cerebrais submetidas à decomposição por 72 horas através da técnica de nested RT-PCR. Ao utilizarem a heminested PCR em amostras virais decompostas pelo mesmo período de tempo à 37°C, Heaton et al. (1997) também obtiveram bons resultados, mesmo nos casos em que a IFD apresentou resultados negativos.

Whitby et al. (1997), detectaram a presença do vírus rábico em uma amostra de tecido nervoso de um lobo na Etiópia em estado de decomposição. A amostra havia apresentado resultado negativo para FAT e IC e se mostrou positiva para a técnica de nested RT-PCR.

No estudo desenvolvido por David et al. (2002), utilizou-se a técnica de RT-PCR para identificação do vírus rábico em amostras naturalmente decompostas. Foi encontrada positividade em três amostras cerebrais positivas para FAT submetidas a 36 dias de decomposição, e também em 10 amostras das 216 iniciais encaminhadas para o laboratório em decomposição que apresentaram resultados negativos para a FAT.

Soares et al. (2002), também determinaram positividade por meio da técnica de hnRT-PCR em amostras cerebrais de camundongos inoculados experimentalmente com a cepa fixa PV e submetidas à decomposição por até 96 horas.

Em 2004, no Brasil, foi confirmado um caso de raiva em humanos após exumação. O material cerebral já se encontrava em decomposição (gelatinoso) e o diagnóstico foi realizado através da IFD e confirmado pela RT-PCR, possibilitando assim a tipificação genética do vírus; uma vez que não foi possível realizar a IC devido à inviabilidade do vírus (TAKAOKA, 2004).

Rojas et al. (2006), utilizaram amostras de camundongos inoculados experimentalmente com cepa CVS do vírus rábico. Foi encontrada positividade por até 23 dias em amostras submetidas à decomposição em temperatura ambiente, embora a partir do 12º dia a intensidade das bandas observada na eletroforese tenha diminuído.

Os produtos amplificados nas técnicas de biologia molecular podem ser ainda utilizados para a caracterização dos genótipos e de variantes virais (KISSI et al., 1995; ARAI et al., 1997; BLACK et al., 2000; HEINAMANN et al., 2002; CARNIELI et al., 2006). Esse estudo genotípico pode ser realizado através de análise e comparação das sequências amplificadas do gene (VÁQUEZ-MORÓN et al., 2006), por técnicas de PCR espécie-específico (SS-PCR) que utilizam *primers* específicos para a detecção de determinadas variantes; através de digestão enzimática – “*Restriction Fragment Length Polimorfism*” (RFLP), com diferentes endonucleases que digerem as sequências amplificadas em fragmentos de diferentes tamanhos de acordo com variações em suas sequências de nucleotídeos (NADIN-DAVIS, 1998, ITO et al., 2003) e também pela utilização da técnica de Multiplex RT-PCR (SATO et al., 2005).

A análise e comparação das seqüências amplificadas realizadas no Brasil por Ito et al. (2001a), permitiu a identificação de dois grupos distintos do vírus, relacionados a cães e morcegos hematófagos. Diversos estudos confirmam essa epidemiologia viral no país e também na América Latina (PAEZ et al., 2003; SATO et al., 2004; SCHAEFER et al., 2005; CARNIELI et al., 2006).

A utilização da Biologia Molecular para estudos epidemiológicos demonstra que os vírus rábicos podem variar de acordo com a espécie e região geográfica de onde são isolados (ROMJIN et al., 2003), permitindo o conhecimento das fontes de infecção, melhor entendimento das relações epidemiológicas e a adoção de melhores medidas de profilaxia e controle.

A técnica de RT-PCR permite o diagnóstico de maneira sensível, específica e rápida do vírus rábico, mesmo quando as amostras suspeitas são

encaminhadas ao laboratório em estado deficiente de conservação. Permite, adicionalmente, que seus produtos sejam posteriormente utilizados em técnicas como as de sequenciamento, RFLP, SS-PCR e Multiplex PCR para a caracterização epidemiológica dos vírus rábicos circulantes em uma determinada região, permitindo o estabelecimento de programas mais eficientes de controle e profilaxia.

No entanto, o armazenamento de tecido cerebral em freezer em temperatura a -20°C é rotineiramente utilizado nos laboratórios que não possuem equipamentos para armazenamento a -80°C . Nestas condições o RNA viral pode sofrer degradação impossibilitando estudos retrospectivos, uma vez que a recomendação quando se trabalha com RNA é o congelamento em nitrogênio líquido e congelamento a -80°C até o momento de sua extração (AZEVEDO et al., 2003).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) e Heminested RT-PCR (hnRT-PCR) na detecção do vírus rábico em amostras animais armazenadas em freezer a -20°C por diferentes períodos e após serem submetidas a decomposição em temperatura ambiente por 72 horas.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi determinar a sensibilidade e a especificidade das técnicas de biologia molecular, RT-PCR e hnRT-PCR, para a detecção do vírus rábico em amostras de tecido nervoso de diferentes espécies animais armazenadas em congelamento por diferentes períodos e submetidas a decomposição visando a sua utilização em estudos retrospectivos.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar as técnicas de RT-PCR e hnRT-PCR em amostras cerebrais de animais armazenadas a -20°C por diferente períodos.

- Avaliar as técnicas de RT-PCR e da hnRT-PCR em amostras cerebrais de animais submetidas à decomposição por 72 horas em temperatura ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Amostras

Foram utilizadas 151 amostras cerebrais de diferentes espécies animais (bovinos, eqüinos, cães, gatos, suínos, caprinos e ovinos) provenientes do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu e do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo (CCZ), previamente diagnosticadas por meio da reação de Imunofluorescência Direta e Inoculação Intracerebral em Camundongos. Estas amostras se encontravam armazenadas em freezer a -20°C por períodos variáveis de tempo, entre os anos de 1999 e 2006, em frascos não destinados a biologia molecular.

4.1.2. Controles

O vírus rábico “Challenge Virus Standard” (CVS) foi utilizado como controle positivo nas reações.

Os controles negativos foram realizados com tecido cerebral de camundongos não inoculados.

4.1.3. Enzimas

Foram utilizadas as enzimas “Moloney Murine Reverse Transcriptase” (M-MuLV RT®) 200U/μL para a obtenção do DNA complementar (cDNA) e *Thermus aquaticus* DNA polimerase (Taq DNA polimerase)® 5U/L para a amplificação do DNA e realização da heminested, ambas as enzimas do laboratório Invitrogen.

4.1.4. Primers

Foram utilizados os primers do protocolo descrito por Soares et al. (2002).

Para a etapa de obtenção do cDNA foram utilizados os primers P510 e P942. O mesmo par de primers foi utilizado para a amplificação resultando em um produto amplificado de 455 pares de bases. O primer externo P942 e o primer interno P784 foram utilizados para a reação de Heminested RT-PCR, resultando em um produto amplificado de 299 pares de bases.

Primer	Seqüência	Sense
P510:	ATA GAG CAG ATT TTC GAG ACA GC	(sense)
P784:	CCT CAA AGT TCT TGT GGA AGA	(anti-sense)
P942:	CCC ATA TAA CAT CCA ACA AAG TG	(anti-sense)

4.2. Métodos

4.2.1. Macerado

O macerado das amostras foi realizado utilizando-se 01 (um) grama de amostra de tecido cerebral em suspensão a 20% em solução salina estéril autoclavada em “graals” estéreis e então acondicionado em microtubos RNase e DNase “free”.

4.2.2. Extração

Para a extração utilizou-se o método TRIzol® de acordo com o protocolo descrito por De Lima (2005).

Os macerados foram centrifugados à 7500g por dez minutos em microcentrífuga refrigerada a 4°C.

Foram homogeneizados 200µL do macerado em 600µL de TRIzol® em um microtubo estéril RNase e DNase “free” e incubados a temperatura ambiente (20-30°C) por cinco minutos. Foram adicionados então 200µL de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas em “vórtex” por quinze segundos. Após incubação por dez minutos em temperatura ambiente, os microtubos foram centrifugados por cinco minutos à 12000g a 4°C.

Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante obtido (parte aquosa) para outro microtubo também estéril e RNase e DNase “free” e adicionou-se 480µL de álcool isopropílico. Os microtubos foram homogeneizados por inversão cinco vezes e ainda em “vórtex” por quinze segundos. Após incubação em temperatura ambiente por dez minutos, as

amostras foram centrifugadas por quinze minutos à 12000g em centrífuga refrigerada a 4°C.

O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi então desprezado e adicionou-se 1000µL de etanol à 75%, homogeneizando-se em vórtex por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas por cinco minutos à 7500g a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado para que o “pellet” formado não fosse perdido; esse “pellet” foi colocado em banho-seco a 56°C para secar. Adicionou-se 20µL da água tratada com 0,01% de DEPC autoclavada e incubou-se as amostras em banho-maria a 56°C por 10 minutos.

O RNA extraído foi mantido em gelo e imediatamente submetido à obtenção do DNA complementar (cDNA).

4.2.3. Obtenção do DNA complementar (cDNA)

O protocolo utilizado para a reação de hnRT-PCR foi descrito por SOARES et al. (2002).

A um volume de 7µL do RNA extraído foram adicionados 13µL do “mix” contendo os seguintes reagentes; 1mM de dNTP mix, 20pmols do primer P510, 20pmols do primer P937, 1X RTBuffer, 1mM de DTT e 200U (unidades) da enzima MuLV RT® 200U/µL.

A reação foi incubada à 42°C por 60 minutos.

4.2.4. Amplificação

Para a amplificação também foi utilizado o protocolo descrito por Soares et al. (2002) com modificações.

Foram adicionados 2,5µL do cDNA obtido à um “mix” contendo 0,2mM de dNTP mix, 25pmols do primer P510, 25pmol do primer P937, 1,5mM de MgCl₂, 1X PCR Buffer, 2U (unidades) da enzima *Thermus aquaticus* DNA polimerase (Taq DNA polimerase)[®] 5U/µL e água MiliQ autoclavada para completar um volume total de 50µL.

A reação foi então submetida aos seguintes ciclos em termociclador PTC-200 (“Peltier Thermal Cycler”) MJ Research. Foi realizada uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; e então a etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.2.5. Heminested RT-PCR

A etapa de Heminested RT-PCR foi realizada de acordo com o seguinte protocolo.

Foram utilizados 1,5µL do produto obtido na amplificação inicial ao “mix” contendo 0,2mM de dNTP mix, 1X buffer, 15 pmols do primer P510, 15 pmols do primer P784, 1,5mM de MgCl₂, 1U (unidade) da enzima *Thermus aquaticus* DNA polimerase (Taq DNA polimerase)[®] 5U/µL (no protocolo original foram utilizadas 1,25 U da enzima) e água MiliQ autoclavada para completar um volume final de 30µL.

A reação foi então amplificada de acordo com os mesmos ciclos utilizados para a etapa de amplificação inicial.

4.2.6. Eletroforese

A eletroforese foi realizada em gel de agarose à 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizada em transilumidador UV. Os fragmentos foram observados em comparação com marcador molecular (ladder) de 100 pares de base. Os fragmentos observados foram os seguintes:

RT-PCR: 455 pares de base

hnRT-PCR: 299 pares de base

4.2.7. Delineamento experimental

Foram analisadas 151 amostras cerebrais com prévio resultado para IFD e IC. As amostras eram provenientes de diversas espécies; bovinos, equinos, cães, gatos, ovinos, caprinos e suínos e estavam armazenadas por diferentes períodos (entre os anos de 1999 e 2006).

As amostras foram mantidas sob congelamento à -20°C até o momento de sua utilização. Após o descongelamento foram realizados os macerados e parte das amostras (01 grama) foi aliquoteada e submetida à decomposição em temperatura ambiente (20-30°C) por 72 horas, sendo então macerada e diluída da mesma maneira que as amostras recém-descongeladas.

Os macerados em congelamento e em decomposição foram submetidos à extração do RNA, à técnica de RT-PCR e à eletroforese com visualização em transiluminador com lâmpada UV. As amostras negativas na RT-PCR

foram então submetidas à etapa de hnRT-PCR (itens 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5., 4.2.6).

4.2.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada determinando-se a concordância entre os testes através do Coeficiente Kappa (K). Os valores acima 0,80 foram interpretados como uma concordância muito boa; os valores entre 0,6 e 0,8 como uma concordância boa; entre 0,5 e 0,6 como aceitável; entre 0,4 e 0,5 como moderada e os valores abaixo de 0,40 como uma concordância ruim. Quanto mais próximo a 1 (um) perfeita é a concordância entre os testes, e os valores mais próximos de 0 (zero) indicam uma concordância aleatória (NOORDHUIZEN et al., 1997)

Foram também determinadas a sensibilidade e a especificidade diagnósticas segundo as fórmulas definidas por THRUSFIELD (1986):

$$\text{Sensibilidade (S)} = a / (a+c) \times 100$$

a = número de amostras detectadas como positivas que realmente eram positivas.

c = número de amostras positivas que a técnica identificou como negativas.

$$\text{Especificidade (E)} = d / (b+d) \times 100$$

b = número de amostras negativas que a técnica identificou como positivas no grupo das amostras negativas.

d = número de amostras efetivamente negativas consideradas negativas pela técnica.

Em ambos os casos a prova de inoculação intracerebral em camundongos foi considerada como o “padrão ouro”.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados globais

Os resultados foram avaliados frente aos resultados prévios da IFD e IC. Das 50 amostras previamente positivas para raiva mantidas sob congelamento, 26 (52%) foram positivas na técnica de RT-PCR e 19 (79% das 24 amostras analisadas) apresentaram positividade para a técnica de hnRT-PCR. Com uma positividade de 45 (90%) para as técnicas moleculares.

Em decorrência da deficiência na quantidade de material para análise, foram avaliadas 149 (das 151 existentes em congelamento) amostras putrefeitas sendo 48 previamente positivas nas provas de IFD e IC. Nesta situação foram detectadas 17 (35,4%) amostras positivas à RT-PCR e 19 (61,2% das 31 amostras analisadas) com a utilização da hnRT-PCR. No total das técnicas de biologia molecular 36 amostras apresentaram resultados positivos (75%).

A amostra n°. 107-04 proveniente de um eqüino apresentou resultado negativo na IFD e positividade na IC. Na utilização das técnicas moleculares o resultado foi positivo com a utilização da RT-PCR.

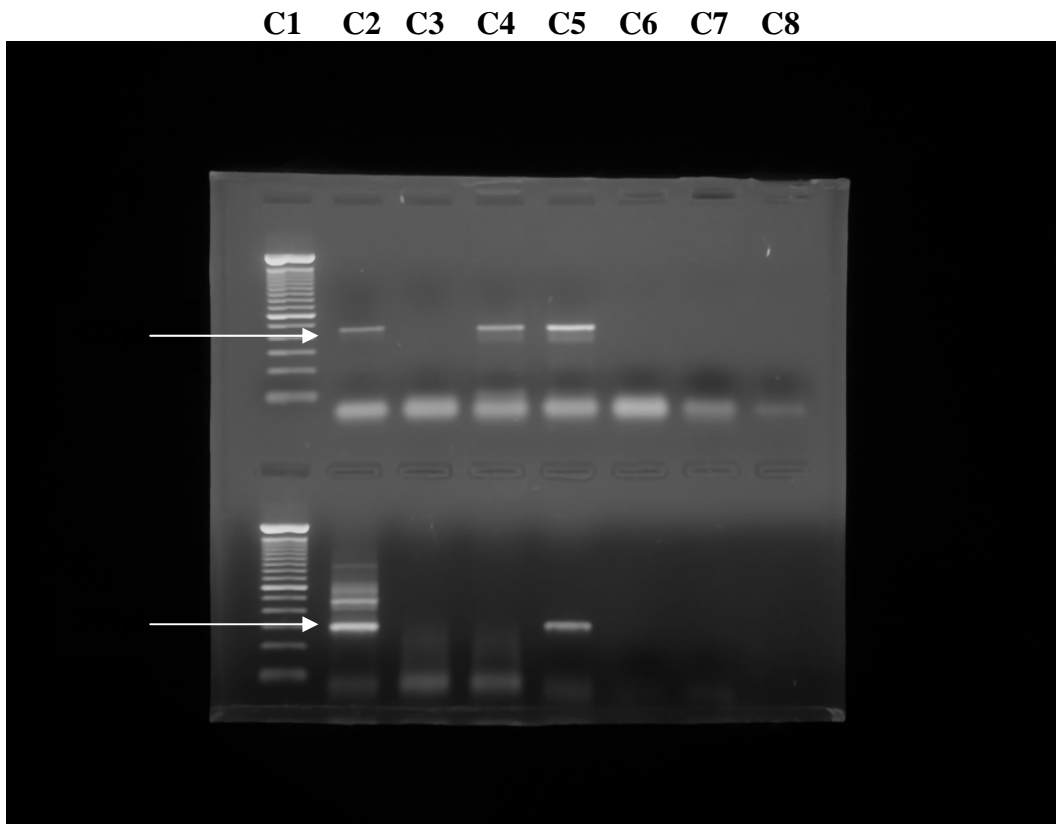
Foi obtida uma concordância de 100% nos resultados negativos pelas técnicas de biologia molecular quando comparados aos resultados negativos pela técnica de IC, num total de 101 amostras mantidas em congelamento por diferentes períodos e 99 amostras submetidas à decomposição.

Os resultados comparativos entre os testes de IFD, IC, RT-PCR e hnRT-PCR e o total de positividade para as técnicas moleculares nas amostras congeladas por diferentes períodos e submetidas a decomposição estão representados na tabela.

TABELA 1. Resultados comparativos entre os testes de Imunofluorescência Direta (IFD), Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC), “Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) e Heminested RT-PCR (hnRT-PCR) e o Total de amostras positivas para as técnicas moleculares na detecção do vírus rábico em amostras cerebrais congeladas por diferentes períodos, descongeladas e submetidas à decomposição. Botucatu,2007.

	Descongeladas		Decomposição	
	Positivo/Total	Negativo/Total	Positivo/Total	Negativo/Total
IFD	49/151	102/151	48/149	101/149
IC	50/151	101/151	48/149	101/149
RT-PCR	26/151	125/151	17/149	132/149
hnRT-PCR	19/24	106/125	19/131	113/132
Positivas para as Técnicas Moleculares	45/151	106/151	36/149	113/149

FIGURA 1. Eletroforese das amostras submetidas à “Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) e heminested RT-PCR (hnRT-PCR) para o diagnóstico da raiva.



Linha 01 – C1 – Marcador molecular (Ladder) de 100 pares de base (pb); C2 – controle positivo para a RT-PCR com 455pb; C3 - amostra negativa (R-441-01); C4 e C5 – amostras positivas (R-404-01 e R-3388-99); C6– amostra negativa (R-5070-01); C7 e C8 – controles negativos.

Linha 02 – C1 – Marcador molecular (Ladder) de 100 pares de base (pb); C2 – controle positivo para a hnRT-PCR com 299pb; C3 e C4 – amostras negativas (R-1001-01 e R-441-01); C5 – amostras positiva (R-5070-01); C6 a C8 – controles negativos.

As amostras foram também avaliadas considerando-se seu tempo de congelamento (ano em que foram congeladas).

Apenas uma amostra foi proveniente do ano de 1999 e essa amostra apresentou positividade já na RT-PCR quando recém-descongelada e também após a decomposição. O mesmo ocorreu com a amostra do ano de 2000.

Das 28 amostras do ano de 2001, 14 (50%) foram positivas para a técnica de RT-PCR e 11 (78,5% das 14 amostras analisadas) com a utilização da técnica de hnRT-PCR, sendo 25 (89,2%) positivas para as técnicas moleculares. Considerando-se as amostras desse ano em decomposição, 11 (39,3%) foram positivas na RT-PCR, 09 para a hnRT-PCR (52,9% das 17 amostras analisadas) e 20 (71,4%) com a utilização das técnicas moleculares.

Das 12 amostras do ano de 2002 analisadas logo após o descongelamento, apenas 04 (33,3%) foram positivas à RT-PCR enquanto 07 (87,5% das 08 amostras analisadas) foram positivas quando se utilizou a hnRT-PCR e 11 (91,6%), considerando-se as técnicas moleculares. Já nas mesmas amostras em decomposição, 03 (25%) apresentaram positividade na RT-PCR, 06 (66,6% das 09 amostras analisadas) na utilização da hnRT-PCR, totalizando 09 (75%) com a utilização das técnicas moleculares.

Duas amostras dataram do ano de 2003, e ambas foram positivas já na RT-PCR quando analisadas após o descongelamento, quando submetidas à decomposição observou-se positividade nas duas amostras, mas apenas com a utilização da hnRT-PCR.

Das 05 amostras de 2004, 03 (60%) foram positivas na RT-PCR, 01 (50% das 02 amostras analisadas) para a hnRT-PCR e 04(80%) com a utilização das técnicas moleculares . Em decomposição foram analisadas 03 amostras em decorrência da quantidade insuficiente de material, onde se observou 02 (66,6%) amostras positivas apenas na hnRT-PCR.

A amostra proveniente do ano de 2005 apresentou positividade na RT-PCR logo após o descongelamento e também no material sob decomposição

Os resultados agrupados de acordo com o ano de congelamento das amostras positivas estão representados na tabela 2.

As amostras negativas dataram dos anos de 2004 (21 amostras), 2005 (10 amostras) e 2006 (70 amostras), todas com resultados negativos para a RT-PCR e hnRT-PCR após descongelamento e decomposição.

As espécies animais, municípios de procedência, resultados das provas de IFD, ICC, RT-PCR, hnRT-PCR e ano de congelamento das 151 amostras analisadas estão relacionadas na Tabela3.

TABELA 2. Resultados comparativos das provas de “Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) “Heminested RT-PCR” (hnRT-PCR) nas amostras cerebrais de diferentes espécies animais, previamente positivas, congeladas por diferente períodos, descongeladas e submetidas à decomposição considerando-se o ano de congelamento. Resultados expressos em número de amostras positivas/total de amostras analisadas. Botucatu, 2007.

Ano (Total amostras)	Congelamento		Decomposição	
	RT-PCR/ Total	hnRT-PCR/ Total	RT-PCR/ Total	hnRT-PCR/ Total
1999 (01 amostra)	01 /01	NR	01 /01	NR
2000 (01 amostra)	01/01	NR	01/01	NR
2001 (28 amostras)	14/28	11/14	11/28	09/17
2002 (12 amostras)	04/12	07/08	03/12	06/09
2003 (02 amostras)	02/02	NR	00/02	02/02
2004 (05 amostras)	03/05	01/02	00/03	02/03
2005 (01 amostra)	01/01	NR	01/01	NR

NR=Não Realizadas

TABELA 3

Espécies animais, local de procedência, resultados das provas de Imunofluorescência Direta (IFD), Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC), "Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR) e "Heminested RT-PCR" (hnRT-PCR) utilizadas para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais de animais congeladas por diferentes períodos, descongeladas e submetidas à decomposição (MI-Material Insuficiente, NR-Não Realizadas). Botucatu, 2007.

Número	Espécie	Local	IFD	IC	RT-PCR Congeladas	hnRT-PCR Congeladas	RT-PCR Decomposição	hnRT-PCR Decomposição
197-04	Felina	Parapanapanema	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
195-04	Canina	Botucatu	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
194-04	Felina	Jaiú	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
193-04	Canina	-----	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
191-04	Canina	Itatinga	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
190-04	Bovina	Bauru	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
189-04	Bovina	Sta. Maria da Serra	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
187-04	Canina	São Manuel	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
253-04	Bovina	Sorocaba	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
254-04	Canina	Botucatu	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
255-04	Canina	Botucatu	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
256-04	Felina	Botucatu	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
258-04	Equina	Botucatu	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
259-04	Canina	Jaiú	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
260-04	Canina	Jaiú	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
261-04	Bovina	Jaiú	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
220-04	Bovina	Torrinha	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
210-04	Bovina	Sta. Maria da Serra	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
218-04	Bovina	Torrinha	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
139-04	Bovina	Tietê	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Positivo
107-04	Equino	Botucatu	Negativo	Positivo	Positivo	NR	MI	MI
R-5473-00	Bovina	Mairiporã	Positivo	Positivo	Positivo	NR	MI	MI
R-442-01	Bovina	Guarulhos	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Positivo	NR
R-298-01	Equina	Guarulhos	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
R-1762-01	Bovina	Jundiá	Positivo	Positivo	Negativo	NR	Negativo	Positivo
R-366-01	Bovina	Guarulhos	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Positivo	NR
R-318-01	Bovina	Guarulhos	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Negativo
R-1760-01	Bovina	Jundiá	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
R-370-01	Bovina	Guarulhos	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Negativo
R-3386-01	Bovina	S.J. Boa Vista	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Negativo
R-2210-01	Equina	Mairiporã	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Negativo
R-3499-01	Bovina	Mairiporã	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Positivo	NR
R-1001-00	Bovina	Ribas Rio Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo

5.2. Resultados da análise estatística

5.2.1. Amostras mantidas em congelamento por diferentes períodos

Os resultados obtidos foram comparados aos previamente existentes da Inoculação Intracerebral em Camundongos definida com prova ouro.

Considerando-se a técnica de RT-PCR o coeficiente Kappa obtido foi de 0,5917 (IC95%= 0,4550-0,7285), sendo considerado como uma concordância aceitável; segundo Noordhuizen et al. (1997), os valores Kappa entre 0,50 e 0,60 podem ser considerados aceitáveis. A sensibilidade encontrada nessa situação foi de 52% .

Quando avaliada a técnica de hnRT-PCR o valor do coeficiente Kappa foi de 0,8600 (IC95%= 0,7409-0,9790), muito bom, e a sensibilidade apresentou valor de 80% considerando-se as 24 amostras analisadas para esta técnica.

Considerando-se o total das técnicas de biologia molecular o valor de Kappa foi de 0,9233 (IC95%= 0,8574-0,9892), muito bom, e a sensibilidade de 90%.

5.2.2. Amostras em decomposição

O valor de Kappa obtido para a técnica de RT- PCR foi de 0,4264 (IC95%= 0,2792-0,5736) podendo ser considerada uma concordância moderada; e a sensibilidade foi de 35%.

Para a técnica de hnRT-PCR o valor de Kappa foi de 0,7079 (IC95%= 0,5571-0,8586), considerado como uma concordância boa; e a sensibilidade 61%. Considerando-se o total das técnicas de biologia molecular o valor de

Kappa foi de 0,8026 (IC95%= 0,6977-0,9076), que pode ser considerado com uma concordância muito boa e a sensibilidade de 75% (0,75)

Em todos os casos a especificidade foi de 100%.

Tabela 4. Resultados da “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) segundo o resultado da Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC) para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais mantidas em congelamento por diferentes períodos. Botucatu, 2007.

	RT-PCR		Total	
	Positivo	Negativo		
IC	Positivo	26	24	50
	Negativo	00	101	101
Total		26	125	151

Estatística: o coeficiente Kappa entre os resultados das provas de RT-PCR e IC foi de $K=0,5917$ (IC95%=0,4550 – 0,7285), indicando concordância aceitável entre os testes (Noordehuizen et al., 1997); a sensibilidade foi de 52% e a especificidade 100%.

Tabela 5. Resultados da “Heminested Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (hnRT-PCR) segundo o resultado da Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC) para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais mantidas em congelamento por diferentes períodos. Botucatu, 2007.

		RT-PCR		Total
		Positivo	Negativo	
IC	Positivo	19	05	24
	Negativo	00	101	101
Total		19	106	125

Estatística: o coeficiente Kappa entre os resultados das provas de hnRT-PCR e IC foi de $K=0,8600$ (IC95%= 0,7409-0,9790), indicando uma concordância muito boa entre os testes (Noordehuizen et al., 1997); a sensibilidade foi de 80% e a especificidade 100%.

Tabela 6. Resultados da “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR segundo o resultado da Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC) para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais em decomposição. Botucatu, 2007.

		RT-PCR		Total
		Positivo	Negativo	
IC	Positivo	17	31	48
	Negativo	00	101	101
Total		17	132	149

Estatística: o coeficiente Kappa entre os resultados das provas de RT-PCR e IC foi de $K=0,4264$ (IC95%=0,2792 – 0,5736), indicando concordância moderada entre os testes (Noordehuizen et al., 1997); a sensibilidade foi de 35% e a especificidade 100%.

Tabela 7. Resultados da “Heminested Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (hnRT-PCR) segundo o resultado da Inoculação Intracerebral em Camundongos (IC) para a detecção do vírus rábico em amostras cerebrais em decomposição. Botucatu, 2007.

	RT-PCR		Total
	Positivo	Negativo	
IC	Positivo	19	31
	Negativo	00	101
Total		19	132

Estatística: o coeficiente Kappa entre os resultados das provas de hnRT-PCR e IC foi de $K=0,7079$ (IC95%= 0,5571-0,8586), indicando uma concordância boa entre os testes (Noordehuizen et al., 1997); a Sensibilidade foi de 61% e a especificidade 100%.

6. DISCUSSÃO

A sensibilidade encontrada nas amostras descongeladas foi de, respectivamente, 52% na RT-PCR e 80% na hnRT-PCR. Ao considerarmos as amostras positivas pela associação das técnicas de biologia molecular essa sensibilidade apresentou valor de 90%. Heaton et al. (1997) encontraram 100% de positividade para o vírus rábico para a hnRT-PCR em amostras mantidas em congelamento desde o ano de 1974, porém nesse caso as amostras foram submetidas à multiplicação viral em cultivo celular.

Ao considerarmos os valores do coeficiente Kappa para as amostras descongeladas a concordância obtida foi de 0,59, aceitável, na RT-PCR e de 0,86, muito boa, na hnRT-PCR; esse aumento na concordância reafirma a maior sensibilidade da técnica de hnRT-PCR em relação à RT-PCR. Os melhores resultados observados na utilização da heminested podem ser explicados pelo fato da técnica realizar uma segunda amplificação da seqüência alvo, o que aumenta a sensibilidade analítica e permite a detecção de baixos títulos virais na amostra (SOARES et al., 2002; PICARD-MEYER et al., 2004).

Os valores de sensibilidade nas amostras analisadas após serem submetidas à decomposição foram de 35% para a técnica de RT-PCR e de 61% para a hnRT-PCR, enquanto que na associação das técnicas essa sensibilidade foi de 75%. Esses resultados demonstram que a hnRT-PCR aumentou a sensibilidade das técnicas de biologia molecular também quando utilizadas em amostras em decomposição.

As amostras utilizadas encontravam-se inicialmente estocadas em freezers comuns (temperatura de -20°C) e acondicionadas em frascos não apropriados para a biologia molecular, não concordando com a recomendação de congelamento a -80°C e acondicionamento dessas amostras em microtubos estéreis e RNase e DNase free (AZEVEDO et al., 2003). As condições não

ideais de armazenamento devem ser consideradas na interpretação da menor sensibilidade encontrada na utilização da RT-PCR isoladamente tanto nas amostras descongeladas (52%) quanto nas submetidas à decomposição (35%).

As amostras foram também analisadas considerando-se o ano em que foram congeladas (de 1999 a 2005) a fim de se determinar a influência do tempo de congelamento nos resultados obtidos. Não foram encontradas, porém, diferenças significativas ao compararmos estes resultados; a positividade encontrada nas amostras do ano de 2001 foi de 50% para a RT-PCR enquanto que nas amostras do ano de 2002 essa positividade foi de 33,3%. No estudo realizado por Lopes et al. (2006) a positividade foi de 83,3% nas amostras armazenadas de 1997 a 2002; essa discrepância nos valores pode ser atribuída ao fato das amostras estarem armazenadas em temperatura de -20 a -70°C, enquanto que no presente estudo as amostras estavam armazenadas apenas a -20°C.

A aplicação de ambas as técnicas nos materiais em decomposição apresentou menor sensibilidade. O valor do coeficiente Kappa da associação da RT-PCR com a hnRT-PCR foi 0,80, uma concordância considerada muito boa, porém, se compararmos com o valor de Kappa obtido nas amostras não submetidas à decomposição, $K= 0,92$, observamos que este valor está mais próximo do considerado ideal. As condições adversas à que as amostras foram submetidas são um importante fator a ser considerado na interpretação desses resultados, uma vez que os RNA vírus são mais sensíveis às condições ambientais que os vírus compostos por DNA (BELÁK e BALLAGI-PORDÁNY, 1993). A elevada sensibilidade do RNA à degradação em consequência da presença de RNAses encontradas no ambiente e liberadas durante a lise celular (SAMBROOK, 2001) pode explicar a menor sensibilidade quando analisamos as amostras submetidas a decomposição.

No presente estudo, encontrou-se positividade em todas as amostras da cepa CVS provenientes da inoculação em camundongos (utilizadas como controles positivos), mesmo nas amostras em decomposição, concordando

com os estudos realizados por Soares et al. (2002) e Rojas et al. (2006); que utilizando as técnicas moleculares para o diagnóstico da raiva em materiais em decomposição demonstraram uma excelente sensibilidade dessas técnicas quando foram utilizadas amostras provenientes de camundongos inoculados com as cepas PV e CVS respectivamente, onde o vírus se encontrava multiplicado.

As amostras utilizadas neste experimento eram provenientes de material de campo não tendo sido submetidas à multiplicação viral por meio da técnica de inoculação em camundongos. Um título viral inicial baixo pode ter sido a causa dos 14 resultados falso-negativos encontrados quando foram analisadas as amostras em decomposição (DAVID et al., 2002; ROJAS et al., 2006).

Embora a sensibilidade tenha sido mais baixa nas amostras em decomposição, quando comparamos aos resultados apresentados por Brito (2002), as técnicas moleculares apresentam melhores resultados em relação à utilização da IFD e IC em amostras nessas condições. Neste estudo com amostras cerebrais submetidas à decomposição, também por 72 horas em temperatura ambiente, a sensibilidade encontrada para a IFD foi de 43,48% enquanto que a sensibilidade obtida na hnRT-PCR nas amostras em decomposição, no presente estudo, apresentou um valor de 75%.

Ao considerar-se a sensibilidade da IC em amostras putrefeitas, relatadas em estudos anteriores que consideram a técnica um método com baixa sensibilidade para o diagnóstico da raiva em materiais em decomposição (ALBAS et al., 1999; BRITO, 2002), a utilização da hnRT-PCR pode ser de grande utilidade por permitir não apenas o diagnóstico, mas também o estudo dos produtos amplificados para a classificação epidemiológica do vírus.

A concordância de 100% com os resultados das provas de IFD e IC nas amostras negativas demonstra a elevada especificidade da PCR, relatada em diversos estudos com a técnica para o diagnóstico da raiva (ERMINE et al., 1989; SACRAMENTO et al., 1991; KAMOLVARIN et al., 1993, PICARD-MEYER et al., 2004).

A presença de falsos positivos na hnRT-PCR, que poderia ter ocorrido devido à grande quantidade de material amplificado resultante, não foi observada. Tal situação pode ser explicada pela observância de alguns cuidados durante a realização da heminested, como a utilização de laboratórios separados para a amplificação inicial e para a realização da heminested, análise de no máximo 10 amostras por amplificação e uso de controles negativos (SOARES et al, 2002).

A utilidade de hnRT-PCR como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da raiva pode também ser demonstrada pelo caso da amostra n°107-04, proveniente de um equino que apresentou resultado negativo para Imunofluorescência Direta e positivo para a Prova Biológica. Na utilização das técnicas de biologia molecular, essa amostra apresentou resultados positivos na RT-PCR; o que proporcionaria um resultado positivo já nas primeiras 24 horas da chegada da amostra, em comparação com os 21 dias necessários para o resultado final da prova biológica. Dantas Jr et al. (2004) também relataram positividade pela hnRT-PCR em uma amostra de origem eqüina que apresentou resultado negativo para a IFD, o que comprova a utilidade da biologia molecular como técnica auxiliar no diagnóstico da raiva.

Ainda que a aplicação da hnRT-PCR tenha demonstrado ser eficiente e rápida para o diagnóstico do vírus rábico nas amostras sob congelamento por diferentes períodos, sua aplicação em amostras em decomposição apresentou menor sensibilidade. Estes resultados reforçam trabalhos anteriores, com outras técnicas diagnósticas para a raiva, sobre a necessidade da utilização de amostras em bom estado de conservação, armazenamento e transporte para um diagnóstico confiável (ALBAS et al., 1999; BRITO, 2002; CHHABRA et al., 2005), embora a aplicação das técnicas moleculares tenha apresentado resultados sensivelmente melhores quando comparados à utilização das técnicas de IFD e IC nas amostras putrefeitas em estudos anteriores.

Podemos considerar, no entanto, que os valores de sensibilidade encontrados quando da aplicação da associação das técnicas moleculares representa, na realidade, a sensibilidade da hnRT-PCR uma vez que esta

técnica foi aplicada somente as amostras que resultaram negativas na primeira amplificação (RT-PCR) realizando uma segunda amplificação a partir do mesmo material demonstrando, portanto, a maior eficácia da hnRT-PCR na detecção do vírus rábico em amostras armazenadas por diferentes períodos e submetidas a decomposição.

Os resultados obtidos com as técnicas moleculares, especialmente a hnRT-PCR, demonstram a viabilidade destas técnicas para estudos retrospectivos em amostras cerebrais de diferentes espécies animais, armazenadas por diferentes períodos em condições de armazenamento não consideradas ideais para a detecção do RNA viral incluindo a sua detecção em amostras putrefeitas.

7. CONCLUSÕES

- A técnica de RT-PCR apresentou menor sensibilidade em relação à técnica de hnRT-PCR de acordo com o protocolo e primers utilizados no presente estudo.

- A utilização de amostras em decomposição diminui a sensibilidade na aplicação das técnicas moleculares para a detecção do vírus rábico.

- As técnicas de biologia molecular, especialmente a hnRT-PCR permitem a detecção do vírus rábico em amostras armazenadas a -20°C por períodos variáveis e em condições de putrefação possibilitando estudos retrospectivos e a utilização dos produtos amplificados na caracterização epidemiológica viral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBAS, A. et al., Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p.19-22, 1999.

ARAI, Y. T.; YAMADA, K.; KAMEOKA, Y. et al., Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT- PCR. **Arch. Virol.**, v.142, n.9, p.1787-1796, 1997.

ARELLANO-SOTA, C. Vampire bat-transmitted rabies in cattle. **Reviews of Infec. Dis.**, v.10, n.4, p.707-709, 1988.

ARSLAM, A.; SAGLAM, Y.S.; TEMUR, A., Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using immunoperoxidase technique. **Vet. Rec.**, v.155, n.18, p.550-552, 2004.

AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M. et al, **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, ed. Universidade de Brasília, 2003.

BADRANE, H.; CHOKRI, B.; PERRIN, P. e TORDO, N. Evidence of Two *Lyssavirus* Phylogroups with Distinct Pathogenicity and Immunogenicity. **J. of Virology**, vol.75, n.7, p.3268-3276, 2001.

BELÁK, S. e BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the Polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet. Res. Commun.**, v.17, p.55-72, 1993.

BELOTTO, A.; LEANES, L.F.; SCHNEIDER, M.C. et al., Overview of rabies in the Americas. **Virus Research**, v.111, p.05-12, 2005.

BLACK, E.M.; McELHINNEY, L.M.; LOWINGS, P.L. et al., Molecular methods to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat Lyssaviruses. **J. Virol. Met.**, v.87, p.123-131, 2000.

BORDIGNON, J.; BRASIL-DOS-ANJOS, G.; BUENO, C.R. et al., Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Arch. Virol.**, v.150, p.695-708, 2005.

BOURHY, H.; ROLLIN, P.E.; VINCENT, J. et al., Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, n.3, p.519- 523, 1989.

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

BRITO, C.J.C., **Avaliação da técnica de imunofluorescência direta utilizando conjugado antiglicoproteína viral e antinucleocapsideo viral em material a fresco e em decomposição no diagnóstico da raiva.** Botucatu, 2002. 92f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

CARNIELI, P. J.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M.L. et al., Molecular epidemiology of rabies vírus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil, **Virus Research**, v.120, p.113-120, 2006.

CHHABRA, M.; BHARDWAJ, M.; ICHHPUJANI, R.L.; LAL, S. Comparative evaluation of commonly used laboratory tests for post-mortem diagnosis of rabies. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v.48, n.2, p.190-193, 2005.

CREPIN, P.; AUDRY,L.; GACOIN,A. et al., Invitram diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.4, p.1117-1121, 1998.

CUNHA, E.M.S.; LARA, M.C.S.H.; NASSAR, A.F.C. et al., Isolation of rabies vírus in *Artibeus fimbriatus* bat in the state of São Paulo, Brazil. **Rev. saúde pública**, v.34, n.4, p.683-684, 2005.

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

DAVID, D.; YAKOBSON, B.; ROTENBERG, D. et al., Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Vet. Microbiol.**, v.87, n.2, p.111-118, 2002.

DE LIMA, K.C.; MEGID, M.; SILVA, A.V.; CORTEZ, A., The heminested RT-PCR for the study of rabies vírus pathogenesis. **J. of Virol. Methods**, v.124, p.79-85, 2005.

DE MATTOS, C.C.; DE MATTOS, C.A.; LOZA-RUBIO, E. et al., Molecular characterization of vírus isolates from México: implications for transmission dynamics and human risk. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, n.4, p.587-597, 1999.

ERMINE, A.; LARZUL, D.; CECCALDI, P.E. et al., Polymerase chain reaction amplification of rabies virus nucleic acids from total mouse brain RNA. **Mol. Cell. Probes**, v.4, p.189-191, 1989.

FAVI, M.; DE MATTOS, C.C.; YUNG, V. et al., First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.1, p.79-81, 2002.

GOULD, A.R.; HYATT, A.D.; LUNT, R. et al., Characterization of a novel lyssavirus isolated from *Pteropid* bats in Australia. **Virus Res.**, v.54, p.165-187, 1998.

HEATON, P. R.; JOHNSTONE, P.; McELHINNEY, L.M. et al., 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.; FERNADES-MATIOLI, F.M.; CORTEZ, A. et al., Genealogical analysis of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiol. Infect.**, v.128, n.3, p.503-511, 2002.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO a, **Programa estadual de controle da raiva. Raiva animal confirmada por município no Estado de São Paulo –2001 a 2005.** Disponível em: http://www.pasteur.saude.gov.br/informações/por_cidade_htm. Acesso em 24/04/2007.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO b, **Casos notificados de raiva humananoBrasil.** Disponível em: http://www.pasteur.saude.gov.br/news/pptraiva_humana.jpg. Acesso em 24/04/2007.

ITO, M.; ARAI, Y.T.; SAKAI, T. et al., Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v.284, p.214-222, 2001a.

ITO, M.; ITOU, T.; SAKAI, T. et al., Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. **J. Vet. Med. Sci.**, v.63, n.12, p.1309-1313, 2001b.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y. et al., Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies virus in Brazil by strain-specific reverse-transcriptase chain reaction and restriction length polymorphism analysis. **J. Clin. Virol.**, v.26, p.317-330, 2003.

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

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

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y. et al. Molecular Epidemiological Analysis of Bat Rabies Viruses in Brazil. **J. Vet. Med. Sci.**, v.67, n.7, p.647-652, 2005.

KOPROWSKI, H. Visit to an ancient curse. **Sci. Am. Sci. Med.**, v.2, p.48-55, 1995.

KULONEN, K.; FEKADU, M.; WHITFIELD, S. et al., An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival carnoy-fixed paraffin-embedded brain tissues. **Zentralbl. Veterinarmed.**, v.46, n.7, p.503, 1999.

LANGONI, H.; LIMA, K.; MONOZZI, B.D.; SILVA, R.C. Rabies in the big fruit eating bat *Artibeus lituratus* from Botucatu, southeastern Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.11, n.1, p.84-87, 2005.

LEWIS, V.J.; THACKER, W.L.; Limitations of deteriorated tissue for rabies diagnosis. **Health Lab. Sci.**, v.11, n.1, p.08 -12, 1974.

LOPES, M.C.; VEDITTI, L.L.R.; IAMAMOTO, K.; CARVALHO, C.; QUEIROZ, L.H.Q. Viabilidade e detecção do genoma do vírus da raiva em amostras congeladas por longo período de tempo. In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2006, Marília. **Anais...Marília**, 2006.

MACEDO, C.I.; CANNIELLI, P.J.; BRANDÃO, P. E. et al. Diagnosis of human rabies by polymerase chain reaction of neck-skin samples. **Braz. J. Infec. Dis.**, v.10, n.5, p.341-345, 2006.

NADIN-DAVIS, S.A. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. **J. Virol. Methods**, v.75, n.1, p.1-8, 1998.

NOORDHUIZEN, J.P.; FRARKENA, K.; VAN DER HOOFD.; GRAAT, E.A.M. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology.** Wageningen, 1997.

OIE Organization Internacional des Epizooties. **Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals.** 5th edition, 2004. Disponível em http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00044.htm. Acesso em 09/04/2007.

PAEZ, A.; NUNEZ, C.; GARCIA, C. et al. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia, 1994 – 2002: evidence of human and canine rabies associated with Chiroptera. **Biomedica**, v.23, n.1, p.19-30, 2003.

PICARD-MEYER, E.; BRUYÉRE, V.; BARRAT, J. et al., Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus. Comparison with other rabies diagnostic methods. **Vaccine**, n.22, p.1921-1929, 2004.

PRINGLE, C.R.. The order Mononegavirales. **Arch. Virol.**, v.117, p.137-140, 1991.

ROJAS, A. E.; LOZA-RUBIO, E.; BANDA, R. V. M.; HERNÁNDEZ, B. E., Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determinate the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.18, p.98-101, 2006.

ROMJIM, P. C.; VAN DER HEIDE, R.; CATTANEO, C.A.M. et al., 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.

ROSA, E.S.T.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T.F.S. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerg. Infect. Diseases**, v.12, n.8, p.1197-1202, 2006.

RUDD, R.J. e TRIMARCHI, C.V., Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, n.11, p.2522-2528, 1989.

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

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

SAIKI, R.K.; SCHARF, S. e FALLOMA, F..Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W.; **Molecular Cloning – a laboratory manual**. 3ed. Cold Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; et al. Genetic and Phylogenetic Analysis of Rabies Vírus Isolated from Several Species in Brazil. **J. Vet. Med. Sci.**, v.77, n.7, p.747-753, 2004.

SATO, G.; TANABE, H.; SHOJI, Y. et al., Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host especies in Brazil by multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. **J. Clin. Virol.**, v.33, p. 267-273, 2005.

SATO ,G.; SHOJI, Y.; SATO, T. et al., Molecular epidemiology of rabies from Maranhao and surrounding states un the northeastern region of Brazil. **Arch. Virol.**, v.151, p.2243-2251, 2006.

SCHAEFER, R.; CALDAS, E.; SCHMIDT, E. et al., First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years. **Vet. Rec.**, v.16, p.216, 2002.

SCHAEFER, R.; BATISTA, H.B.R.; FRANCO, A.C. et al., Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Vet. Microbiol.**, v.107, p.161-170, 2005.

SOAES, R. M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S.M. et al., A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. **Mem. Inst. Oswl. Cruz**, v.97, n.1, p.109-111, 2002.

TAKAOKA, N.Y. Relato de caso de raiva humana após-exumação – Município de São Paulo. **BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista**, n.7, 2004. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa7_rh.htm. Acesso em 24/04/2007.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2.ed. London: Butterworth, 1986. 280p.

VALENTINI, E.J.G. et al., Imunoflorescência realizada em cérebros de camundongos infectados com vírus rábico – cepa CVS, em diferentes estágios de decomposição. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.33, n.3, p.181-186, 1991.

VÁZQUEZ-MORÓN, S.; AVELLÓN, A. e ECHEVARRÍA, J.E., RT_PCR for detection of all seven genotypes of *Lyssavirus* genus. **J. of virol. Methods**, v.135, p.281-287, 2006.

WACHARAPLUESADEE, S.; RUANGVEJVORACHAI, P.; HEMACHUDHA, T. A simple method for detection of rabies viral sequences in 16-year old archival brain specimens with one-week fixation in formalin. **J. of virol. Methods**, v.134, p.267-271, 2006.

WARNER, C.K.; SCHURR, T.G.; FEKADU, M. Molecular Characterization of carrier rabies isolates. **Virus Res.**, v.41, p.133-140, 1996.

WARNER, C.K.; ZAKI, S.R.; SHIEH, W. et al., Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.60, n.3, p.502-507, 1999.

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. wildl. Dis.**, v.33, n.4, p.912-915, 1997.

WHO Expert Committee on Rabies. **WHO Technical Report Series**, n.824, p.7. Eight report, No.824. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Geneva, 1992.

WHO Expert Committee on Rabies. **Rabies: Fact Sheet N°99**. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en>. Acesso em 20/04/2007.

WOLDEHIWET, Z. Rabies: Recent developments. **Res. Vet. Sci.**, v.73, p.17-25, 2002.