

Marilene Fernandes de Almeida

Imunização indireta de morcegos
hematófagos *Desmodus rotundus* em
cativeiro, com vacina anti-rábica V-RG,
veiculada em pasta neutra

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia experimental

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Massad

São Paulo
2003

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Marilene Fernandes de
**Imunização indireta de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* em
cativeiro, com vacina anti-rábica V-RG, veiculada em pasta neutra / Marilene
Fernandes de Almeida. -- São Paulo, 2003.**

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Eduardo Massad.

Descritores: 1.RAIVA/prevenção & controle 2.QUIRÓPTEROS/imunologia
3.CONTROLE DE VETORES 4.VACINA ANTI-RÁBICA/administração &
dosagem 5.VACINAS SINTÉTICAS/administração & dosagem 6.VACINAÇÃO/
métodos 7.MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS 8.INFECCÃO/virologia
9.PROTOCOLOS 10.SEGURANÇA/normas

USP/FM/SBD-076/03

AGRADECIMENTOS

Para Eduardo Massad, meu orientador, que tornou possível a realização deste trabalho, o meu carinho e admiração.

Para Elizabeth A. Costa Aguiar que além de chefe foi sempre uma amiga especial

Para Luzia F.A. Martorelli que me ofereceu uma ajuda especial e surpreendente.

Para Caroline Cotrin Aires, com quem dividi sábados, domingos e feriados, com alegria, bom humor e entusiasmo, tornando o imenso trabalho, possível e muito mais fácil.

Pelo trabalho voluntário no campo, na localização de abrigos e captura de morcegos, meus agradecimentos a:

- ✓ Carlos Alberto Venésio Gomes da Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de Paraisópolis-Minas Gerais, que com sua gentileza e disposição, tornou o trabalho de campo uma aventura.
- ✓ Alberto Dangeri da Prefeitura Municipal de Itatiba e Murilo pelas indicações de abrigos e profissionais de apoio.
- ✓ Luís Carlos Ismerim e José Carlos Pinto do Escritório de Defesa Agropecuária de Sorocaba-SP.

Pelas orientações técnicas no manejo, alimentação e coleta de sangue dos morcegos meus agradecimentos a Marisa Cardoso, Prof. Dr. Wilson Uieda do Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Patrícia Pozzetti da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e Elizabeth Loza Rubio do Centro Nacional de Microbiologia Veterinária – INIFAP - México

Aos colegas do setor de Entomologia do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do Município de São Paulo e ao Museu de Zoologia da USP pela identificação do coleóptera.

À diretoria do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do Município de

São Paulo que permitiu e incentivou a realização do trabalho, representada aqui por Maria Lúcia de Oliveira.

À **todos** os colegas do CCZ-SP, pelo incentivo e interesse, representados por: Elisa S. M. M. Savani, Maria Cecília G. O. Camargo, Sandra R. N. Daurea, Maria Adelaide Galvão, Hildebrando Montenegro Neto, Érica G. Berardis, Míriam Sodré, Thirsa Alvares Franco, Sônia A. Galdino Silvana Facchinetti, e Lúcia Eiko.

Aos colegas do laboratório de raiva de CCZ-SP, Benedita Mihalik, Antonio D. Fechio, Sônia Bortoletto, Marinalva Guedes e Dorvantina Umbelina de Souza.

À Akio Sato, Cristiano Von Simson e Emílio Salani da Merial Saúde Animal Ltda pelo fornecimento da vacina V-RG usada nesse experimento.

À Ricardo Pamplona da Coordenadoria de Produtos Veterinários - Departamento de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura pelo auxílio na liberação da entrada da vacina no Brasil.

Aos colegas do Departamento de Informática Médica: Vilma A. Duarte Sanches, Valtair Santana e Ruberval da Silva da Faculdade de Medicina-USP.

Ao Dr. Cristian do Frigorífico Itapeceira S/A-FISA pelo fornecimento de sangue para alimentação dos animais.

A torcida da sua vida

Carlos Drummond de Andrade

Mesmo antes de nascer, já tinha alguém torcendo por você.

Tinha gente que torcia para você ser menino.

Outros torciam para você ser menina.

Torciam para você puxar a beleza da mãe, o bom humor do pai.

Estavam torcendo para você nascer perfeito.

Daí continuaram torcendo.

Torceram pelo seu primeiro sorriso, pela primeira palavra,

pelo primeiro passo.

O seu primeiro dia de escola foi a maior torcida.

E o primeiro gol, então?

E de tanto torcerem por você, você aprendeu a torcer.

Começou a torcer para ganhar muitos presentes e flagrar Papai Noel.

Torcia o nariz para o quiabo e a escarola.

Mas torcia por hambúrguer e refrigerante.

Começou a torcer até para um time.

Provavelmente, nesse dia, você descobriu que tem gente

que torce diferente de você.

Seus pais torciam para você comer de boca fechada, tomar banho,

escovar os dentes, estudar inglês e piano.

Eles só estavam torcendo para você ser uma pessoa bacana.

Seus amigos torciam para você usar brinco, cabular aula, falar palavrão.

Eles também estavam torcendo para você ser bacana.

Nessas horas, você só torcia para não ter nascido.
E por não saber pelo que você torcia, torcia torcido.
Torceu para seus irmãos se ferrarem, torceu para o mundo explodir.

E quando os hormônios começaram a torcer, torceu pelo primeiro beijo,
pelo primeiro amasso. Depois começou a torcer pela sua liberdade.

Torcia para viajar com a turma, ficar até tarde na rua.
Sua mãe só torcia para você chegar vivo em casa.
Passou a torcer o nariz para as roupas da sua irmã,
para as idéias dos professores e para qualquer opinião dos seus pais.

Todo mundo queria era torcer o seu pescoço.
Foi quando até você começou a torcer pelo seu futuro.
Torceu para ser médico, músico, advogado.
Na dúvida, torceu para ser físico nuclear ou jogador de futebol.

Seus pais torciam para passar logo essa fase.
No dia do vestibular, uma grande torcida se formou.
Pais, avós, vizinhos, namoradas e todos os santos torceram por você.

Na faculdade, então, era torcida pra todo lado.
Para a direita, esquerda, contra a corrupção,
a fome na Albânia e o preço da coxinha na cantina.

E, de torcida em torcida, um dia teve um torcicolo de tanto olhar para ela.

Primeiro, torceu para ela não ter outro.
Torceu para ela não te achar muito baixo, muito alto,
muito gordo, muito magro.
Descobriu que ela torcia igual a você.

E de repente vocês estavam torcendo para não acordar desse sonho.

Torceram para ganhar a geladeira, o microondas e a grana para a viagem de lua-de-mel.

E daí pra frente você entendeu que a vida é uma grande torcida.

Porque, mesmo antes do seu filho nascer, já tinha muita gente torcendo por ele.

Mesmo com toda essa torcida, pode ser que você ainda não tenha conquistado algumas coisas.

Mas muita gente ainda torce por você!

"Se procurar bem você acaba encontrando.

Não a explicação (duvidosa),

mas a poesia (inexplicável) da vida."

Este trabalho é dedicado ao futuro,
representado pelos meus "meninos"
Otávio e Gabriel.

ALMEIDA, M.F. IMUNIZAÇÃO INDIRETA DE MORCEGOS HEMATÓFAGOS *Desmodus rotundus* EM CATIVEIRO, COM VACINA ANTI-RÁBICA V-RG, VEICULADA EM PASTA NEUTRA. São Paulo, 2003, 144 páginas. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

RESUMO

Os morcegos, em especial o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, tornaram-se um dos mais importantes vetores e ou reservatórios do vírus rábico em muitos países da América Latina. Para desenvolver experimentos em cativeiro com esse morcego e o vírus rábico foi desenvolvido um novo modelo de gaiola. Confeccionadas em policarbonato (resistente e transparente) permitindo total visualização dos animais para observação, filmagem e fotografia. As gaiolas são montadas em uma estante para várias gaiolas, com sistemas independentes para insuflamento e exaustão de ar. Possui um pré filtro de entrada (retenção de 97% de partículas de 3 a 7 μm), um filtro de entrada e um de saída (HEPA). A exaustão e o insuflamento são realizados diretamente no interior da gaiola. Esse sistema foi incorporado à gaiola considerando a possibilidade de formação de aerossóis de vírus rábico e infecção. Além disso, o sistema de exaustão diminui sensivelmente o cheiro típico das excretas dos animais, permitindo a observação "in loco" quase sem incômodo para o observador. Optou-se por bebedouros externos, evitando assim a abertura diária da gaiola e assegurando a higiene do alimento. O desenho das gaiolas minimiza o estresse para o animal por diminuição da manipulação e oferece segurança para os pesquisadores. O consumo adequado de sangue (desfibrinado), a manutenção da massa corpórea, a baixa mortalidade (19,8%) e a longevidade mostram a boa adaptação dos animais a esse tipo de gaiola. Depois do período de adaptação ao cativeiro, foi realizada a infecção experimental dos morcegos com vírus rábico isolado de morcego hematófago naturalmente infectado. O objetivo era determinar a suscetibilidade do morcego ao vírus rábico e a resposta imune humoral desses animais. Os morcegos foram separados em quatro grupos de dez animais cada. A diluição de vírus rábico contendo 100, 1.000, 10.000 e 100.000DL₅₀ICC foi administrada no músculo peitoral (0,1ml) e os animais foram observados por 90 dias. O grupo controle foi inoculado com salina. O título de anticorpos neutralizantes foi determinado pela Técnica de Inibição de Foco de Fluorescência Rápida. O diagnóstico de raiva foi feito do cérebro e das glândulas salivares dos morcegos através das técnicas de Imunofluorescência Direta, Inoculação em Camundongos e RT-PCR. A mortalidade observada foi de 0%, 20%, 20% e 60% respectivamente. O período de incubação variou de 5 a 41 dias e o período de morbidade foi entre 18 e 48 horas. Anticorpos neutralizantes acima de 0,5UI/ml foram encontrados em 47,5% dos morcegos 30 dias depois da inoculação de vírus.

Entre os dez morcegos que morreram de raiva, oito apresentaram sinais de raiva parálitica e dois não apresentaram nenhuma evidência da doença. A dose letal que desenvolveu doença em 60% dos animais do experimento ($10^5 DL_{50} ICC$) foi usada nos experimentos de vacinação oral de *D. rotundus*, com vacina recombinante de vírus vaccinia e glicoproteína rábica (V-RG). Para demonstrar que a via oral de aplicação da vacina era hábil para induzir a produção de anticorpos neutralizantes e proteção em morcegos vacinados, grupos de 7, 8, 7, 6 e 10 morcegos receberam 0,25ml; 0,75ml; 1,25ml; 2,0ml e 3,5ml da vacina via esofágica. A sobrevivência após desafio foi de 14%, 25%, 42%, 66% e 100% respectivamente. Na seqüência, a vacina homogeneizada em uma pasta neutra (vaselina ou glicerina) foi testada em oito grupos de 7, 7, 7, 7, 7, 9, 9 e 10 morcegos. Para isso, o volume de nove e dezoito vacinas foi concentrado em 1,2ml a 2,0ml através de dialise em solução super saturada. Esse volume foi homogeneizado em 1,5gramas a 2,5gramas de pasta e corante (como indicador do contato). A vacina foi então aplicada no dorso de um ou dois morcegos vetores devolvidos a gaiola. O objetivo do experimento era testar se a administração da vacina através de uma pasta neutra em um morcego poderia induzir imunidade no morcego que recebeu a pasta com vacina e indiretamente proteger outros morcegos do mesmo grupo através do contato com o animal que recebeu a pasta com vacina e estudar uma alternativa ao uso do anticoagulante. A sobrevivência após desafio foi de 42,8%, 71,4%, 57,1%, 57,1%, 71,4%, 62,5%, 55,5% e 60%, respectivamente. Os resultados são promissores uma vez que, um significativo número de morcegos que não receberam pasta sobreviveu ao desafio. A vacina mostrou-se segura e imunogênica para morcegos hematófagos, produzindo altos títulos de anticorpos. Nenhum efeito adverso ao vírus vaccinia foi observado.

ALMEIDA, M.F. INDIRECT IMMUNIZATION OF *Desmodus rotundus*, IN CAPTIVITY, WITH ANTI-RABIES V-RG VACCINE THROUGH OF NEUTRAL VEHICLE. São Paulo, 2003, 144 páginas- Tese de doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

Bats, in special the *Desmodus rotundus* have been pointed as one of the most important vector and or wildlife reservoir of rabies in many countries of Latin America. A new cage was developed for experimental purposes with respect to rabies virus and hematophagous bat *Desmodus rotundus*. The design minimized the stress to bats and offered safety conditions to researchers. The cages are made of polycarbonate (resistant and transparent) allowing total visualization of bats for observation, photos and monitoring by filming. The cages are placed in a stand for many cages, with two independent systems, one to insufflation and other to exhaustion of air. A pre-filter unit, an inner and outer HEPA filters, guarantees insufflation and exhaustion through the interior of cages, considering the possibility of aerosol formation and air-borne infections. In addition, the exhaustion system decreases the smell, characteristic of bat's excrement, permitting the observation "in loco" almost without discomfort to the researcher. The drinking places are external and are similar to the model used with other laboratory animals. The adequate consumption of defibrinated blood, the maintenance of weight, the low mortality of the bats (19.8%) and their longevity demonstrate the good adaptation of bats to the captivity in this type of cage. After a adaptation period, in order to determine the susceptibility of *Desmodus rotundus* to rabies virus and serum neutralising antibody response, bats were inoculated with a rabies virus isolated from a naturally infected hematophagous bat. They were divided into four groups of ten animals each. A dilution of rabies virus containing 100; 1,000; 10,000 and 100,000MICDL₅₀ was administrated into the pectoral muscle (0.1ml) and the animals were observed for 90 days. Neutralising antibody were tested by Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test. The presence of rabies virus was detected from brain and salivary glands by Fluorescent Antibody, Mouse Inoculation Test and RT-PCR. The observed mortality was 0%, 20%, 20% and 60% respectively. The incubation period ranged from 5 to 41 days and the morbidity period was usually from 18 to 48 hours. Serum neutralising antibodies above 0.5IU/ml were found in 47.5% of bats 30 days after de virus inoculation. Among the ten bats that died of rabies, eight showed signs of paralytic rabies and two bats showed no evidence of the disease. The dose that produced disease in 60% of the animals of the experiment 10⁵ MICLD₅₀, was used as challenge in vaccination experiments. The vacine used was the vaccinia-rabies glycoprotein (V-RG) recombinant virus vaccine. To demonstrate that the oral route of vaccine is able to induce the production of

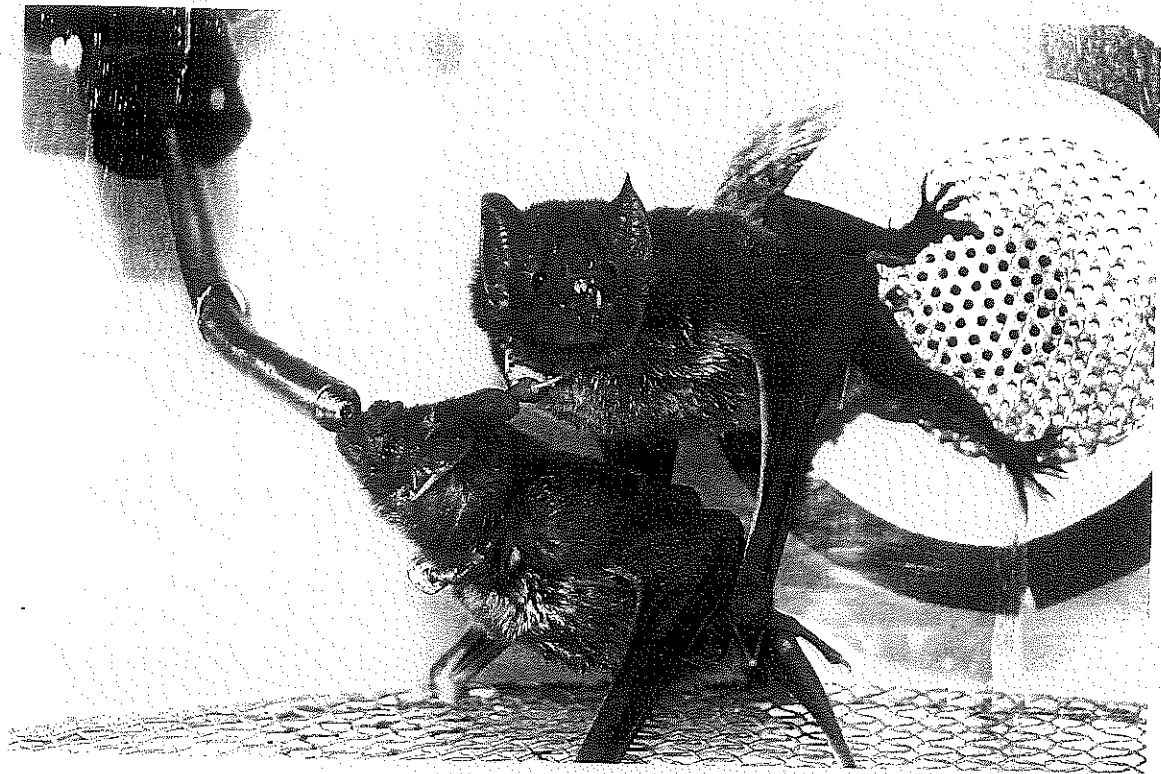
neutralizing antibodies and protection in vaccinated bats, five groups of bats were vaccinated with 0.25ml; 0.75ml; 1.25ml; 2.0ml and 3.5ml directly into the mouth. The survival rate obtained was 14%, 25%, 42%, 66% and 100% respectively. In the second step, the vaccine was applied in a neutral vehicle spread on the back of one or two vector bats comeback to the group. We expected, as in the case of bat control by vampiricide paste, that the administration of V-RG vaccine through paste in one bat can induce immunity in it and be able to indirectly protect other bats from the same colony. Eight groups with 7, 7, 7, 7, 7, 9, 9, and 10 bats were tested. The volume of nine and eighteen V-RG vaccine were concentrate in 1.2ml to 2.0ml by dialysis in super saturate solution. This volume was homogenate in 1.5grams to 2.5gramas of paste and color. The survival rate was 42.8%, 71.4%, 57.1%, 57.1%, 71.4%, 62.5%, 55.5% and 60%, respectively. The results are encourage because a significant number of bats that no receive the paste with vaccine survive to challenge. The vaccine showed safety and immunogenic to hematophagous bats. No adverse effects to vaccinia virus was observed.

LISTA DE ANEXOS

- 1-Raiva Humana no Brasil, 1986 a 2000 - Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde.
- 2-Raiva Animal no Brasil, 1994 a 2000 – Organização Pan-americana da Saúde e Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde.
- 3-Raiva Humana no Estado de São Paulo, 1983 a 2001-Secretaria Estadual da Saúde - Coordenação do Programa de Controle da Raiva.
- 4-Raiva Animal no Estado de São Paulo, 1995 a 2001 -Secretaria Estadual da Saúde – Instituto Pasteur - Coordenação do Programa de Controle da Raiva.
- 5- Raiva em morcegos no Estado de São Paulo, 1996 a 2001 -Secretaria Estadual da Saúde – Instituto Pasteur - Coordenação do Programa de Controle da Raiva.
- 6-Folders: Raiva dos Herbívoros, 1998 e 2000.
- 7-Raiva em Morcegos segundo hábito alimentar no Estado de São Paulo-1992 a 2001 - Secretaria Estadual da Saúde – Instituto Pasteur Coordenação do Programa de Controle da Raiva.
- 8-Atividades de controle da população de hematófagos - Secretaria da Agricultura - Escritórios de Defesa agropecuária do Estado de São Paulo, 2000 e 2001.
- 9- Licença para captura, coleta e transporte de animais silvestres do IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 01/2000 a 01/2001 e 05/2001 a 05/2002.
- 10-Ficha de monitoramento dos animais em cativeiro.
- 11-árvores filo-genética – Relação genética entre amostras de vírus rábico de *Desmodus rotundus*, bovinos e eqüinos isoladas no Brasil, determinada pela análise do gene da nucleoproteína do vírus rábico.
- 12- Catálogo da Merial Saúde Animal Ltda – vacina Raboral V-RG.
- 13- Certificado de análise - Vacina Raboral V-RG Merial Saúde Animal Ltda.
- 14- Aprovação da Comissão de Ética da FM-USP.
- 15-Tabela: Temperatura média mensal no cativeiro de *Desmodus rotundus*, julho/01 a fevereiro/02.

ÍNDICE

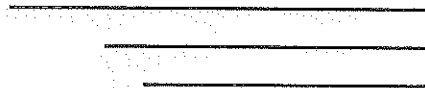
AGRADECIMENTOS	i
DEDICATÓRIA	ii
RESUMO	iii
SUMMARY	iv
LISTA DE ANEXOS	v
INTRODUÇÃO:	
OS MORCEGOS E A RAIVA	1
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA RAIVA	3
ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA DE QUIRÓPTEROS	7
BIOLOGIA DE <i>Desmodus rotundus</i>	8
IMPORTÂNCIA SOCIAL E ECONÔMICA	13
MÉTODOS DE CONTROLE DA POPULAÇÃO DE MORCEGOS	16
A VACINA RECOMBINANTE DE GLICOPROTEÍNA RÁBICA (V-RG)	21
HIPÓTESE, JUSTIFICATIVA	24
OBJETIVOS	25
MATERIAL E MÉTODOS:	
1-CATIVEIRO	27
2-TÉCNICAS LABORATORIAIS	38
3-DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO	46
RESULTADOS:	
1-CATIVEIRO	52
2-INFECÇÃO EXPERIMENTAL	56
3-VACINAÇÃO	67
DISCUSSÃO	82
CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	



Sofisticado sistema de vôo, e não é ave,
Período gestacional longo,
Cuidado materno prolongado,
Se alimenta em qualquer mamífero,
sem provocar morte ou dor,
Permanece a maior parte do tempo de cabeça para baixo,
Entre os morcegos e o único que além de voar, anda e salta,
Entram em estado de torpor, poupam energia,
Um animal robusto e vigoroso,

Alguns vêem apenas um animal feio...
Alguns enxergam um animal magnífico...

Introdução



OS MORCEGOS E A RAIVA

Embora a raiva seja uma doença conhecida desde a antiguidade, com relatos nos escritos de Aristóteles e Hipócrates (500 aC) e os morcegos já tivessem sua presença registrada há 50 milhões de anos (Taddei, 1996), o primeiro pesquisador a relacionar a raiva aos morcegos foi Carini (1911) que estudando uma epizootia em Santa Catarina, Brasil, envolvendo eqüinos e bovinos, relatou a ausência de cães no ciclo epidêmico e ataques diurnos de morcegos aos animais, levantando a hipótese dos morcegos serem os transmissores da doença para os animais.

Essa hipótese foi confirmada pelos estudos de Haupt e Rahaag (1921 e 1925) que analisando uma área de mata fechada, entre serras, dividida por um rio de grande largura, que segundo os autores tornavam a região intransitável para cães e associando esses fatos a existência de mortalidade dos dois lados do rio e à ataques e sobrevivências diurnos de morcegos, concluíram que a raiva naquela área havia sido transmitida por morcegos. Faltava o isolamento do vírus rábico, o que foi feito de um morcego frugívoro *Phyllostoma superciliatum* (atualmente chamado de *Artibeus lituratus*), que estava "mordendo" uma vaca. Acredita-se que esse morcego foi imprópriamente identificado como frugívoro e que tratava-se de um morcego *Desmodus rotundus* já que a distância entre os dentes incisivos, assim como o tipo de ferida produzida e a localização das mordidas são características do morcego vampiro e não de frugívoros (Baer, 1975).

Na década de 30 ocorreram epidemias em bovinos no Brasil, Colômbia, Bolívia, Venezuela, México e Trinidad. Em Trinidad, a epidemia atingiu 2000 animais e 53 pessoas. A doença foi inicialmente diagnosticada como botulismo nos animais e poliomielite em humanos, porém Hurst e Pawan (1931 e 1932) observaram o grande número de mordidas de vampiros em bovinos que posteriormente morreram, sugerindo que os morcegos eram os responsáveis pela transmissão da doença, o que se confirmou com o isolamento do vírus em numerosos morcegos frugívoros e hematófagos. Em 1936, Pawan estudou outra epidemia de raiva ocorrida em Trinidad que levou a morte milhares de bovinos e 89 humanos e isolou, pela primeira vez, o vírus rábico de um morcego insetívoro.

Estudos realizados na década de 30, estabeleceram as formas de manifestação do vírus rábico em morcegos como furiosa ou parálitica. Alguns pesquisadores relataram também o estado de portador assintomático no qual o animal, quando experimentalmente infectado, podia transmitir continuamente o vírus na saliva por diversos meses, sem manifestar qualquer anormalidade e a ocorrência da forma furiosa de raiva, seguida de recuperação (Hurst e Pawan 1932; Queiroz Lima 1934; Torres e Queiroz Lima 1935 e 1936 e Pawan 1936).

O Estado de portador assintomático e a forma furiosa seguida de

recuperação não foi confirmada por Moreno e Baer (1980) que não observaram nenhum animal que adoecesse e morresse excretando vírus na saliva como portador, nenhum animal que adoecesse e se recuperasse da doença e nenhum animal que excretasse vírus na saliva e permanecesse saudável. Porém a ausência de sintomas em morcegos experimentalmente e naturalmente infectados continuou a ser relatada em morcegos não hematofagos (Sulkin *et al.*, 1959) e morcegos *Desmodus rotundus* (Setien *et al.*, 1998; Rodrigues e Tamayo, 2000).

A mordedura é a forma de transmissão mais comum da doença, mas já foram confirmadas a transmissão do vírus através de aerossóis (Constantine, 1962; Constantine, 1967b), via transmamária e transplacentária (Baer, 1975), por ingestão de leite infectado (Constantine, *et al.*, 1968) e infecção pré-natal (Steece e Calister, 1989). Constantine *et al.* (1972) demonstraram a mucosa nasal como a potencial porta de entrada em infecção natural, via aerossóis e porta de saída através da qual o vírus é expelido no ar. Steece e Calister (1989) ressaltam a via respiratória como o principal meio de contágio entre os morcegos.

Em morcegos *Desmodus rotundus* experimentalmente infectados, via intra-muscular, o período de incubação varia de 9 a 38 dias (Pawan, 1936; Acha, 1967), entretanto a dose viral usada para infecção não foi especificada. Existem relatos de longos períodos de incubação para *D. rotundus*, 171 dias (Pawan, 1936) e para *Eptesicus fuscus* "que desenvolveu sinais de raiva 209 dias após ser capturado e morreu 4 dias após o aparecimento dos sintomas" (Moore e Raymond, 1970). O período de morbidade em *Desmodus rotundus* infectados experimentalmente é de menos de 24 horas (Setien *et al.*, 1998) a 3 dias (Acha, 1967).

A positividade do vírus rábico nas populações de morcegos é difícil de ser determinada, os estudos na sua maioria, se baseiam em relatórios de serviços, os animais são encaminhados por munícipes ou capturados em razão da queixa de munícipes e as amostras não são aleatórias. A positividade nesses estudos varia de 3,0% a 11% (Richardson *et al.*, 1966; Birney e Rising, 1967; Trimarchi e Debbie, 1977; Schowelter, 1980; Steece *et al.*, 1982; Burnett, 1989).

Os estudos sobre a prevalência de anticorpos anti-rábicos neutralizantes (AcN) em morcegos apresentam a mesma dificuldade e mostram grande variação. Em uma colônia de *Tadarida brasiliensis mexicana* no Novo México, Constantine *et al.* (1968) encontraram uma prevalência de 20% de anticorpos. Delpietro *et al.* (1972) detectaram 24,2% dos morcegos *Desmodus rotundus* de área enzoótica da Argentina com anticorpos, sem o isolamento do vírus. Em área epizoótica a prevalência foi de 4,2% e o vírus foi isolado em 8 de 33 dos morcegos.

Em morcegos frugívoros *Eidolon helvum*, na Nigéria, Aghomo *et al.* (1990) obtiveram prevalência de anticorpos de 18,0%. Na Ilha de Granada,

Price e Everard (1977) detectaram 27 em 353 (7,6%) morcegos não hematófagos com AcN. Steece e Altenbach (1989) encontraram uma prevalência de 69,0% de anticorpos anti-rábicos IgG e 2,0% de IgM, em *Tadarida brasiliensis mexicana*, no Novo México. O vírus foi isolado em menos de 1,0% dos espécimes.

No Brasil, os estudos sobre positividade do vírus rábico são raros. Almeida *et al.*, (1998) analisando 4134 espécimes recebidos para diagnóstico de raiva, do Estado de São Paulo detectaram dezessete morcegos (0,41%) positivos para raiva (2 *Nyctinomops macrotis*, 3 *Histiotus velatus*, 2 *Myotis nigricans*, 1 *Lasiurus borealis*, 1 *Lasiurus cinereus*, 1 *Desmodus rotundus*, 1 *Carrollia perspicillata*, 3 *Tadarida brasiliensis* e 3 *Artibeus lituratus*). O soro de 1277 destes morcegos foi testado para AcN e a prevalência obtida foi de 4,2%. Os morcegos insetívoros e os *Molossus molossus* constituíram a maioria da amostra (70,5% e 55,2% respectivamente) e 88% foram capturados em habitações de áreas urbanas.

Queiroz da Silva *et al.* (1998) encontraram positividade do vírus rábico de 1,65% em 302 morcegos analisados (2 *Molossus ater*, 1 *Artibeus lituratus*, 1 *Molossus molossus* e 1 *Lasiurus ega*), na Região de Araçatuba, São Paulo, no período de 1993 a 1998.

Souza (1995) encontrou em 8 de 210 (3,8%) soros de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, níveis detectáveis de AcN na região do Vale do Paraíba, São Paulo.

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA RAIVA

1- NO MUNDO

Segundo o relatório da OMS - Organização Mundial da Saúde, 33.209 pessoas e 34.163 animais morreram de raiva no ano de 1996 e mais de seis milhões de pessoas receberam tratamento anti-rábico pós exposição. O cão permanece como o principal transmissor de raiva para o homem e também como principal vítima da doença, porém nos países que conseguiram controlar a raiva em animais domésticos como os Estados Unidos, o Canadá e vários países europeus, o vírus rábico se mantém circulante na natureza fundamentalmente através dos animais silvestres .

Entre os animais silvestres, os morcegos constituem um dos principais reservatórios do vírus. Nas últimas décadas tem sido freqüente os relatos de morcegos com raiva em vários países do mundo (WHO, 1996; OPS, 1999).

Nos Estados Unidos, dos 32 casos de raiva humana ocorridos de 1990 a 2000, 30 foram transmitidos por variantes do vírus rábico associadas a morcegos insetívoros. Somente em dois casos, a mordida do morcego foi

reconhecida, em 74% dos casos o contato com o morcego não foi estabelecido e somente a tipificação antigênica demonstrou a origem da cepa (CDC, 2000).

Em 1999, os morcegos foram responsáveis por 10,9% dos 100 casos de raiva humana notificados nas três Américas. No mesmo ano ocorreram 1127 casos de raiva em morcegos, sendo 989 (91,5%) notificados por Estados Unidos e Canadá. Esses casos se referem a morcegos insetívoros e frugívoros, uma vez que os morcegos hematófagos não habitam a América do Norte.

O papel dos morcegos não hematófagos como transmissores da raiva humana parece ser acidental. Mesmo entre os hematófagos, na maior parte dos casos de raiva humana, o contato foi ocasional e a agressão ocorreu por manipulação indevida de morcegos moribundos (Manual de Manejo e Controle, 1996).

A América Latina notificou 96 casos de raiva em morcegos no ano de 1999: 22 em hematófagos, 45 em insetívoros e frugívoros e 29 casos nos quais o hábito alimentar do animal não é especificado. Entretanto os dados notificados a OPAS - Organização Panamericana de Saúde estão subestimados, o relatório aponta 10 casos de raiva em morcegos ocorridos em 1999 no Brasil enquanto a Coordenação do Programa Estadual da Raiva, relatou só para o Estado de São Paulo, 28 casos de raiva em morcegos.

Os estudos de amostras de vírus rábico isoladas em diferentes espécies, através da técnica de anticorpos monoclonais com painel do CDC-OPAS (Center for Disease Control and Prevention-Organização Panamericana de Saúde) e do sequenciamento genético, tem comprovado a existência de duas variantes predominantes como os principais reservatórios e vetores do vírus rábico na maioria dos países da América Latina: a variante canina e a de *Desmodus rotundus*.

O primeiro estudo com 288 amostras provenientes de 17 países da América Latina e Caribe, pela técnica de anticorpos monoclonais, foi realizado por Diaz *et al.* (1994) e mostrou que essas duas variantes estavam amplamente distribuídas na região. Todos os isolados humanos eram de uma dessas duas variantes. Uma amostra de animal doméstico (gato) apresentava a variante de *Desmodus rotundus*.

Através da mesma técnica, estudos realizados com amostras do Brasil, Argentina e Paraguai, do período de 1987 a 1995 e do período de 1992 a 2000 confirmaram as variantes canina e do morcego hematófago como predominantes: A variante de *D. rotundus* foi detectada em bovinos, eqüinos, raposas, morcegos hematófagos e não hematófagos. A variante canina foi detectada em cães, um humano, um búfalo, um bovino e uma lhama. O estudo detectou também as variantes características de morcegos insetívoros, em *Tadarida brasiliensis*, *Lasiurus cinereus* e *Molossus molossus*

(Delpietro *et al.*, 1997; Gury Dohmen e Mena Segura, 2000).

Os estudos com amostras do Peru, Colômbia e Venezuela também mostram o predomínio das variantes canina e de *D.rotundus* (Villalobos, *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 1998; de Mattos, *et al.*, 1996).

O Peru notificou um surto de raiva humana com 29 mortes em 1990, as vítimas relataram história de mordidas de morcegos e a caracterização antigênica da amostra de uma das vítimas revelou padrão idêntico ao de *Desmodus rotundus* (Lopez *et al.*, 1992). Em 1996 ocorreu outro surto com 9 mortes, e mais duas amostras humanas foram analisadas, indicando variante de *D.rotundus* (Warner *et al.*, 1999).

Na Venezuela, circulam duas variantes de *Desmodus rotundus*. O sequenciamento genético mostrou que as amostras de morcego vampiro procedentes de uma região específica da Venezuela segregam em um grupo homólogo e distinto, mas estreitamente relacionado as amostras de morcegos vampiros de outros países da América Latina (De Mattos *et al.*, 1996).

No Chile, os morcegos insetívoros (*Tadarida brasiliensis* e *Lasiurus cinereus*) são os reservatórios do vírus em centros urbanos e fonte de infecção de casos esporádicos reportados em animais domésticos. A análise de amostras isoladas entre 1977 e 1998 mostrou que nenhuma segregava com reservatórios terrestres (De Mattos *et al.*, 2000a).

No México, os cães eram a principal fonte de infecção para humanos, entretanto a mais comum fonte de infecção humana nos últimos anos está associada ao skunk (*Mephitis mephitis*) e morcegos hematófagos. Para animais de interesse econômico, a principal fonte de infecção é o skunk (44%), seguida por cães (27%), morcegos hematófagos (6%) e morcegos insetívoros (5%) (Sierra *et al.*, 2000).

2-NO BRASIL

No Brasil, no período de 1986 a 2000, ocorreram 617 casos de raiva humana, sendo 63 (10,2%) transmitidos por morcegos. Os dados do Ministério da Saúde apontam os morcegos como a segunda espécie em números de casos humanos de raiva, lugar anteriormente ocupado pelos felinos domésticos. Infelizmente esses dados não especificam o hábito alimentar do morcego envolvido na transmissão (Anexo 1).

Com relação a raiva animal, em 1999 foram notificados no Brasil 4059 casos: 2628 em bovinos, 970 cães, 325 eqüinos, 93 gatos, 37 silvestres, 3 ovinos e 3 caprinos (Anexo 2). O Brasil notificou 76,5% dos casos de raiva em herbívoros da América Latina (Organização Panamericana de Saúde,

1999).

A análise por Ito *et al.*, (2001) e Favoretto *et al.*, (2002) de amostras de vírus rábico isoladas no Brasil confirmaram como reservatórios principais os cães e morcegos vampiros, confirmando os estudos anteriores.

A variante de *Desmodus rotundus* foi detectada em 100% das amostras de bovinos, eqüinos, ovinos, suínos, caprinos e morcegos hematófagos e em 58,3% (35) de 60 amostras de morcegos não hematófagos, pertencentes a 7 das 17 espécies na quais o vírus foi isolado (Favoretto *et al.*, 2000), indicando que o morcego não hematófago está se contaminando a partir do hematófago.

Segundo Carrieri *et al.* (2000), tem se observado que a raiva em morcegos não hematófagos precede a raiva bovina e em animais de estimação. Se isso se confirmar, os morcegos não hematófagos podem ser o elo entre a raiva rural e a raiva urbana. Favoretto *et al.* (2002), demonstraram a variante de *D.rotundus* em amostras isoladas entre 1989 e 2000, em 30,8% das amostras de felinos (4), em 12,2% dos cães (12) e em 8,3% das amostras obtidas de humanos (3). O fato de se detectar a variante 3 em cães e gatos mostra que o papel deste morcego no ciclo rábico não está limitado a raiva silvestre.

3-NO ESTADO DE SAO PAULO

No Estado de São Paulo, dos 20 casos de raiva humana ocorridos de 1983 a 2001, 15 foram transmitidos por cães (75%), 2 por morcegos (11%), 1 em que a espécie transmissora ficou indefinida entre um morcego ou um cão, 1 por gato (variante de morcego hematófago) e 1 no qual a espécie agressora não foi identificada (Anexo 3).

A raiva em animais domésticos no Estado de São Paulo diminuiu sensivelmente a partir de 1996, mantendo-se baixa. No mesmo período o número de casos de raiva em morcegos, bovinos e eqüinos sofre um acentuado aumento (Anexos 4, 5 e 6).

Em 8 dos 14 casos de raiva em animais domésticos (7 cães e um gato), ocorridos no Estado de São Paulo, no período de 1998 a 2000, a tipificação antigênica identificou a variante de *D.rotundus*, mostrando segundo Carrieri *et al.* (2000) que este é o reservatório do vírus rábico no nosso meio, e com certeza o animal que mantém e manterá a raiva presente por algum tempo, caso não se adotem ações sistemáticas e contínuas de controle da população de *Desmodus rotundus*.

Enquanto no período de 1985 a 1996 ocorreram no estado 33 casos de raiva em morcegos (média de 3 por ano), no período de 1997 a 2001

ocorreram 206 casos (média de 41,2/ano) distribuídos segundo hábito alimentar em: 66 morcegos insetívoros, 50 frugívoros, 85 hematófagos e 5 não identificados (Coordenação do Programa Estadual de Controle da Raiva do Estado de São Paulo) (Anexo 7).

O sequenciamento genético de 28 amostras do período de 1989 a 1993, de diferentes espécies, identificou 26 como cepa de origem canina. Porém, duas amostras de bovinos isoladas em 1991 e 1993 foram caracterizadas como cepa de morcego *D.rotundus*. Este dado demonstra que naquela momento, já haviam duas cepas circulantes, a cepa canina predominante e a cepa de *D.rotundus*. As 26 amostras analisadas do período de 1996 a 2000, de eqüinos e bovinos, foram todas identificadas como de *Desmodus rotundus*. A cepa circulante predominante no Estado passou a ser a de *Desmodus rotundus* (Martorelli *et al.*, 2001) mostrando a alteração do perfil epidemiológico da raiva no Estado também apontada por Favoretto *et al.* (2002).

Segundo o Manual de Normas Técnicas do Estado de São Paulo (1999), os morcegos de qualquer espécie, são considerados animais de alto risco para raiva, uma vez que os conhecimentos sobre a infecção rábica nesses animais são controversos, portanto em caso de exposição (lambadura, arranhadura, mordedura ou contato), a indicação é tratamento profilático da vítima com sorovacinação ou esquema de reexposição. Essa é a orientação do CDC (2000) normalmente um número alto de pessoas recebem tratamento pós-exposição: nos últimos 4 casos de raiva humana nos Estados Unidos, 37, 71, 20 e 27 pessoas receberam tratamento.

O vírus rábico já foi isolado em 27 das 144 espécies brasileiras, 14 da família Phyllostomidae, 6 da família Molossidae e 4 da família Vespertilionidae. A maioria dessas espécies esta relacionada com atividades humanas (Uieda *et al.*, 1996).

ASPECTOS GERAIS SOBRE A BIOLOGIA DOS QUIROPTEROS

Taxonomia: A ordem Chiroptera (cheiros=mão e pteron=asa, animal com mão transformada em asas), é formada por 17 famílias, compostas por aproximadamente 1198 espécies (Nowak, 2003). Subdivide-se em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. Os megachiropteros incluem apenas uma família, os grandes morcegos frugívoros conhecidos como raposas voadoras, que podem atingir até 1,70m de envergadura. A subordem Microchiroptera inclui as 16 famílias restantes (Taddei, 1996).

Em várias línguas, os morcegos são associados a camundongos ou ratos, em espanhol murcielagos (camundongos velhos), em francês chauve-souris (camundongo careca), em alemão fledermaus (rato voador) (Esberard *et al.*, 1996), Em chines, sein-shii (camundongo celestial) e na linguagem dos

Astecas (povo que viveu onde hoje é o México), quimich-papalotl (camundongo borboleta) (Arellano-Sota, 1988). Os estudos atuais mostram que na verdade, os morcegos são filogeneticamente distantes dos roedores, e são do ponto de vista evolutivo, mais próximos dos primatas. A ordem Chiroptera pertence a superordem Archonta, juntamente com a ordem Primata (subordem Dermoptera e Euprimates) e a ordem Scandentia (McKenna e Bell, 1997).

Distribuição/Diversidade: Os megachiroptera são encontrados na Europa, África, Sudeste da Ásia, Austrália, Samoa e Ilhas Carolinas. Os microchiroptera tem distribuição quase cosmopolita. No Brasil já foram identificadas, 144 espécies de morcegos. Segundo hábito alimentar, os insetívoros representam mais de 50% das espécies, os frugívoros quase 30% e os nectarívoros 15%. Os carnívoros, hematófagos e piscívoros juntos somam menos que 5% das espécies. Nove espécies brasileiras são consideradas ameaçadas de extinção. Vinte e nove das 144 espécies brasileiras já foram registradas explorando refúgios em habitações humanas (sótãos, porões, persianas, telhados, etc.) ou em suas proximidades (Taddei, 1996; Esbérard *et al.*, 1999).

Papel ecológico: Estudos estabeleceram o papel ecológico dos morcegos insetívoros como agente controlador da população de insetos em área urbana (Gould, 1955; Greenhal, 1982).

Os morcegos que se alimentam de néctar, pólen ou frutos tem um papel importante na polinização de uma grande variedade de espécies de plantas. O valor comercial dos produtos humanos cuja semente é dispersada por morcegos é estimado em centenas de milhões de dólares anualmente. Os morcegos fitófagos (*Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* e *Carollia perspicillata*) são freqüentemente encontrados em florestas secundárias ou áreas onde a vegetação original foi derrubada e uma floresta regenerada está se formando (Wilson, 1997).

BIOLOGIA DO MORCEGO *Desmodus rotundus*

O hábito de se alimentar de sangue de vertebrados endotérmicos é conhecido apenas em três espécies de morcegos da região neotropical (América Latina), que compõem a subfamília Desmodontinae, da família Phyllostomidae. Das três espécies conhecidas, *Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*, a primeira é a mais estudada em razão da sua importância social e econômica, o que ainda não está estabelecido para as outras duas espécies (Manual de Manejo e Controle, 1996).

Nome científico: *Desmodus rotundus*;

Nome popular: Nos países latino-americanos de língua espanhola são

chamados de vampiros. A origem do termo vampiro não é definida, um nome de origem eslava referindo-se a um homem conhecido como "conde Vlad" que supostamente sugava o sangue de suas vítimas (Arellano-Sota, 1988), ou de origem húngara, significando uma pessoa que volta da morte para se alimentar do sangue dos vivos (Brass, 1994).

Distribuição: São encontrados do norte do México a costa norte do Chile, região central da Argentina e costas do Uruguai. Desde o nível do mar até 2 mil metros de altitude (Flores Crespo, 2000).

Origem: Fósseis descobertos na Flórida e em Cuba indicam que os vampiros vivem nas Américas desde o período Pleistoceno, 2,5 milhões de anos atrás (Arellano-Sota, 1988).

Peso: indivíduos adultos pesam entre 15 e 60g (Brass, 1994). Fêmeas adultas, não prenhas, pesam entre 29 e 33g em cativeiro (Wimsatt, 1969).

Comprimento: cabeça-corpo 7 a 9cm. A fêmea é um pouco maior que o macho (Brass, 1994).

Envergadura: 35 a 40cm (Brass, 1994).

Cor da pelagem: diversos tons de castanho, castanho escuro acinzentado ou avermelhado no dorso e castanho mais claro no ventre (Manual de Manejo e Controle, 1996).

Características anatômicas: crânio pequeno de forma cônica. A formula dental para o Gênero é $1/2,1/1,2/3,0/0=20$ (Arellano-Sota, 1988). Nos morcegos vampiros, o apêndice nasal em forma de folha, que constitui a característica mais importante para identificação da Família Phyllostomidae, se apresenta modificado, lembrando uma ferradura (Taddej, 1996). Não tem cauda e a membrana interfemural ou uropatágio é rudimentar (Trajano e Sobrinho, 1980).

Reprodução: qualquer época do ano.

Gestação: Cinco meses (Flores-Crespo, 2000), sete meses, produzindo apenas um filhote por parto e ano (Manual de Manejo e Controle, 1996). A atenção materna com o filhote dura aproximadamente 1 ano (Arellano-Sota, 1988).

Hábito alimentar: Durante os primeiros três meses de idade, os morcegos hematófagos se alimentam exclusivamente de leite materno, após o que, são introduzidas pequenas quantidades de sangue direto na boca. Entre os cinco e seis meses, o filhote acompanha a mãe para se alimentar, mas provavelmente amamente até os nove meses (Lord, 1992).

Sangue é o único alimento do morcego vampiro adulto. Obtido com os

dentes incisivos superiores internos que corta e retira um pedaço da pele da sua vítima. Apresenta dois sulcos longitudinais na face inferior da língua. Ao tomar sangue os bordos da língua dobram-se formando um tubo através do qual o sangue flui (Lord, 1992). A superfície superior da língua permanece livre de sangue. A língua se estende e retrai lentamente produzindo um vácuo parcial na cavidade bucal e desta maneira ajuda o fluxo de sangue na boca. O sangue, algumas vezes, flui da ferida por oito horas (Nowak, 1991).

A mordedura alimentar é superficial, tem o formato elíptico e é aparentemente indolor (Manual de Manejo e Controle, 1996). A ferida produzida tem 3-6mm de largura, 5-10mm comprimento e 1-5mm de profundidade (Nowak, 1991). A draculina, uma glicoproteína isolada da saliva do *D.rotundus*, é um anticoagulante natural, o qual inibe os fatores de coagulação IX(IXa) e X(Xa) (Fernandez *et al.*, 1998).

Longevidade: Dezenove anos em cativeiro e mais de 10 anos na natureza (Manual de Manejo e Controle, 1996). Clarck e Dunn (1932) mantiveram pela primeira vez *D.rotundus* em cativeiro com sangue desfibrinado. Podem sobreviver por longos períodos em cativeiro em aparente bom estado de saúde e de reprodução (Greenhal, 1935; Winsatt e Guerrieri, 1961; Barnard, 1995).

Adaptações evolutivas: Apresentam várias adaptações relacionadas a hematofagia, entre as quais as mais notáveis são a redução em número e tamanho dos dentes molariformes e o grande desenvolvimento dos incisivos superiores internos que têm forma triangular, ápice pontiagudo e margens cortantes, estendidas postero-lateralmente (Taddei, 1983).

Preferência alimentar: em ordem decrescente: bovinos, cavalos, cabras, veados, galinhas, ovelhas, cachorros e o homem (Goodwin e Greenhal (1961), porém praticamente qualquer animal de sangue quente, calmo e tranquilo pode ser atacado por um morcego vampiro (Nowak, 1991). Existe uma relação direta entre o temperamento do bovino e a predação do morcego hematófago (Arellano Sota *et al.*, 1971). A preferência alimentar pelos bovinos pode estar associada à maior disponibilidade desta população, à oferta mais abundante.

Consumo diário de sangue: média de 15,3ml a 15,6ml com variação de 11,6 a 21,0ml de sangue desfibrinado, em cativeiro. O *Desmodus rotundus* ingere o equivalente a mais de 50% do peso do seu corpo em sangue (Wimsatt e Guerrieri, 1962). O período de alimentação, em geral, não é maior do que 30 minutos (Nowak, 1991).

Atividade alimentar e o luar: Ao longo da noite, iniciando uma a duas horas após o pôr-do-sol e terminando por volta de uma hora antes do alvorecer. Chuvas torrenciais, ventos fortes e o luar tendem a reduzir o período de atividade. Em noites de lua cheia, os hematófagos podem deixar de se alimentar por uma noite, mas não resistem mais de duas noites sem comer

(Manual de Manejo e Controle, 1996).

O luar influencia o forrageamento do morcego hematófago. Não há atividade quando não há lua (Flores Crespo, 1976). Segundo Manske e Schmidt (1976) há uma logarítmica dependência entre intensidade de luz e a acuidade visual do morcego.

Visão: A habilidade de detectar objetos é relativamente limitada. Segundo Schmidt e Schmidt (1977), os morcegos são capazes de discernir a presença de faixas de metal colocadas a 1cm uma da outra, a distância de 50cm, mas falham quando a distância entre as faixas é de 0,5cm. Os pulsos ultrassônicos produzidos a 50cm, parecem amostrar uma área de 2,5 a 3,0cm.

Abrigos: locais mais escuros das cavernas, ocos de árvores, minas, casas, bueiros, sob pontes de estrada, etc. Todos os refúgios, apresentam média de temperatura de 21 a 28°C e umidade relativa do ar maior ou igual a 45% (Arellano-Sota, 1988).

Possuem abrigos noturnos temporários e diurnos. Os temporários são usados em noites de lua para esperar que o luar diminua e possam retornar para o abrigo diurno, ou para descansar e eliminar o excesso de peso na forma de urina e fezes (Manual de Manejo e Controle, 1996). Segundo Forment *et al.* (1971), a alta taxa de recaptura de morcegos em um mesmo abrigo, indica que os morcegos tendem a permanecer na mesma área e visitar os mesmos abrigos.

O resultado de mais de 200 observações realizadas por Arellano-Sota (1988) indicaram que os refúgios são divididos por diversas espécies de morcegos, entretanto cada espécie tem seu próprio nicho. O morcego hematófago nunca foi encontrado misturado com outra espécie de morcego. Permanece fechado em seu grupo, mantendo estreito contato com todos os indivíduos da colônia.

Urina: excreção abundante, geralmente menos que 50% do volume de sangue ingerido em 24 horas (Wimsatt e Guerrieri, 1962).

Fezes: abundantes, viscosas, em geral adesivas (Wimsatt e Guerrieri, 1961), pastosas, marrom-avermelhadas, que se tornam depois enegrecidas e semelhantes a graxa ou piche, com cheiro forte característico, misturado ao cheiro de amônia (Trajano e Sobrinho, 1980).

Importância ecológica: O guano (fezes) depositado no fundo das cavernas é usado como fertilizante (Nowak, 1991). O guano também é a base da cadeia alimentar em ambiente cavernícola (detritívora), permitindo a sobrevivência de grande número de espécies parasitas, que por sua vez servem de alimento para animais de outros níveis da cadeia (Aguiar e Taddei, 1996).

Locomoção: Difere dos outros morcegos pelo modo de se apoiar nas paredes

dos abrigos e se locomover. Os outros morcegos, geralmente, ficam pendurados unicamente pelos pés e voam quando perturbados. Já o hematófago se apoia nos pés e polegares (dedo que sai do canto da asa) e, quando perturbado pode locomover-se rapidamente, andando como uma grande aranha ou aos saltos como um sapo e sempre com o olhar voltado para quem os está perturbando (Trajano e Sobrinho, 1980).

Vôo: Geralmente são feitos a uma altura de 0,5 a 1,5m, uma vez que suas presas são mamíferos que repousam no chão (Manual de Manejo de Morcegos, 1996).

Agrupamento: colônias de 10 a 50 indivíduos são mais comuns, porém não são raras as de mais de cem (Manual de Manejo e Controle, 1996).

Higiene: Os hematófagos usam sua língua e pés para limpar seu corpo. Durante um período de observação de 6 horas, os morcegos gastaram 34 minutos limpando a si mesmos e aos outros e tiveram uma média de 260 contatos da língua com o corpo (Flores Crespo *et al.*, 1972).

Área de ação: Um a cinco quilômetros variando de uma região para outra dependendo do clima, relevo, disponibilidade de abrigo e fonte de alimento (Manual de Manejo e Controle, 2000). Não mais distantes que 5 a 8 Km do seu abrigo (Wilson, 1997). Dez a vinte quilômetros para Flores Crespo (2000).

Interações sociais: Bastante complexa, baseada na formação de um harém, no qual um macho dominante (alfa) toma conta de um grupo de fêmeas (cerca de 12) e seus filhotes pequenos. Os filhotes machos a medida que se tornem adultos, são expulsos do grupo pelo macho dominante. Os machos solteiros formam pequenos grupamentos que podem permanecer perto do harém à espera de oportunidade de ocupar o lugar do macho dominante ou podem sair e ir procurar outros locais para constituir seu próprio harém. As interações entre machos são quase sempre ritualizadas e intimidatórias, dificilmente envolvem confronto direto (Manual de Manejo e Controle, 1996).

As fêmeas são fiéis ao grupo e não ao macho dominante. Se o abrigo se torna impróprio ou há falta de alimento na área, as fêmeas mudam para outro lugar, sem se importar com o varão do harém. A colaboração entre elas envolve a divisão de alimento. As fêmeas que não obtiveram sucesso quando saíram para se alimentar podem receber o alimento regurgitado das outras fêmeas que se alimentaram, de modo semelhante ao que acontece entre fêmeas e filhotes. A fêmea que necessita de sangue, lambe o abdome e os lábios da outra. Esse comportamento, inicialmente interpretado como higiene, é atualmente reconhecido como importante para manter a integridade do grupo. Os machos raramente participam desse ritual (Manual de Manejo e Controle, 1996).

IMPORTÂNCIA SOCIAL

No período pré colombiano, as fontes de alimentos dos morcegos hematófagos eram os animais silvestres de sangue quente e o homem aborígene. A população de morcegos era, provavelmente, menor que a atual, contudo a colonização do continente americano pelos europeus, junto com seus animais domésticos, parece ter provocado um aumento populacional desses morcegos, favorecendo também sua expansão territorial (Manual de Manejo e Controle, 1996).

Quando os primeiros colonizadores espanhóis chegaram a América, relataram mordidas de morcegos aos soldados e aos animais da tropa (Molina Sales e Fernandes de Oviedo *apud* Baer, 1975) .

Os animais domésticos, sem adaptação contra esses predadores tornaram-se presas fáceis, representando uma fonte alimentar abundante e acessível. Em algumas regiões, o vampiro comum parece estar se alimentando, exclusivamente, de sangue de animais domésticos. O *Desmodus rotundus*, uma espécie de comportamento versátil, foi a mais favorecida pela introdução dos animais domésticos nas Américas (Manual de Manejo e Controle, 1996).

O aumento do número de morcegos hematófagos em uma determinada área parece estar relacionado ao processo de ocupação geográfica de espaços antes preservados, com implantação de atividades que geram desequilíbrio ecológico como por exemplo monocultura, áreas de exploração mineral (garimpagem), desmatamento de grandes áreas para pecuária etc., (Manual de Manejo e Controle, 1996).

Segundo de Mattos *et al.* (2000c), o reservatório de vírus rábico representado pelo *D.rotundus* tem aumentado em densidade populacional e sua distribuição geográfica tem sido altamente modificada durante as duas últimas décadas, como conseqüência de drásticas mudanças no ambiente.

Os relatos sobre as agressões humanas por morcegos *D.rotundus* estão concentrados nas regiões mais pobres do mundo. Há relatos de agressões à humanos em praticamente, todos os países da América Latina. Quase sempre esses surtos de mordidas à humanos são associados a modificações ambientais introduzidas pelo homem no habitat dos morcegos, como conseqüência os morcegos podem passar a viver em área peridomiciliar (McCarthy, 1989; Batista da Costa *et al.*, 1993; Caraballo, 1996).

Com maior freqüência as agressões ocorrem nos animais domésticos (cabras, porcos, cães, galinhas, vacas e cavalos). O homem parece ser apenas uma fonte secundária de alimento. A situação de equilíbrio entre a

população de hematófagos e as populações que servem de fonte de alimento se mantêm por muitos anos. Os relatos de agressões humanas por morcegos hematófagos começam a ocorrer quando há um desequilíbrio neste "tripé" interativo (Manual de Manejo e Controle, 1996). Segundo McCarthy (1989) os morcegos são seletivos, quando diferentes fontes de alimento são disponíveis.

Dessa forma, a eliminação repentina de uma população animal como ocorreu em povoados de Belize, onde a população suína foi drasticamente diminuída pela peste, ocasionou o aumento das agressões em humanos por morcegos que perderam sua fonte primária de alimentos, 22% das famílias relataram ataques de morcegos. A introdução posterior de bovinos nos povoados levou a diminuição dessas agressões (McCarthy, 1989).

No Peru, um programa de reprodução de porcos introduziu rapidamente essa população. Pouco tempo depois, os porcos se tornaram um problema para a plantação e foram rapidamente eliminados. O número de ataques de morcegos *D.rotundus* à população humana aumentou e ocorreu uma epidemia de raiva humana com 29 mortes. Segundo o autor, o aumento e decréscimo repentino da população suína, fonte de alimento dos morcegos, pode ser um dos fatores da epizootia (Lopez *et al.*, 1992). Em 1996 ocorreu outro surto de raiva humana com 9 mortes em povoado da Amazônia Peruana (Warner, 1999).

Em uma área de garimpo de Apiacás, Mato Grosso, sete pessoas morreram, aparentemente de raiva transmitida por morcegos hematófagos. Durante a investigação epidemiológica centenas de garimpeiros mencionaram que já haviam sido sangrados por morcegos (Manual de Manejo e Controle, 1996). Fato semelhante ocorreu em povoado Venezuelano, em área de mineração. Um surto com 154 mordidas de morcegos a humanos em um período de 4 meses. Não foram relatadas mortes (Caraballo, 1996). Em área de garimpo da cidade de Godofredo Viana, Maranhão, 53 das 129 pessoas entrevistadas haviam sido sangradas por morcegos (Schneider *et al.*, 2001).

Na Venezuela, De Mattos *et al.* (1996), relacionou a existência de duas variantes de vírus rábico circulando em morcegos vampiro naquele país, à mudanças no ambiente (agricultura, extração de minérios, introdução de pecuária e indústria petrolífera), levando a redução e eventualmente a eliminação de espécies animais e plantas de extensivas áreas de sua distribuição original.

Dos fatos relatados na literatura, além das mudanças ambientais introduzidas pelo homem, poderíamos relacionar a morte dessas pessoas e os surtos de mordidas com as precárias condições de habitação que fornecem limitada proteção contra ataques de morcegos e a falta de informação e acesso ao tratamento anti-rábico pós-exposição, uma vez que se tratam de povoados fechados, isolados e com restrita assistência médica.

Campanhas educativas poderiam contribuir para evitar a morte de humanos. A desmistificação do morcego hematófago, esclarecendo lendas e crenças infundadas; ressaltando sua importância na cadeia detritívora em cavernas e a importância ecológica dos outros morcegos como dispersores de sementes, polinizadores e controladores da população de insetos noturnos.

A orientação ao público de não capturar morcegos e não manusear animais encontrados doentes ou mortos e comunicar as autoridades competentes quando eles são encontrados em situações fora do comportamento típico da espécie (horário diurno, incapacidade para voar, etc.) poderia contribuir para evitar acidentes, uma vez que os dados mostram que a maior parte dos casos de raiva humana ocorre por contato ocasional e manipulação indevida de morcegos moribundos (Manual de Manejo e Controle, 1996).

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Todos os estudos concordam que o impacto econômico da raiva transmitida por morcegos hematófagos na pecuária da América Latina é significativo, entretanto esse valor é difícil de ser dimensionado principalmente em função da subnotificação de casos na região. Segundo Acha (1967), ocorre grande disparidade entre os números relatados e o número real estimado, sendo que os números notificados representariam 3% a 60% das mortes estimadas.

As estimativas vão de cem mil a um milhão de cabeças de gado perdidas anualmente e o custo econômico seria de 30 a 50 milhões de dólares anualmente (Malaga-Alba, 1962; Linhart *et al.*, 1972; Acha e Arambuco, 1985).

Para a Argentina, considerando a média do período de 1984 a 1999, Delpietro (2000) calculou a perda em U\$ 10 milhões ao ano. Os itens avaliados foram a mortalidade e a vacinação bovina, os tratamentos anti-rábico humanos e as medidas de controle da população de morcegos. Não foram considerados os dias de trabalho perdido, o dano ao gado com a perda de sangue, a mortalidade de outros herbívoros, etc.

No Brasil, um dos países mais atingido, com perdas econômicas relevantes com a raiva dos herbívoros, a subnotificação de casos é significativa em algumas regiões. Considera-se que para cada caso de raiva notificado, outros dez não são. A subnotificação de casos é gerada pela falta de conscientização da importância da notificação e ausência de vigilância adequada (Manual de Manejo e Controle, 1996).

Considerando os casos clínicos e laboratoriais de raiva em animais

herbívoros domésticos notificados ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, ocorridos entre 1983 e 1993, e a taxa de subnotificação, estima-se que, no Brasil, morram anualmente 40.000 bovinos, o que representa um prejuízo de aproximadamente US\$ 15 milhões de dólares anuais (Manual de Manejo e Controle, 1996).

MÉTODOS DE CONTROLE DA POPULAÇÃO DE MORCEGOS

O conhecimento do ciclo rábico envolvendo o morcego *Desmodus rotundus*, os animais herbívoros e o homem, levou a necessidade de estabelecer estratégias para a prevenção da raiva em herbívoros. Uma das estratégias foi o desenvolvimento de métodos de controle da população de morcegos hematófagos.

Inicialmente esses métodos visavam apenas a eliminação do morcego, sem preocupação com o equilíbrio ecológico, o meio ambiente, as outras espécies de morcegos e animais silvestres que dividiam o mesmo abrigo. Nesse sentido foram usados: fogo, fumaça, dinamite, gases tóxicos como o DDD, Phostoxin, Rhodiatox, gás cianídrico e Malathion, substâncias químicas como arsênico e sulfato de estriquinina e diferentes tipos de armadilhas como redes de eletrocução, malhas de arame, fios esticados etc. (Constantine, 1958; Villa-Ramirez, 1969; Mitchell *et al.*, 1973; Greenhall, 1971 e 1974; Fornes *et al.*, 1974; Anda Lopez *et al.*, 1975).

Greenhall (1971) sugeriu medidas de controle de difícil aplicação como a utilização de predadores naturais dos morcegos (corujas e serpentes) ou a manipulação do habitat desses animais quanto a umidade relativa do ar e temperatura de modo a tornar o abrigo inadequado ou a introdução de agentes patogênicos ou endoparasitas nas colônias de morcegos hematófagos.

Também foram e continuam sendo usados meios físicos que funcionem como barreiras de proteção entre os animais e os morcegos. Esses métodos não matam os morcegos apenas restringem seu acesso a fontes de alimento e ou abrigos. São eles:

LUZ - Se fundamenta na observação de que o *D. rotundus* seria uma espécie com forte aversão à luz (lucífuga), evitando áreas iluminadas. Embora este método seja de fácil realização, podendo ser utilizada qualquer fonte de luz, apresenta custo considerável e é restrito a pequenos rebanhos; além disso alguns morcegos podem habituar-se a presença de luz e modificar sua estratégia de ataque (Manual de Manejo e Controle, 1996).

BARREIRA MECÂNICA - Telas de arame com malhas finas ou outros. Este método é eficiente, mas se restringe a pequenos rebanhos e o custo pode ser alto (Manual de Manejo e Controle, 1996).

Métodos seletivos

São chamados de seletivos porque eliminam apenas os morcegos hematófagos que se alimentam nos animais domésticos. Como diferentes espécies co-ocorrem em um mesmo abrigo, evita-se a eliminação de outras espécies de morcegos.

Greenhall (1965) observou que os morcegos dedicavam de 2 a 3 horas diárias ao asseio e durante esta operação raspavam o corpo com uma das extremidades posteriores e a introduziam na boca a cada 5 a 10 segundos; limpavam as membranas das asas e os dedos com a língua; usavam sempre os mesmos nichos dentro de seus refúgios por prolongados períodos de tempo e se colocavam muito próximos um dos outros com intenso contato corporal.

Com base nessas características comportamentais, Linhart *et al.* (1972) apresentaram o primeiro estudo de controle da população de morcegos vampiros por meio da aplicação tópica de uma substância tóxica de ação lenta (anticoagulante) no dorso de alguns morcegos de uma colônia que seriam posteriormente libertados e ao voltarem aos abrigos transferiam a substância, por contato, a outros que compartilhem o mesmo abrigo.

Com exceção do estudo de Flores-Crespo *et al.* (1974) no qual o anticoagulante era aplicado na parede dos refúgios, os estudos sempre se baseavam no comportamento dos morcegos.

O hábito de utilizar a mesma presa por mais de uma noite seguida levou ao desenvolvimento do anticoagulante aplicado via intrarruminal (Thompson *et al.*, 1972) ou via intramuscular (Flores-Crespo *et al.*, 1977).

VIA INTRARRUMINAL - Os morcegos ingerem o veneno ao consumir o sangue do gado. Este método consiste na aplicação intrarruminal em bovinos da DIFENADIONA {2-(difenilacetil)-1,3-indadiona}. Uma vez aplicado, o produto mantinha nível sérico por 72 horas, suficiente para eliminar morcegos hematófagos, que porventura viessem a sugar o animal tratado.

Este método não se encontra disponível no Brasil. Quando adequadamente utilizado, apresenta alta eficiência e não traz riscos ao meio ambiente ou ao homem, porém apresenta desvantagens: dificuldade de aplicação, restrito a bovinos, pouca aplicabilidade em rebanhos extensivos, o tratamento não pode ser repetido antes de 30 dias da última aplicação e nos 30 dias que antecedem o abate, necessidade de treinamento específico e custo elevado (Manual de Manejo e controle, 1996).

VIA INTRAMUSCULAR - Consiste na aplicação intramuscular, em bovinos recém-sugados por morcegos hematófagos, da Warfarina sódica {3-(alfa-fenilo-beta-acetilo-etilo)-hidroxicumarina}. Não se encontra disponível no Brasil.

O anticoagulante intramuscular não causa danos ao meio ambiente e se usado corretamente, apresenta baixo risco à saúde humana, tem alta eficiência e menor custo que o anticoagulante intrarruminal, porém seu uso também é restrito a bovinos; tem pouca aplicabilidade em rebanhos extensivos, o tratamento não pode ser repetido antes de 90 dias da última aplicação e nos 30 dias que antecedem o abate e não deve ser utilizado em animais com menos de três meses de idade (Manual de Manejo e controle, 1996).

O hábito de retornar ao mesmo animal, utilizar o mesmo ferimento e retirar "a casca" da ferida para se alimentar por mais de uma noite seguida tornou possível o desenvolvimento de um anticoagulante de uso tópico.

EM MORDEDURAS - Consiste na aplicação de warfarina a 2%, veiculada em vaselina sólida, sobre as feridas recentes causadas pelos morcegos hematófagos em animais de criação.

É o único método seletivo disponível no Brasil. Tem como vantagens, a não contaminação do meio ambiente e o baixo risco a saúde humana. Apresenta boa eficiência, facilidade na aplicação do produto; não requer treinamento específico e tem baixo custo em relação aos anteriores. Porém tem pouca aplicabilidade em rebanhos extensivos pela dificuldade de observação dos animais sugados (Manual de Manejo e controle, 1996).

EM MORCEGOS - Consiste na captura de *Desmodus rotundus* e seu pincelamento com anticoagulante à base de warfarina, veiculada em vaselina sólida.

Embora seja um método eficiente e que apresenta resposta rápida, a técnica de pincelamento da pasta vampiricida deve ser realizada com critério. O excesso de pasta, pode prejudicar o vôo, matando mais rapidamente o morcego tratado e reduzindo o contato com outros membros da sua colônia. O desperdício de pasta, com o tratamento de número excessivo de morcegos de uma mesma colônia, despejando quantidade maior que a necessária de pasta no meio ambiente deve ser evitada. Apresenta alto risco à saúde humana, necessidade de treinamento específico e alto custo (Manual de Manejo e controle, 1996).

Linhart *et al.* (1972), demonstraram usando clorofacinona (1,3-indadiona, 2[p-clorafanfenil) fenilacetil]), em vaselina sob a forma de pasta, que um morcego tratado com anticoagulante resultava na morte de 19, em um total de 20, em cativeiro. No campo morreram 15 a 22 morcegos para cada um tratado, portanto 10% dos morcegos tratados se mostrou suficiente para reduzir em mais de 95% o número de morcegos apreendidos e as mordidas nos bovinos ao fim de apenas duas semanas após o tratamento.

Piccinini e Aquino (1979) pesquisaram a eficiência da difenadiona em

Dyphylla ecaudata. Quatro morcegos de uma colônia de 60 foram tratados. Treze dias depois observaram uma redução de 93,3% da população do refúgio. Em 1977, Piccinini *et al.*, (1977) usaram difenadiona em 11 morcegos *D.rotundus*, de uma colônia de aproximadamente 440 hematófagos, obtendo uma redução de 100% na população após 15 dias e 80% em três anos.

Flores-Crespo *et al.* (1976), propuseram o uso de warfarina alternativamente a difenadiona, em razão do menor custo e toxidez. Trataram um em vinte espécimes com 20mg de warfarina em 2ml de pasta nas regiões dorsal e ventral. Cinco dias após, todos os 20 morcegos haviam morrido. No campo, foram tratados 20 em 250 espécimes. Oito dias após, restavam vivos apenas 6 morcegos, mas já com sintomas de envenenamento. A redução no número de mordeduras foi de 96,4%.

O CONTROLE DA POPULAÇÃO DE *D.rotundus* NO BRASIL

Segundo o Manual de Controle e Manejo de morcegos (1996), do Ministério da Saúde, em uma colônia de 100 indivíduos não há necessidade de tratar mais do que 10 morcegos (10%), uma vez que cada morcego tratado deve eliminar outros 20 em média. Porém, no Estado de São Paulo, o Manual de Controle da Raiva em Herbívoros (1998), recomenda o tratamento de 20% da população estimada de *D.rotundus*, repetindo-se a captura até que se consigam os 20%.

Nos anos de 2000 e 2001, segundo os Escritórios de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, 743 capturas em abrigos de *D.rotundus* foram realizadas e 10.036 *D.rotundus* foram capturados, receberam pasta anticoagulante ou foram encaminhados para diagnóstico de raiva (Anexo 8). Se considerarmos a proporção de 1:20 (um animal tratado com anticoagulante resultando em 20 animais mortos), 200.720 animais teriam morrido. No mesmo período, apenas 481 animais (bovinos, eqüinos, suínos, caprinos e ovinos) receberam pasta anticoagulante no local da mordedura como forma de, no retorno do morcego ao mesmo animal, contribuir no controle da população de hematófagos.

Considerando que o rebanho deve ser inspecionado periodicamente para vacinações e outros procedimentos, certamente aplicar a pasta anticoagulante nas feridas do rebanho é uma atividade muito mais fácil de ser executada do que localizar abrigos e capturar morcegos hematófagos.

Outra questão é que a densidade populacional de *D.rotundus* é desconhecida, nem sequer estimada, o que seria essencial para executar atividades de controle e intervir em uma população, minimizando conseqüências ecológicas.

Apesar do número de animais capturados, enviados para diagnóstico e

da estratégia do controle químico da população de morcegos *D.rotundus*, estar sendo usada há pelo menos duas décadas no Brasil, a raiva em herbívoros permanece endêmica e epidêmica.

Analisando essa situação fica claro a necessidade de pesquisas buscando novas alternativas de controle da população de *Desmodus rotundus* e a necessidade de outras estratégias de controle da raiva em herbívoros, que em associação as estratégias já usadas possam melhorar o controle da doença.

Em um primeiro momento, o controle da raiva silvestre nos Estados Unidos, Canadá e em vários países da Europa, consistia na redução da população desses animais através da captura e morte, porém essas medidas não se mostraram efetivas no controle da doença (Baer, 1975) oferecendo apenas uma solução temporária (Parker, 1958 *apud* Baer, 1971), além de ser um método caro e não cobrir uma área suficientemente grande (Linhart, 1960 *apud* Baer, 1971, Lewis, 1968) .

O Estado da Virgínia (E.U.A.), no final da década de 50, vivia uma epidemia de raiva, sendo as raposas os principais reservatórios do vírus. Um programa de captura sistemática, nas áreas com número excessivo de silvestres foi iniciado em 1961, se estendendo por 22 meses. Ao seu final, 12.256 animais haviam sido capturados, metade deles eram raposas. A incidência da raiva diminuiu drasticamente e o método foi considerado efetivo. (Marx e Swink, 1963). Porém, em 1969 o programa foi reavaliado e considerado ineficaz uma vez que a doença permanecia endêmica e epidêmica em muitas áreas (Carey *et al.*, 1978).

Em 1952 em Alberta no Canadá, um programa de controle populacional, especialmente de raposas e lobos, treinou fazendeiros para distribuírem cápsulas de cianeto de potássio ou sódio (75.000) e cubos de estriquinina (429.000). Após 18 meses, a estimativa era de que 50.000 raposas, 35.000 coiotes, 7.500 lincos, 4.200 lobos, 1850 ursos e 500 cangambás haviam morrido. Com esse programa associado às medidas de controle da raiva canina (quarentena, vacinação, captura de cães errantes e educação coletiva) acreditava-se ter erradicado a raiva do sudoeste de Alberta em uma área de mais de 400 milhas (Ballantyne e O,Donoghue, 1954). Entretanto, Alberta permaneceu como área endêmica de raiva em animais silvestres (Schowalter, 1980; Prins e Yates, 1986; Rosatte e Gunson, 1984).

Entre 1964 e 65 ocorreu uma epizootia de raiva no Tennessee (E.U.A.), sendo as raposas consideradas responsáveis por grande número de casos, especialmente em rebanhos. Foi iniciado um programa de redução da população de silvestres através do uso de iscas de carne com estriquinina. Neste programa, 60.593 iscas foram distribuídas por equipes treinadas em 4.111 milhas quadradas, resultando na morte de 2.141 raposas, porém cães, gatos e pássaros também foram atingidos; iscas foram removidas por

peças que queriam proteger seus animais domésticos e de criação ou que eram contrárias ao envenenamento dos animais (Lewis, 1968).

Essas medidas apresentam outros inconvenientes como o perigo do uso inadequado dessas substâncias para os aplicadores e para o meio ambiente podendo resultar na contaminação do solo e da água e principalmente o perigo para outras espécies silvestres não envolvidas no ciclo rábico que coabitam o mesmo nicho. Além disso, a eliminação de predadores de topo da cadeia ecológica representado pelos carnívoros, pode gerar uma superpopulação dos animais que ocupam os níveis inferiores da cadeia ecológica.

Só mesmo o desenvolvimento de uma vacina para ser usada com vetores e reservatórios silvestres terrestres e programas efetivos de vacinação, conseguiram eliminar a raiva de grandes áreas nesses países. Da mesma forma, no passado, somente o desenvolvimento de uma vacina e programas efetivos de vacinação, eliminou ou reduziu drasticamente a raiva em animais domésticos.

Finalmente, a raiva em herbívoros não existiria, se os pecuaristas mantivessem seus rebanhos vacinados. Segundo os Escritórios de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, 3.200.000 bovinos foram vacinados, em 2000 e 2001, número insignificante considerando que só a população bovina no Estado segundo o censo agropecuário 1995-96, do IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística é de 12.306.790 (Anexo 8).

A VACINA RECOMBINANTE DE GLICOPROTEÍNA (V-RG)

Desde 1978, diversos países europeus tem realizado vacinação de animais silvestres usando cepa de vírus rábico atenuado SAD (Street Alabama Dufferin), via oral, introduzida em iscas, com sucesso para vacinar raposas, porém esta vacina tem falhado com skunks e raccoons. O uso de vírus atenuado ou inativado permanece controverso porque freqüentemente é instável e retém patogenicidade para roedores podendo reverter a virulência. Além disso, o vírus rábico inativado é ineficaz quando administrado oralmente e a via oral é a única via apropriada para vacinação, em larga escala, de animais silvestres (Blancou *et al.*, 1986; Brochier *et al.*, 1990).

As outras vias de imunização testadas, intramuscular, intradérmica, intraduodenal, subcutânea etc., não induziram níveis de AcN comparativamente tão altos quanto a via oral e a porcentagem de animais que sobrevivem ao desafio é menor (Rupprecht e Kieny 1988; Tolson *et al.*, 1988; Blancou *et al.*, 1986).

Por esses fatos, uma vacina anti-rábica recombinante para uso em

animais silvestres começou a ser desenvolvida e testada em 1983. Dado a um prévio histórico como um eficiente recombinante e sistema clonal, o vírus vaccinia (vírus usado para vacinação contra a varíola) um poxviridae, tem sido usado para expressar genes estranhos. Com este método foram gerados vírus vaccinia recombinantes produtores de antígeno de superfície da hepatite B, proteínas do vírus da herpes simples, hemaglutinina e neuramidase do vírus influenza, proteína circum-esporozoíta da malária e muitos outros agentes microbianos (Ruprecht e Kieny 1988).

O vírus vaccinia, cepa Copenhagem, foi usado para expressar uma seqüência da glicoproteína do vírus rábico fixo cepa ERA, com o nome de V-RG (Vaccinia-Rabies Glycoprotein). A glicoproteína foi escolhida porque é a única das 5 proteínas virais (N; NS; M; G e L), que atravessa o envelope lipídico e também é capaz de estimular a produção de AcN, conferindo proteção contra a raiva (Kieny *et al.*, 1984).

A vacina V-RG, inserida em vários tipos de iscas (cabeças de galinha, carne de cavalo ou de peixe, ração para cães etc.), tem sido indicada como opção para imunizar animais silvestres por apresentar produção econômica, fácil crescimento, alto título, estabilidade sob condições de campo e ausência de reações adversas em estudos laboratoriais (Tolson *et al.*, 1988).

A ausência de mortalidade, especialmente em roedores, é uma vantagem da vacina V-RG quando comparada a vacina SAD. Testada em diferentes espécies: camundongos, coelhos, furões, gado, gatos, cães, porcos, carneiros, raccoons (*Procyon lotor*), raposas, skunks (*Mephitis mephitis*), camundongos silvestres, porcos do mato, texugos, falcões, corvos, etc., nenhum dos animais apresentou lesões de infecção por poxvirus, na mucosa oral ou na pele dos mamíferos ou perda de penas nas aves. (Brochier *et al.*, 1989)

A inocuidade da vacina em espécies silvestres não alvo para raiva foi analisada em razão do oportunismo alimentar dessas espécies que concorrem pela isca-vacina. A ausência de patogenicidade foi observada durante 1, 6, 12 e 18 meses após vacinação, qualquer que fosse a dose inoculada ($10^{2,0}$ - $10^{10,0}$) ou via de inoculação (Brochier *et al.*, 1990). Recentemente a inocuidade oral da vacina V-RG foi demonstrada em camundongos imunodeficientes (Hanlon *et al.*, 1997).

A duração da imunidade conferida pela vacina V-RG de no mínimo 12 meses em filhotes e 18 meses em adultos corresponde a duração de proteção necessária para vacinação de raposas no campo (Brochier *et al.*, 1990).

A estabilidade da vacina V-RG, inserida em iscas, em relação a variações climáticas foi analisada recolhendo-se iscas 4, 8, 15 e 29 dias após sua distribuição. O título inicial de $10^{8,0}$ DL₅₀ICC foi mantido quando a temperatura no período variou de -8 a 20°C (Brochier *et al.*, 1990).

Antes da vacina ser usada no campo, inserida em iscas, foi testada via oral administrada na boca em animais de laboratório (Wiktor *et al.*, 1984 e 1985) e posteriormente em raposas, raccoons e skunks. Os animais vacinados, desenvolviam altos níveis de AcN e sobreviviam ao desafio com cepa homóloga (Desmettre *et al.*, 1990; Brochier *et al.*, 1988; Rupprecht *et al.*, 1986).

Também foram feitos testes controlados no campo de 1987 a 1989, em pequena escala, na Bélgica, França e Estados Unidos com esses animais que receberam a vacina através de iscas (Rupprecht e Kieny, 1988; Rupprecht *et al.*, 1993).

Atualmente a vacina V-RG está em uso em vários países da Europa como Suíça, Alemanha, Bélgica, França, etc., Canadá e E.U.A. Milhares de iscas de vacina foram distribuídas na última década e os programas de oral vacinação de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) raccoons (*Procyon lotor*) e coiotes (*Canis latrans*) tem sido sucesso em eliminar a raiva em grandes áreas nesses países, sempre associada as outras medidas de controle já preconizadas (Pastoret *et al.*, 1988; Brochier *et al.*, 1991; Hanlon *et al.*, 1998; Fearneyhough *et al.*, 1998; Macinnes *et al.*, 2001).

Só nos Estados Unidos, mais de 22 milhões de doses de vacina (iscas) foram distribuídas no período de 1990 a 2000, principalmente no controle da raiva em raccoons nos Estados do Leste e para raposas e coiotes no Texas. O contato humano com a vacina e o aparecimento de efeitos adversos são raros. Cento e sessenta relatos de contato humano com a vacina foram registrados e em apenas um houve infecção devido ao vírus vaccinia. A pessoa, que apresentava quadro de hiperqueratose epidermolica, foi ferida quando tentava retirar a isca-vacina da boca do cachorro da casa (Rupprecht *et al.*, 2001).

Hipótese
Justificativa
Objetivos

HIPÓTESE DE TRABALHO

É possível imunizar indiretamente morcegos *Desmodus rotundus*, com vacina anti-rábica V-RG, administrada através de pasta neutra no dorso de um animal devolvido ao grupo, considerando o comportamento de higiene e intenso contato corporal dos animais.

JUSTIFICATIVA

Considerando:

- o número de casos de raiva humana transmitida por morcegos no Brasil e no mundo;
- o número de casos de raiva em morcegos no Brasil e no mundo;
- o número de casos de raiva em herbívoros, transmitida por morcegos hematófagos;
- a importância ecológica e a preservação das espécies de morcegos;
- o número de morcegos hematófagos eliminados pelas técnicas de controle atualmente utilizadas;
- a necessidade de disponibilizar uma estratégia alternativa de controle da raiva e
- a proximidade observada entre as populações de morcegos e a habitação humana em função da degradação dos habitats naturais dos morcegos.

OBJETIVOS

GERAL

Testar a eficácia da vacinação com vacina recombinante de vírus vaccinia expressando glicoproteína rábica (V-RG), veiculada em pasta neutra, em morcegos *Desmodus rotundus*, mantidos em cativeiro;

ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um modelo de gaiola considerando normas de biosegurança, qualidade de observação e de vida para os *D.rotundus* em cativeiro.
2. Avaliar a suscetibilidade do morcego *D.rotundus* à infecção experimental com vírus rábico isolado de morcego hematófago naturalmente infectado.
3. Comprovar a imunogenicidade da vacina V-RG através do desafio dos morcegos vacinados utilizando variante de vírus rábico isolada de morcego *D.rotundus*.
4. Demonstrar a via oral de administração da vacina V-RG, como imunogênica em morcegos *D.rotundus*.
5. Avaliar a resposta imune humoral em morcegos *D.rotundus*, vacinados com vacina V-RG e desafiados com variante de vírus rábico homóloga, através da dosagem de anticorpos anti-rábicos neutralizantes.

6. Testar a pasta como veículo de transmissão da vacina quando aplicada no dorso de um animal devolvido ao grupo, através da adição de um corante a pasta.
7. Observar a inocuidade e segurança da vacina V-RG administrada via oral em morcegos *D.rotundus*.
8. Determinar o número de animais que entram em contato com a vacina, a partir de um ou dois animais que recebam a pasta com vacina e corante.
9. Testar se o comportamento de higiene e intenso contato corporal praticado pelos morcegos leva a absorção da pasta com vacina e corante.

Materiais e métodos

1. CATIVEIRO

TRATAMENTO PROFILÁTICO

Todos os profissionais que manipularam os animais ou amostras, receberam tratamento anti-rábico pré-exposição e tiveram seu soro analisado para AcN a cada seis meses e quando necessário foi administrado reforço vacinal, conforme recomendação da OMS - Organização Mundial da Saúde, 1992 e do Manual de Normas Técnicas do Estado de São Paulo, 1999.

CAPTURA

Foram realizadas onze capturas com sucesso e cento e oitenta e cinco espécimes de morcegos *Desmodus rotundus* foram capturados. As capturas foram feitas com rede de espera de 7mx3m, malha de 2cm, tipo "mist nets", em náilon, ou puçás de rede de náilon. As capturas ocorreram no Estado de São Paulo, nas cidade de Cabreúva, Salto de Itú e Salto do Pirapora e no Sul do Estado de Minas Gerais, nas cidades de Paraisópolis e Sapucaí Mirim (Fotos 1, 2, 3 e 4). As capturas foram realizadas com licença do IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (Anexo 9). Durante o transporte do local de captura para o laboratório, os sacos de coleta podiam ser borrifados com água, se a temperatura estivesse muito alta e a distância fosse grande.

GAIOLAS

Cilíndricas, com 40cm de diâmetro e 50cm de altura, em policarbonato, com tampa de alumínio dupla na parte superior, entre as quais é instalado o filtro da saída de exaustão. A gaiola possui duas telas de alumínio internas em malha de 0,5cm, uma na parte superior e uma parte inferior. A superior, com abertura na tampa para retirada dos animais, permitia o acomodamento dos animais de acordo com seu comportamento. Sob a tela de alumínio inferior era colocado um papel de filtro, para absorver parte das fezes, urina e resto de sangue. Esse papel era trocado diariamente (Foto 5).

A insuflação e exaustão de ar era feita no interior da gaiola através de filtros. A insuflação de ar na gaiola e a saída de ar para o ambiente externo era feito através de filtro HEPA, o filtro da saída de exaustão da gaiola tinha capacidade de 97% de retenção de partículas de 3 a 7 μ m (ALA 100), utilizado com o objetivo de aumentar a vida útil do filtro principal HEPA (Foto 6).

Para os procedimentos técnicos e limpeza e lavagem das gaiolas, os animais eram retirados com pinça anatômica de 18cm ou luva de raspa de couro de cano longo e transferidos para a gaiola limpa. A limpeza da gaiola

era semanal ou quinzenal, realizada preferencialmente no dia do procedimento técnico, evitando manipulação excessiva dos animais. A lavagem das gaiolas era feita com água, sabão e esponja. As telas inferiores ficavam submersas no hipoclorito de sódio 1% por 20 a 30 minutos para dissolver as fezes dos animais, e depois em água corrente.

ALIMENTO

Os morcegos foram alimentados diariamente, através de bebedouros, (Fotos 7 e 8) com 20ml a 30ml de sangue fresco de suíno, desfibrinado com pérolas de vidro e pedras de quartzo. Uma vez por semana o sangue era enriquecido com polivitamínico, poliminerais e poliaminoácidos (Elizabeth Loza Rubio-comunicação pessoal) na proporção 1ml por litro de sangue (Clusivol® composto-laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda, lote 17248).

O sangue foi fornecido semanalmente pelo Frigorífico Itapecerica S/A (FISA). O sangue fresco desfibrinado, distribuído em alíquotas, era mantido em geladeira por uma semana, após o que era desprezado. O bebedouro com o alimento era aquecido a 30/35°C em banho Maria. A sobra de alimento no bebedouro era descartada no dia seguinte. Também foi utilizado sangue congelado, descongelado no dia do uso (Fotos 9 e 10).

Os bebedouros plásticos eram submersos em hipoclorito de sódio 1% por algumas horas, depois lavados em água corrente para retirar completamente o hipoclorito. Os bebedouros de vidro e os tampões eram autoclavados a 121°C e secos em estufa.

Água, em bebedouro, foi oferecida aos animais nos primeiros dias após captura.

PESAGEM

A massa corpórea dos animais foi aferida em dinamômetro de 1N, semanalmente e ou todas as vezes que eram submetidos a procedimentos. Para pesagem, os animais eram colocados em sacos de algodão cru, previamente numerados e pesados. O peso do animal foi dado pela diferença entre o peso do saco vazio e o peso do saco com o animal (Fotos 11 e 12).

COLAR

Dois tipos de colares foram usadas, o primeiro de pequenas esferas de metal e a segunda de náilon (secur-a-tie®-08350 Avery Dennison). Na anilha era colocado um cubo com uma letra colorida em todas as faces (Fotos 13 e 14).

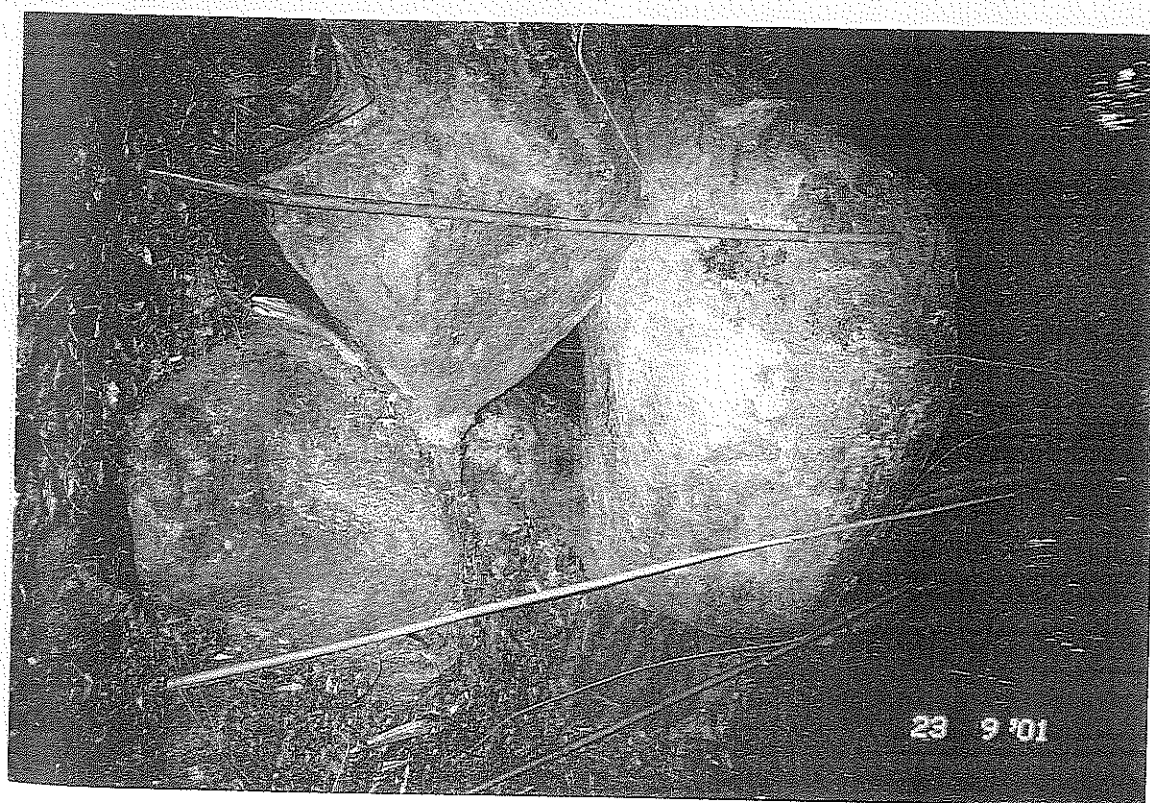
ADAPTAÇÃO/QUARENTENA

O período de adaptação ao cativeiro foi de 30 a 45 dias, durante o qual os animais foram monitorados com relação ao consumo de alimento, massa corpórea e comportamento. Quando o consumo de sangue se tornava regular e a massa corpórea constante, o animal era considerado adaptado (Anexo 10).

ANESTESIA E SACRIFÍCIO

Todos os procedimentos éticos para evitar sofrimento dos animais usados no experimento foram observados. Para a última coleta de sangue por punção cardíaca, os morcegos eram anestesiados com 0,1ml de Cloridrato de cetamina preparado a 20% em água destilada (Ketalar® Parke-Davis, Laboratório Ache). Após a punção, os animais eram colocados em recipiente fechado com éter anestésico. Após retirada do encéfalo para diagnóstico de raiva, os espécimes eram embalados individualmente em papel alumínio e sacos plásticos, rotulados e conservados em freezer -70°C .

Fotos 1 e 2 - Abrigos de *Desmodus rotundus* – Estados de Minas Gerais e São Paulo.



Fotos 3 e 4 - Abrigos de *Desmodus rotundus* - Estados de Minas Gerais e São Paulo.

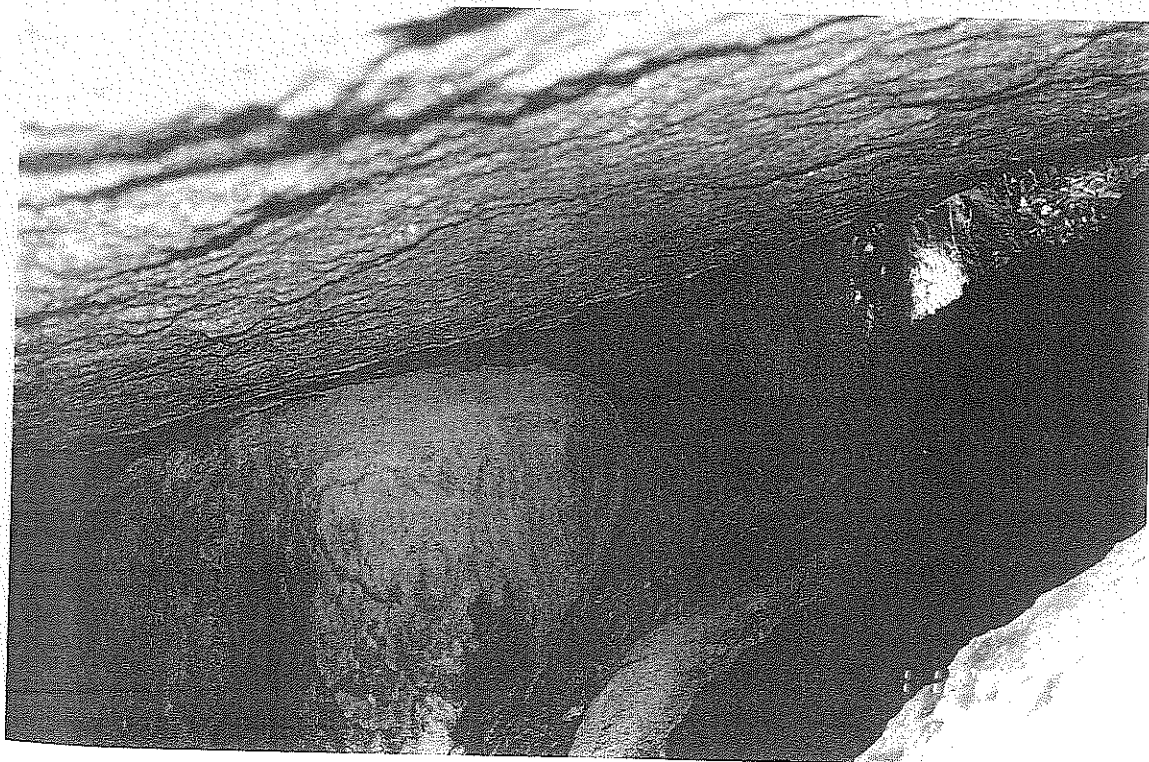
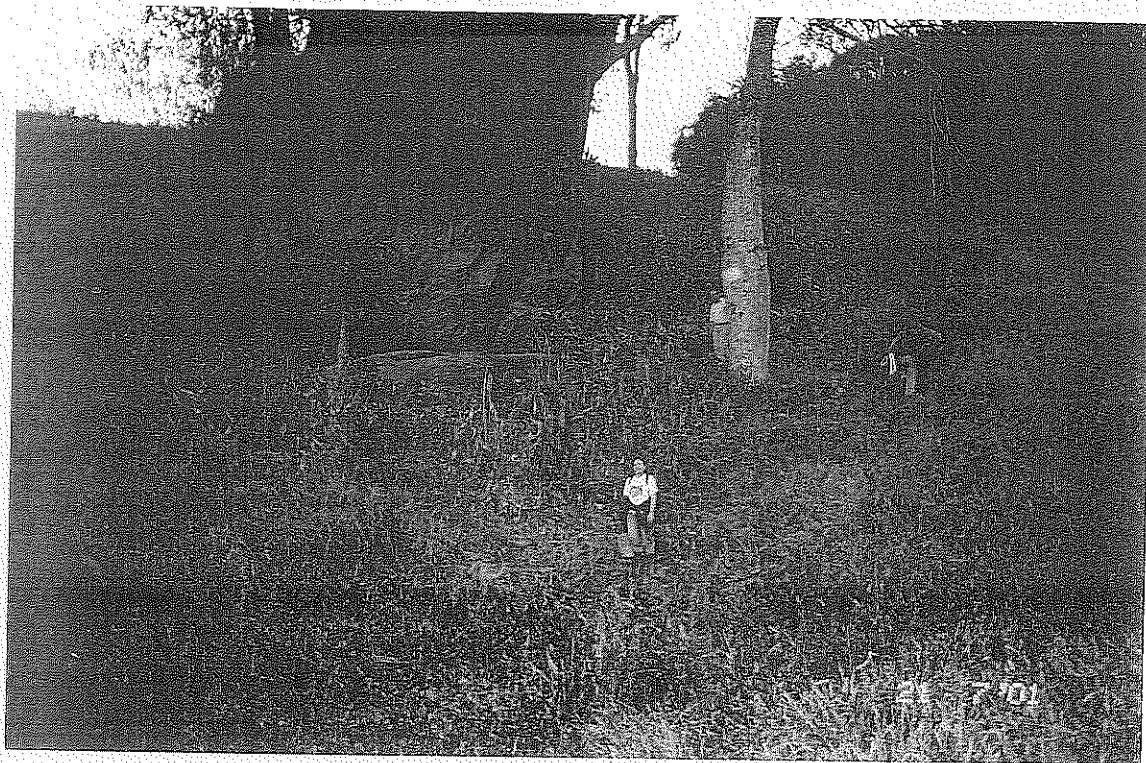


Foto 5 - Visão geral da estante com as nove gaiolas.

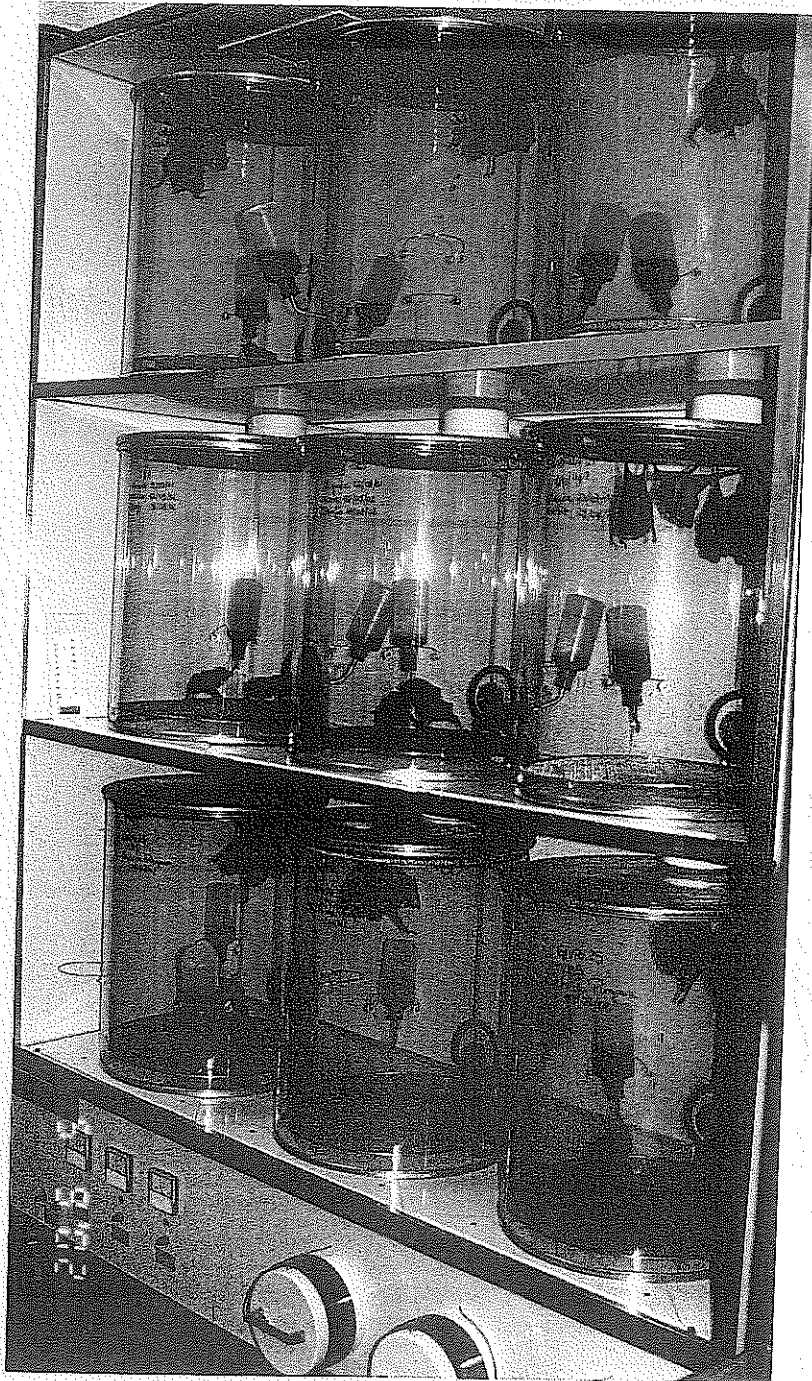
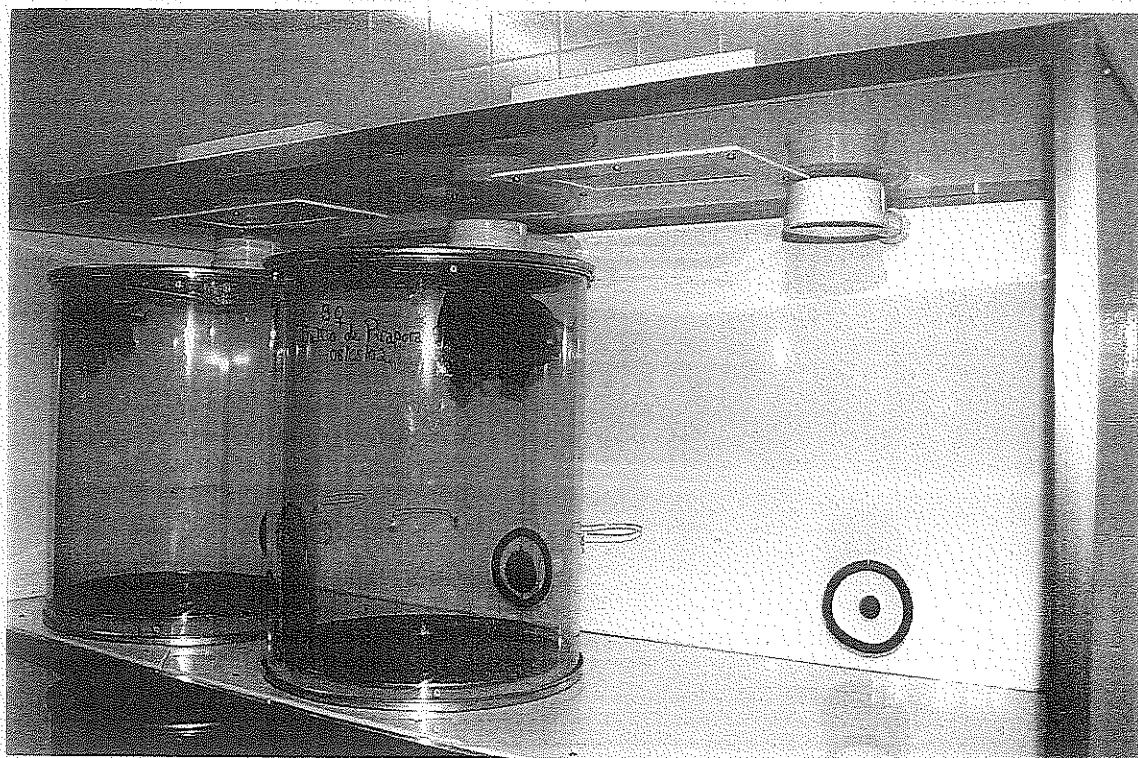
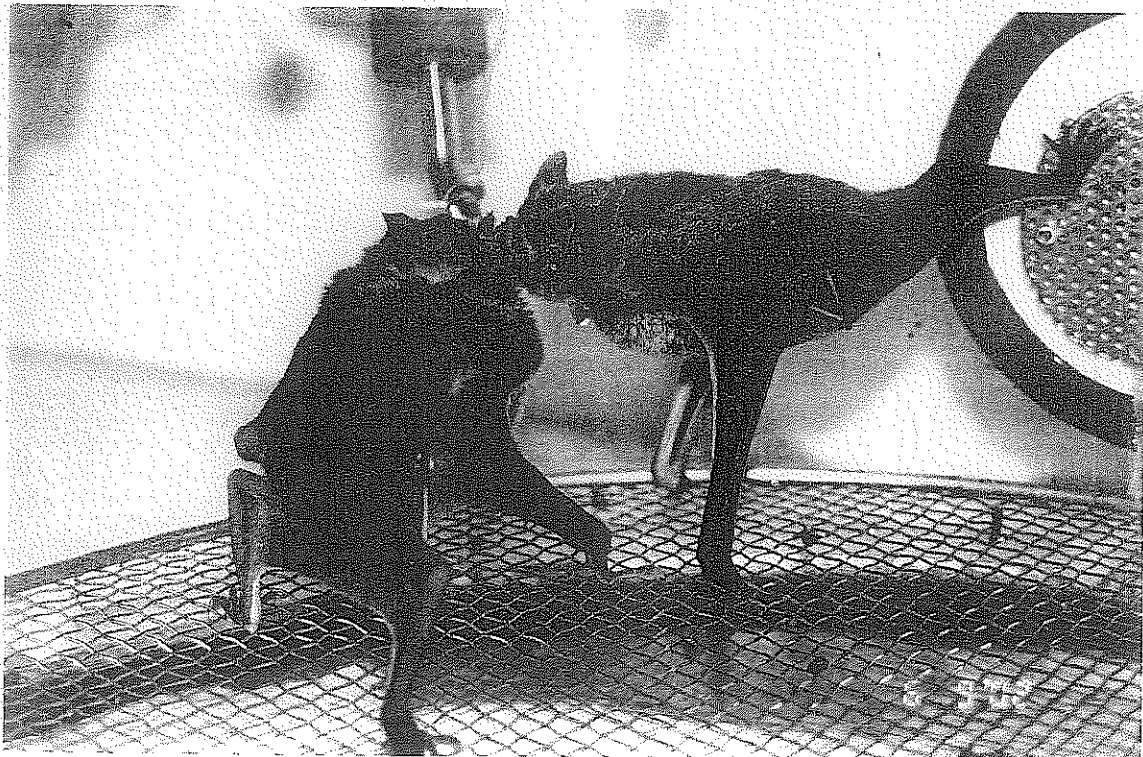
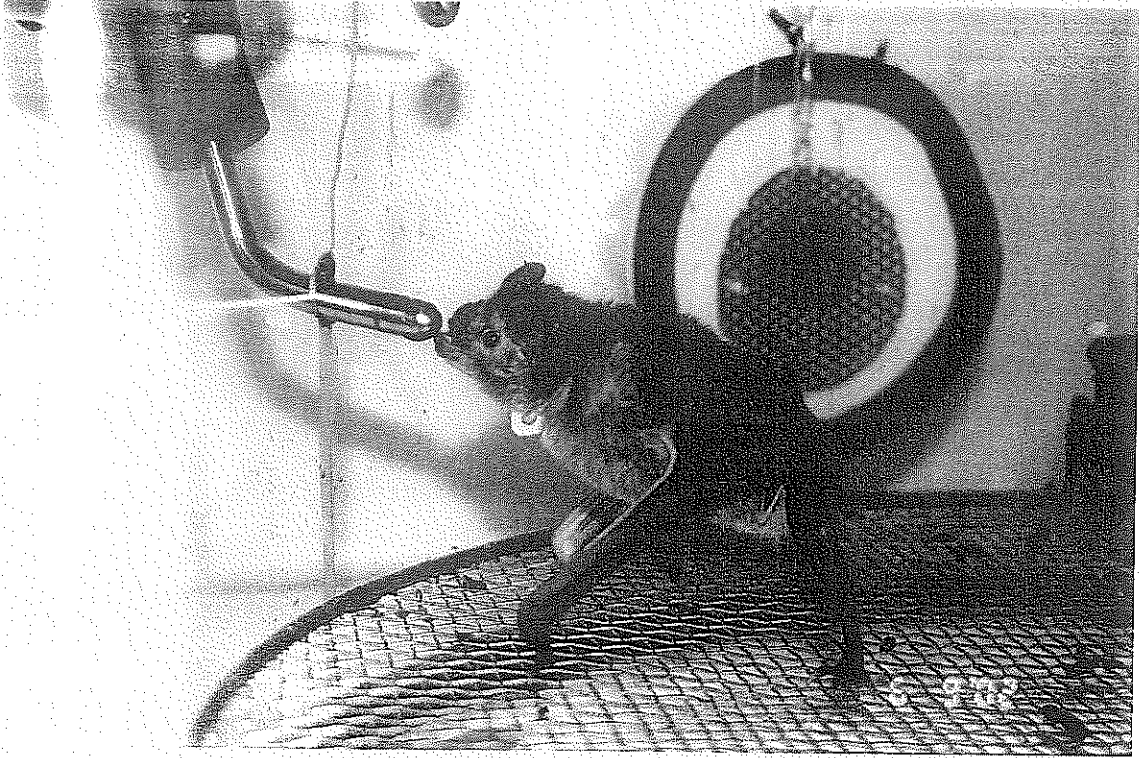


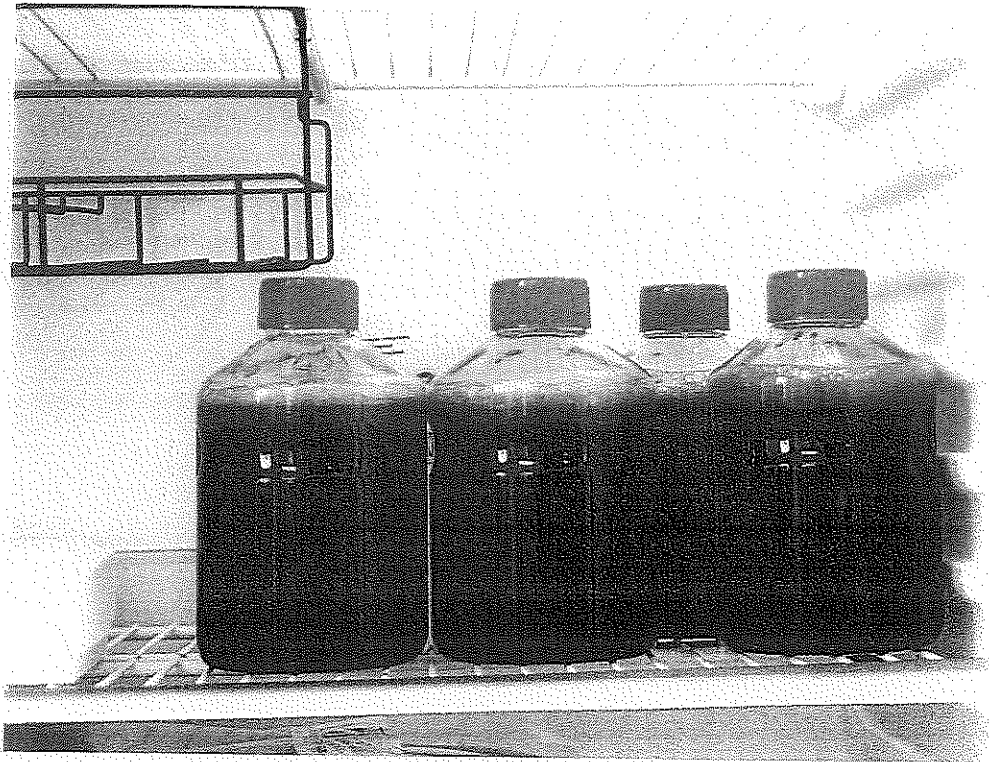
Foto 6 - Exaustão e insuflação de ar no interior das gaiolas.



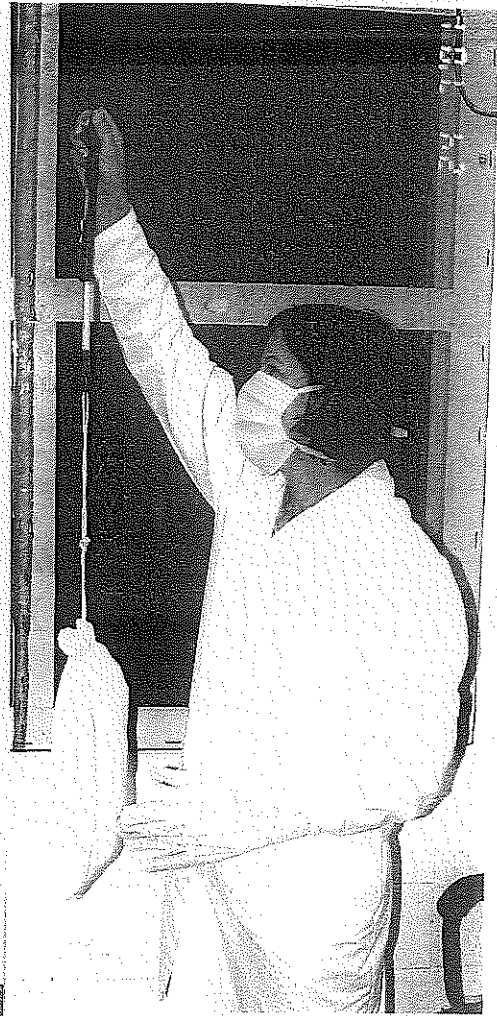
Fotos 7 e 8 - Bebedouros externos.



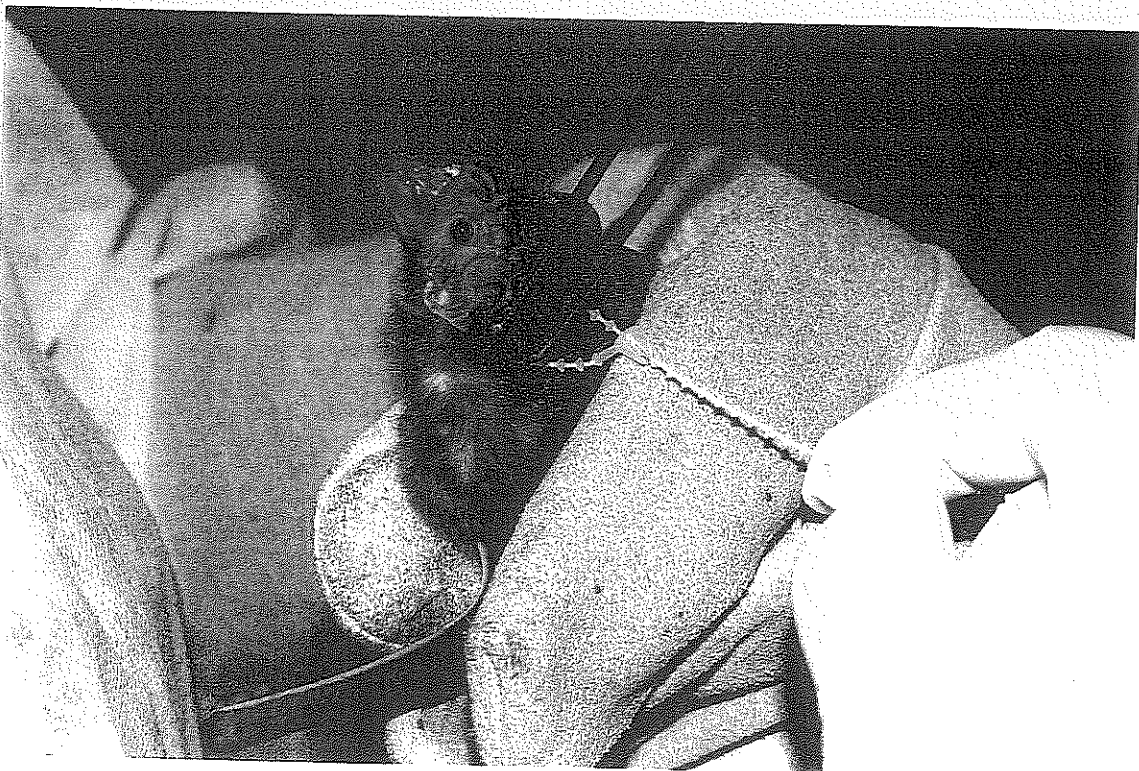
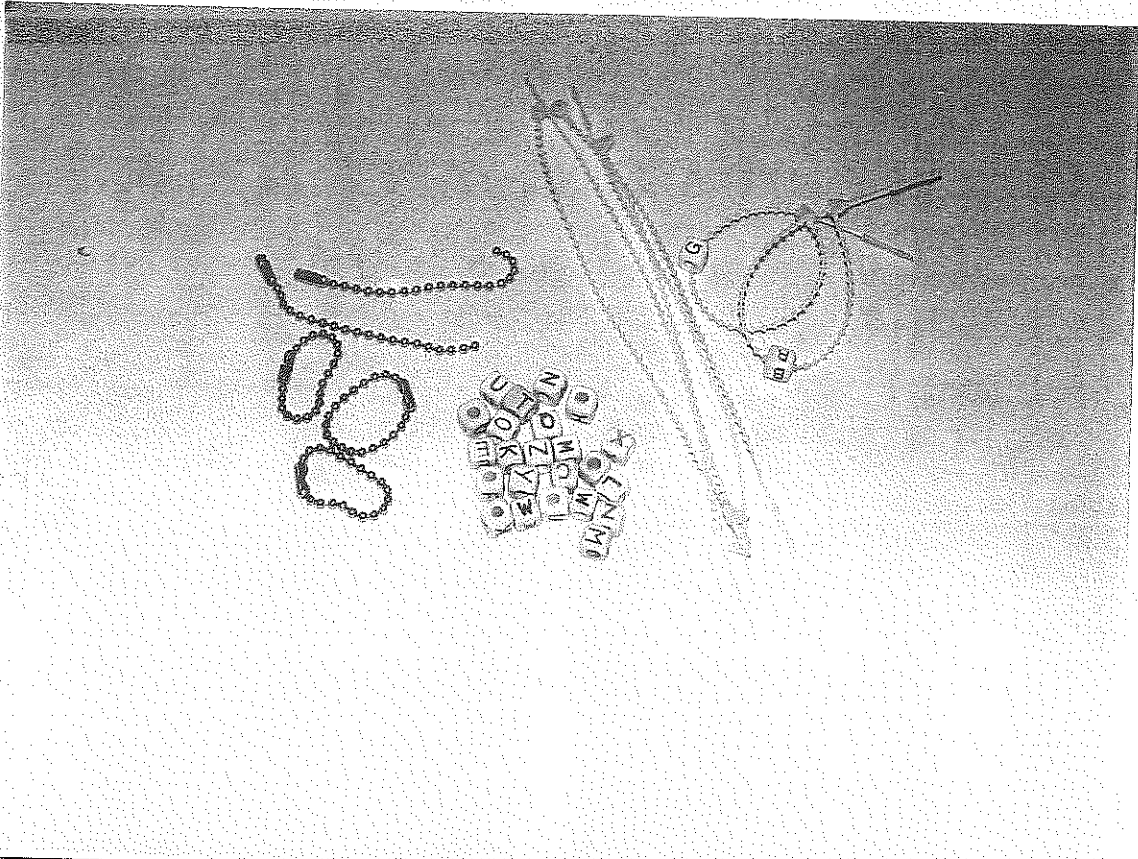
Fotos 9 e 10 – Estoque de sangue fresco e congelado.



Fotos 11 e 12 – Aferimento da massa corpórea em saco de algodão com dinamômetro.



Fotos 13 e 14 - Anilhas de metal e nylon,
detalhe do anilhamento.



1. TÉCNICAS LABORATORIAIS UTILIZADAS:

- a) Imunofluorescência Direta - IFD (Coons e Kaplan, 1950; Dean, 1996) para detecção do antígeno.

Na técnica IFD eram feitos decalques em lâminas de vidro do tecido nervoso e das glândulas salivares do animal em análise. Os decalques eram fixados com acetona gelada (30') e corados com conjugado anti-rábico (30' em câmara úmida/37°C), diluído em solução salina fosfatada. A leitura é feita em objetiva de 40x em microscópio de imunofluorescência para a presença de corpúsculos de Negri. Todos os lotes são acompanhados de lâminas controle positivas feitas com o tecido nervoso de camundongos infectados, com vírus rábico de rua. O conjugado antinucleocapsideo que foi utilizado é produzido pela SANOFI (produto 72114, lote 1B006), com título 1:20.

- b) Inoculação Intra Cerebral em Camundongos - ICC (Webster e Dawson, 1935; Koprowski, 1996), para isolamento do vírus rábico.

Na técnica ICC, aproximadamente 0,5g de tecido (nervoso, glândula salivar, etc.) do morcego eram trituradas em graal com pistilo, acrescentando quantidade suficiente de diluente (solução salina com 300 mg de lincomicina/100ml e 2% de soro de equino) para obter uma suspensão 20%. A suspensão é centrifugada (10'-2000rpm) e o sobrenadante inoculado (0,03ml, via intra-cerebral) em camundongos albino suíços jovens (14gramas e 21 dias). Os animais eram observados diariamente por um período de 21 dias, quanto ao surgimento dos sintomas típicos de raiva (tremores, pelo arrepiado, incoordenação motora, olhos congestionados, paralisia, etc.) sendo então sacrificados. O encéfalo do camundongo doente era retirado e submetido a técnica IFD, conforme descrito no item a).

- c) Obtenção e titulação da amostra viral usada para o desafio (Atanasiu, 1967).

A produção da suspensão desafio foi feita a partir da amostra nº R-2918/97, de um morcego *Desmodus rotundus* capturado em uma fazenda na Cidade de Santa Branca, Estado de São Paulo em 28/07/1997. Tratava-se de um indivíduo macho, pesando 29,18g. O diagnóstico de raiva foi feito pelas técnicas IFD e IC. O vírus foi isolado do cérebro, da glândula salivar e da gordura inter-escapular do animal com um período de incubação de 7 a 8 dias, 15 dias e 12 dias, respectivamente.

A primeira passagem da amostra em camundongos foi submetida a técnica RT-PCR (Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction) e o sequenciamento genético foi feito no CDC de Atlanta, E.U.A. (Center for Diseases Control and Prevention), apresentando 96,1% de homologia com

outras amostras de *Desmodus rotundus*, eqüinos e bovinos sequenciadas do Brasil (Martorelli *et al.*, 2001) (Anexo 11).

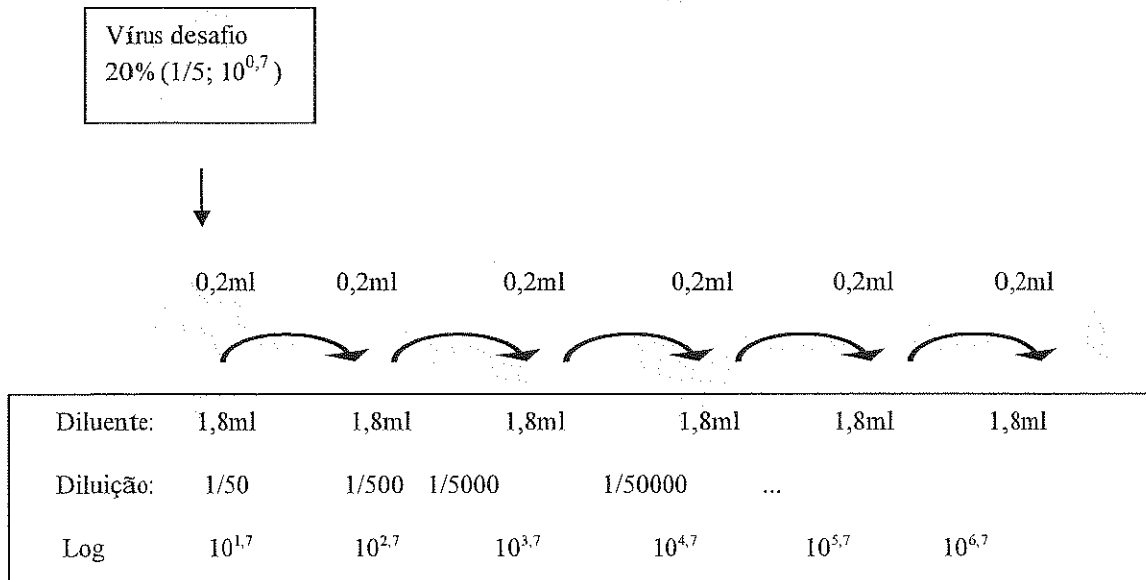
A partir da primeira passagem da amostra em camundongos, conservada em freezer -70°C , foi preparada uma solução 20% (P/V), cujo sobrenadante foi inoculado via intracerebral em 100 camundongos (conforme procedimento descrito no item b).

Os encéfalos dos 69 animais doentes sacrificados entre o 7^o e 10^o dia após inoculação foram retirados com assepsia e depois de pesados (29,18g), foram macerados em graal com pistilo, até se obter uma massa homogênea, a qual acrescentou-se 4 vezes o valor do peso em diluente (116,7ml). Essa suspensão foi centrifugada durante 10' a 2000rpm em centrífuga refrigerada (2°C - 4°C) e o sobrenadante foi separado em alíquotas de 0,5ml; 1,0ml e 2,0ml, conservadas em freezer -70°C até o momento do uso.

Para titulação da amostra viral foi descongelada uma alíquota e preparada uma diluição seriada, na base 10, iniciando com a diluição $10^{-1,7}$ até $10^{-6,7}$. A diluição e o cálculo do título do vírus segundo Reed-Muech são esquematizados abaixo. A titulação foi feita em duplicata.

Titulação da amostra

A suspensão 20% foi diluída de $10^{-1,7}$ até $10^{-6,7}$, conforme esquema abaixo.



⇒ as diluições $10^{-1,7}$ e $10^{-2,7}$ foram descartadas;

⇒ 8 camundongos foram inoculados por diluição (0,03 ml/via intracerebral);

⇒ os camundongos foram observados diariamente por 21 dias quanto ao surgimento de sintomas associados a raiva.

Cálculo do título do vírus segundo Reed-Muech (1938)

Os resultados da observação dos camundongos são apresentados abaixo:

Diluição do vírus	Mortos	Sobreviventes	Acumulados		Mortalidade (%)
			Mortos	Sobrev	
$10^{-3,7}$	8	0	22	0	100
$10^{-4,7}$	8	0	14	0	100
$10^{-5,7}$	5	3	6	3	66,7
$10^{-6,7}$	1	7	1	10	9,1

Título do vírus =

log diluição >50% de mortalidade	-	$\frac{\% \text{ de mortalidade } >50\% - 50\%}{\% \text{ de mortalidade } >50\% - \% \text{ de mortalidade } <50\%}$	x	log fator de diluição
----------------------------------	---	---	---	-----------------------

$$\begin{aligned} \text{título do vírus} &= \log(10^{-5,7}) - \frac{66,7 - 50}{66,7 - 9,1} \times 1 \\ &= -5,7 (-0,29) = 5,99 \end{aligned}$$

$$\text{título do vírus} = 10^{5,99} \text{ DL}_{50} / 0,03 \text{ ml/ICC}$$

DOSE LETAL 50%

A Infectividade de um vírus é a capacidade que ele possui de invadir uma célula, usando os mecanismos celulares para se multiplicar. Esse grau de infectividade pode ser avaliado através de métodos não quantitativos, que se baseiam no resultado da ação do vírus em culturas celulares, ovo embrionado ou animais de laboratório. Os efeitos do vírus são medidos pelo título do vírus, isto é, a recíproca da maior diluição do vírus que infecta 50% do sistema inoculado. Quando se usa animais de laboratório como sistema, o título é expresso em termos de Dose Letal para 50%.

CÁLCULO DAS DOSES DESAFIO (DL₅₀)

100DL₅₀ICC

$$10^{5,99} - 1DL_{50} / 0,03ml/ICC$$

$$x - 100DL_{50}ICC (10^{2,0})$$

$$x = 10^{5,99} - 10^{2,0}$$

$$x = 10^{3,99} \text{ (Diluição que contém 100 DL}_{50}\text{ICC teóricas}=10^{-3,99}\text{)}$$

1.000DL₅₀ICC

$$10^{5,99} - 1DL_{50} / 0,03ml/ICC$$

$$x - 1000DL_{50}ICC (10^{3,0})$$

$$x = 10^{5,99} - 10^{3,0}$$

$$x = 10^{2,99} \text{ (Diluição que contém 1.000 DL}_{50}\text{ICC teóricas}=10^{-2,99}\text{)}$$

10.000DL₅₀ICC

$$10^{5,99} - 1DL_{50} / 0,03ml/ICC$$

$$x - 10.000DL_{50}ICC (10^{4,0})$$

$$x = 10^{5,99} - 10^{4,0}$$

$$x = 10^{1,99} \text{ (Diluição que contém 10.000 DL}_{50}\text{ICC teóricas}=10^{-1,99}\text{)}$$

100.000DL₅₀ICC

$$10^{5,99} - 1DL_{50}ICC$$

$$x - 100.000DL_{50}ICC (10^{5,0})$$

$$x = 10^{5,99} - 10^{5,0}$$

$$x = 10^{0,99} \text{ (Diluição que contém 100.000 DL}_{50}\text{ICC teóricas}=10^{-0,99}\text{)}$$

d) Rapid Focus Fluorescent Inhibition Test (RFFIT) (Smith *et al.*, 1973) para dosagem de anticorpos anti-rábicos neutralizantes (AcN) no soro dos morcegos, usando o parâmetro humano (0,5UI/ml) como ponto de corte.

Os soros foram diluídos em meio de cultura na base 2, iniciando com 1:5 até 1:160, em microplaca, incubados com vírus cepa PV (Pasteur Vírus) em estufa de 5% de CO₂, por uma hora a 37°C. Após este período foi adicionada célula BHK-21 (Baby Hamster Kidney), retornando à estufa por 24 horas. O "tapete" celular é fixado com acetona gelada 80%, corado com conjugado

anti-rábico, em câmara úmida por uma hora. A leitura é feita em microscópio de imunofluorescência. O ponto de leitura é a redução em 50% no número de células infectadas. Todo lote de soros foi acompanhado de soro padrão de 200UI/ml (OPAS) e soro controle positivo e negativo. O ponto de corte de 0,5UI/ml para humanos foi considerado como soroconversão e indicador do sucesso da vacinação.

O conjugado anti-rábico utilizado é produzido pelo Laboratório de Imunologia do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, lote 109/02 com título 1:20. O meio de cultura era o meio Eagle mínimo essencial -Sigma M1018- lote 21k83001- com 10% de soro fetal bovino - Gibco 10270 lote 40F8110J, 100ml/l de Triptose - Sigma T8159 lote 91k2333 e antibiótico gentamicina 40µ/l.

e) Coleta de sangue dos morcegos (Baer e Mclean, 1971).

Para coleta de sangue da veia cefálica da asa dos *Desmodus rotundus* foi feita uma incisão na veia com o bisel de agulha 13x4,5mm. Com esse método, 0,2ml a 0,3ml de sangue pode ser obtido, recolhido em tubo capilar heparinizado (Perfecta Ind. Com. Ltda.), transferido para tubos ependorf (Fotos 15 e 16). A última coleta de sangue era feita por punção cardíaca (Foto 17).

d) Reação de Polimerase em Cadeia – Transcriptase reversa (RT-PCR).

Para o RT-PCR foram usados oligonucleotídeos ("primers") para o gene N do vírus, denominados 21g e 304 – descritos por Smith em 1996 que amplificam aproximadamente 1400pb.

O RNA foi extraído a partir de uma suspensão de cérebro a 20% (P/V) do morcego e da glândula salivar do animal a qual foi previamente picotada. A extração usando Trizol (Gibco BRL) seguiu o protocolo descrito pelo fabricante:

1. Homogeneizar em vortex por 15", 500ul de Trizol e 500µl de suspensão de cérebro a 20%.
2. Adicionar 200µl de clorofórmio álcool isoamil (24:1) a amostra, homogeneizar em vortex por 15" e incubar em banho de gelo por 10'.
3. Centrifugar a 12.000rpm por 15' em centrífuga refrigerada (4°C).
4. Transferir o sobrenadante (fase aquosa, de aproximadamente 500µl) para um outro tubo.
5. Adicionar isopropanol gelado (V/V), homogeneizar em vortex por 15".
6. Incubar em banho de gelo por 10'.
7. Centrifugar a 12.000rpm por 15' (4°C).
8. Desprezar o sobrenadante e inverter o tubo em papel de filtro.
9. Lavar o sedimento ("pellet") com 1ml de etanol gelado 75%, homogeneizar em vortex por 15".

10. Centrifugar a 7.500rpm por 8' (4°C), desprezando o sobrenadante e invertendo o tubo em papel de filtro.
11. Secar o sedimento e ressuspender com 30µl de água Depec, homogeneizar. Estocar a -70°C ou fazer a transcrição reversa.

A síntese do cDNA, para um volume final de 25µl, utilizando 4µl do RNA extraído, foi acrescido de uma solução preparada (no gelo) contendo 1x de Tampão RT (Gibco BRL), 1,2mM de cada dNTPs, 4mM de DTT, 50pmols do "primer" 21g, 40U de RNAout (Promega, UK), 200U da enzima transcriptase reversa (Maloney-murine V Rtase - Gibco BRL) e água DEPEC. A mistura foi incubada à 42°C por uma hora em termociclador Gene Amp PCR System, modelo 2400/AB.

O cDNA obtido foi amplificado por PCR. A reação foi realizada em um volume final 50µl, com 5µl de cDNA que foi acrescido a um mix preparado (no gelo) 1x tampão de PCR (Gibco BRL), 2,5mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 50pmol do primer 21g e 304, 2,5U Taq DNA Polimerase (Gibco BRL) e água Depec. Realizada uma desnaturação a 94°C por 5' a reação foi submetida a 35 ciclos de 94°C 4", 55°C 45", 72°C 1'30". Após o término dos ciclos, foi programada uma extensão final a 72°C por 5'.

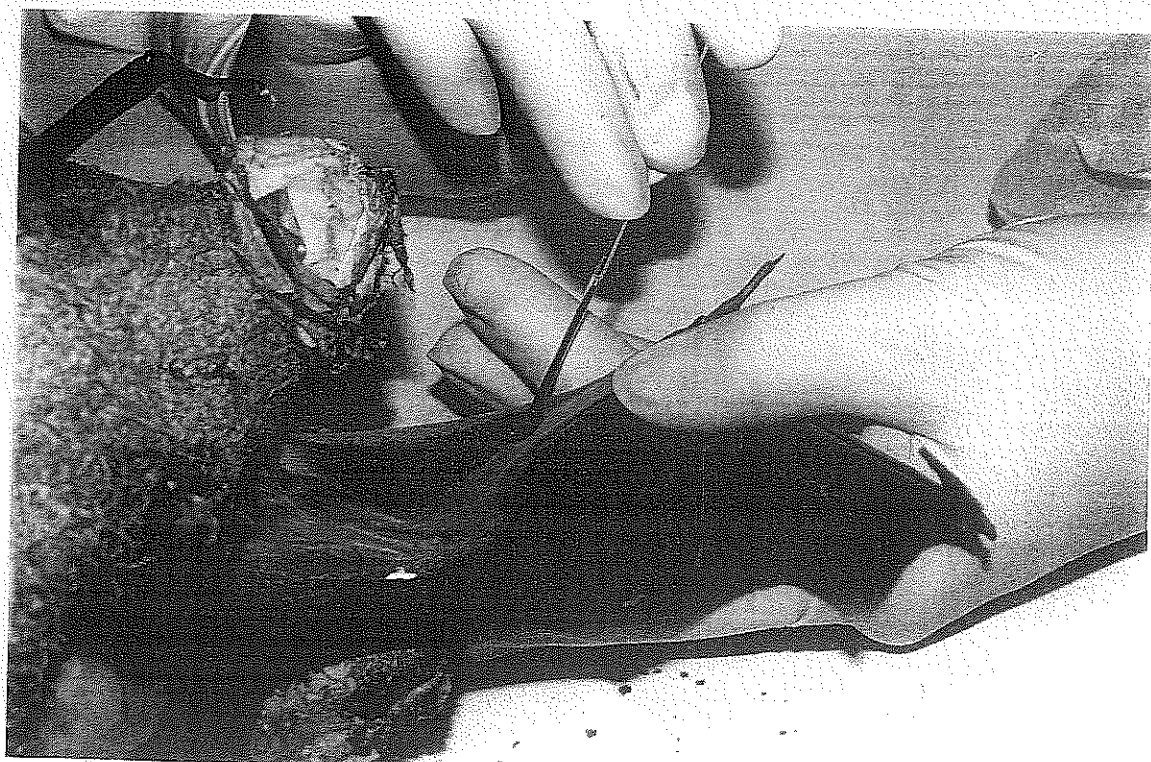
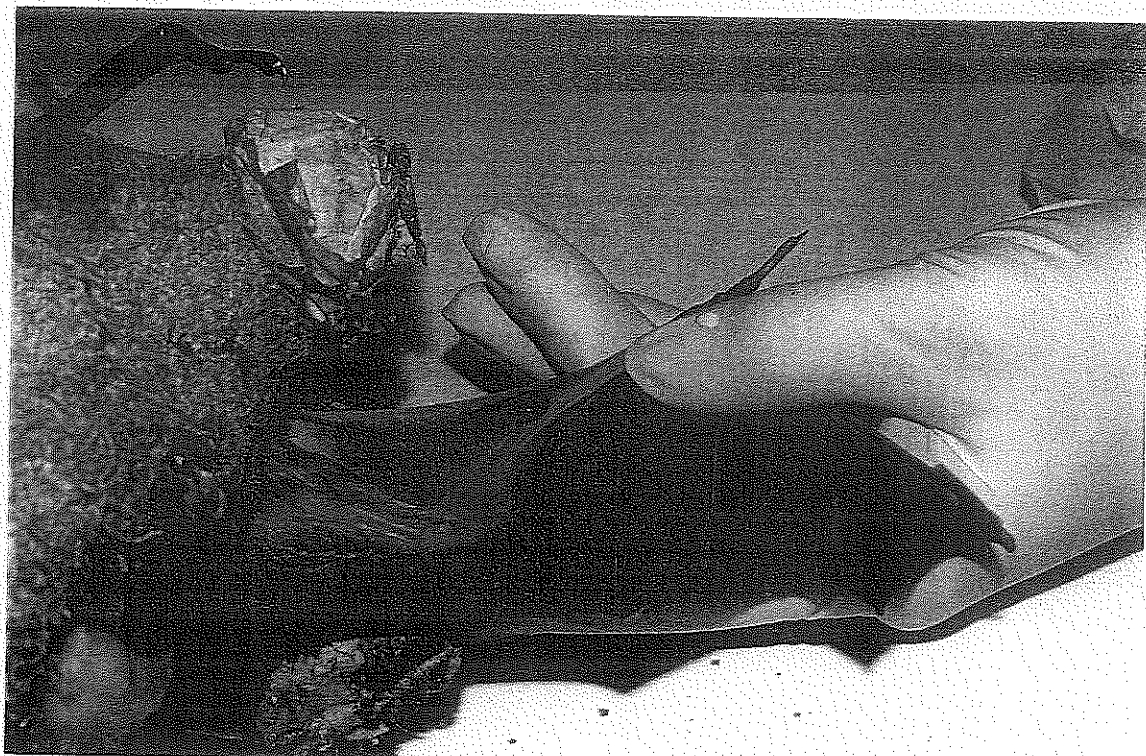
Corrida eletroforética: O produto amplificado foi separado por eletroforese a 100V por 45', em gel de agarose a 2%, imerso em tampão Tris-Borato (0,045M), EDTA (1mM), acrescido de brometo de etídio (0,5µg/ml) e visualizado em luz ultravioleta. Foi incluído um peso molecular de 100pb (Gibco Life Technologies) para identificação do tamanho do produto amplificado.

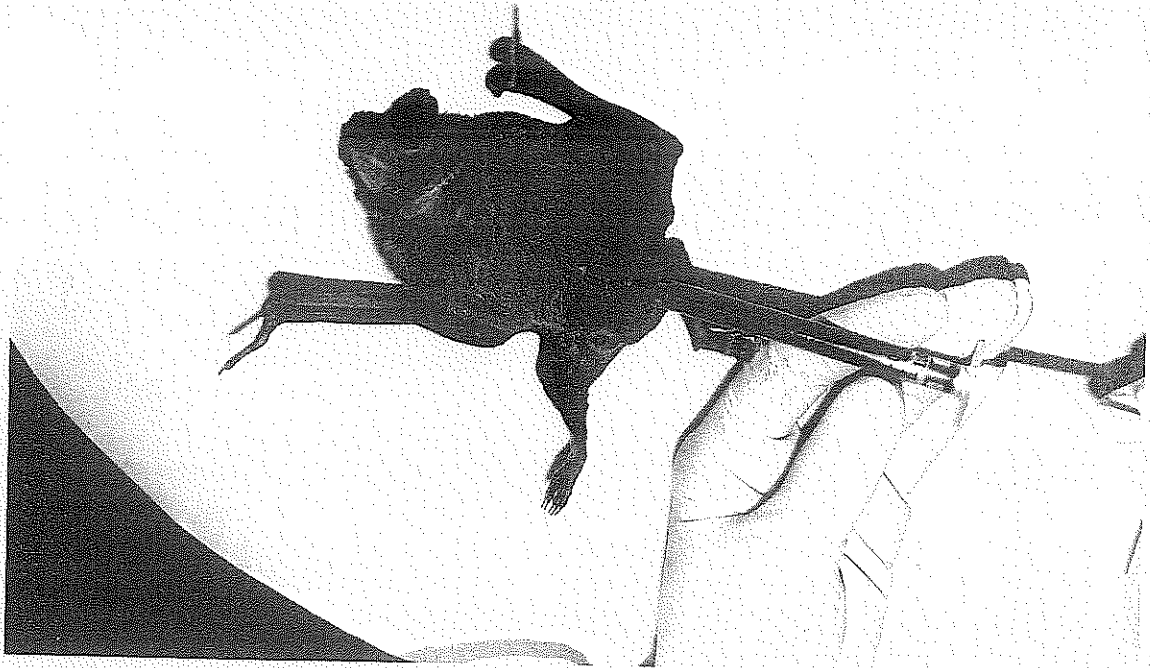
g) Concentração da vacina

O volume inicial da vacina foi concentrado em volumes menores em saco de diálise (Inlab código 132, 25mmx16mmx30cm) em solução super saturada (sacarose). Cut-off de peso molecular de 12.000 a 16.000 e porosidade de 25 Angstroms.

No experimento que testava a imunogenicidade da vacina e da via oral, a vacina foi concentrada de 3,5ml para 0,7ml para ser administrada via oral, diretamente na boca dos animais. Nos experimentos que testavam a imunogenicidade da vacina quando aplicada via pasta, o volume de 9 e de 18 vacinas foi concentrado em volumes finais de 1,2ml a 2,0ml.

Fotos 15, 16 e 17 - coleta de sangue: da asa com capilar, por punção cardíaca.





DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

Em todos os experimentos, após o período de adaptação foi feita coleta de sangue de todos os animais, para dosagem de AcN. Os animais que apresentaram título de AcN foram retirados do experimento. Os animais eram mantidos em cativeiro em gaiola coletiva, identificados com colar.

O número de animais que compunham os grupos foi determinado considerando a disponibilidade de animais e o número indicado de animais por gaiola determinado pelo experimento de cativeiro.

INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Para esse experimento foram utilizados cinco grupos de 10 morcegos *Desmodus rotundus* (Quatro grupos experimento e um grupo controle), composto de animais machos ou fêmeas adultos.

Os grupos experimento foram inoculados com 100DL₅₀ICC, 1.000DL₅₀ICC, 10.000DL₅₀ICC e 100.000DL₅₀ICC, por via intra-muscular (músculo peitoral, 0,1ml) com cepa de vírus rábico isolada de morcego *D.rotundus*. O grupo controle foi inoculado com solução salina tamponada estéril.

Os animais foram observados diariamente quanto ao surgimento ou não de quadro clínico associados a raiva, por um período de 90 dias após inoculação.

Os animais que apresentaram quadro clínico típico de raiva durante o período de observação, foram sacrificados na fase de prostração e retirados o encéfalo e as glândulas salivares para as técnicas IFD, IC e RT-PCR. Os morcegos que não apresentaram quadro clínico de raiva, foram sacrificados ao final do período de observação e o cérebro e as glândulas salivares foram submetidas as técnica IFD, IC e RT-PCR.

No dia 30, 60 e 90 após infecção experimental foi feita coleta de sangue de todos os animais para dosagem de AcN.

VACINAÇÃO

A vacina utilizada no experimento foi fornecida pela Merial Saúde Animal Ltda, fabricada na França, lote nº 00H472, nome comercial RABORAL V-RG, consiste de um sachê plástico, inserido em um polímero de carne de peixe, selada nas extremidades com cera. Assim confeccionada a vacina funciona como isca atrativa para animais carnívoros.

Cada sachê contém 2,5ml de vacina com título entre $10^{8,0}$ e $10^{9,0}$ DI 50% (Dose Infectante 50%) e gentamicina como preservativo. A vacina pertence a categoria III de vírus recombinantes, o que significa que contém um vírus vivo (vírus vaccinia) como vetor que carrega e expressa um gen estranho (glicoproteína do vírus rábico). Esta vacina não pode causar raiva porque expressa somente o antígeno que induz a imunidade (Anexo 12).

O controle de qualidade da vacina, segundo o fabricante, inclui testes de pureza, pH, esterilidade, aspecto, potência, segurança e identidade (para assegurar a identificação do vírus vaccinia e para confirmar a expressão do vírus rábico) (Anexo 13).

Para esse estudo, a isca foi aberta com bisturi, e o líquido foi retirado perfurando o sachê com uma agulha 25x7 em seringa de 5ml.

1-IMUNOGÊNICIDADE DA VACINA

Foram utilizados cinco grupos de 7, 8, 7, 6 e 10 morcegos *Desmodus rotundus* (fêmeas ou machos adultos).

Os grupos de animais receberam 0,25ml, 0,75ml, 1,25ml, 2,0ml e 3,5ml de vacina respectivamente, diretamente na boca com seringa de 1ml. Os grupos que receberam 1,25ml e 2,0ml da vacina ficaram o dia anterior em jejum como forma de melhorar a aceitação da vacina. O volume de 3,5ml de vacina do último grupo foi concentrado conforme procedimento descrito no item g) de técnicas utilizadas, para um volume final de 0,7ml, administrado ao animal (Foto 18).

No dia 26 após a vacinação foi feita coleta de sangue de todos os animais para dosagem de AcN e dois dias depois foi feito o desafio intramuscular dos animais, 0,1ml no músculo peitoral, com 10^5 DL₅₀ da cepa utilizada na infecção experimental (Foto 19).

Os animais foram observados quanto ao surgimento ou não de quadro clínico associado a raiva, por um período de 90 dias após o desafio. Foi feita nova coleta de sangue 25 dias após o desafio e no dia do sacrifício.

Os cérebros de todos os morcegos foram submetidos ao diagnóstico de raiva através da técnica IFD.

2-TRANSMISSIBILIDADE DA PASTA

Dois grupos de 7 morcegos *Desmodus rotundus*. Para esta etapa utilizamos fêmeas adultas que na primeira coleta de sangue, que antecedia a formação dos grupos, apresentaram título de anticorpos (0,2 a 0,3UI/ml) e não podiam ser utilizadas nos outros experimentos.

GRUPO A - Um animal do grupo recebeu no dorso 1,0g de pasta de vaselina sólida (LBS Laborasa Inf. Farm. Ltda.) homogeneizada com 0,5g de corante artificial alimentício "vermelho bordeaux" (Mago I.A.P.P. Ltda.) e foi devolvido ao grupo. A pasta foi aplicada uma única vez.

GRUPO B - Um animal do grupo recebeu no dorso 1,0g de pasta de vaselina sólida homogeneizada com 0,5ml de corante artificial alimentício "amarelo" (Nilu Ind. Ltda.) e foi devolvido ao grupo. A pasta foi aplicada uma única vez.

Os animais foram retirados da gaiola, 24 e 48 horas após aplicação do corante, e examinados para a presença de corante no corpo e pelo. O papel de filtro sob a tela inferior da gaiola foi observado para a presença de corante nas fezes e urina dos animais.

3-VACINA VIA PASTA

Para esta etapa foram utilizados 8 grupos de 7, 7, 7, 7, 7, 9, 9 e 10 morcegos *D.rotundus* (fêmeas adultas), denominados respectivamente de grupos A, B, C, D, E, F, G e H. Nos grupos A, C e D, a vacina homogeneizada na pasta neutra com corante foi administrada no dorso de um animal de cada grupo, devolvido a gaiola com os outros morcegos. Nos grupos B, E, F, G e H, a vacina homogeneizada na pasta neutra com corante foi administrada no dorso de dois animais e os dois animais foram devolvidos a gaiola, com os outros morcegos. A vacina foi administrada uma única vez (Fotos 20, 21 e 22).

Quadro 1: Dose e volume de vacina, quantidade de pasta e número de animais que receberam pasta com vacina e corante por grupo.

Grupo	Nº de animais no grupo	Dose de vacina	Volume final de vacina	Pasta (g)	Corante (g)	Nº animais "tratados"
A	7	9	1,5ml	1,5	0,2	1
B	7	9	1,2ml	2,5	0,2	2
C	7	9	1,5ml	3,0	0,2	1
D	7	9	1,2ml	2,5	0,2	2
E	7	9	1,5ml	2,0	0,2	2
F	9	18	2,0ml	2,5	0,2	1
G	9	18	2,0ml	2,5	0,2	2
H	10	18	2,0ml	2,5	0,2	2

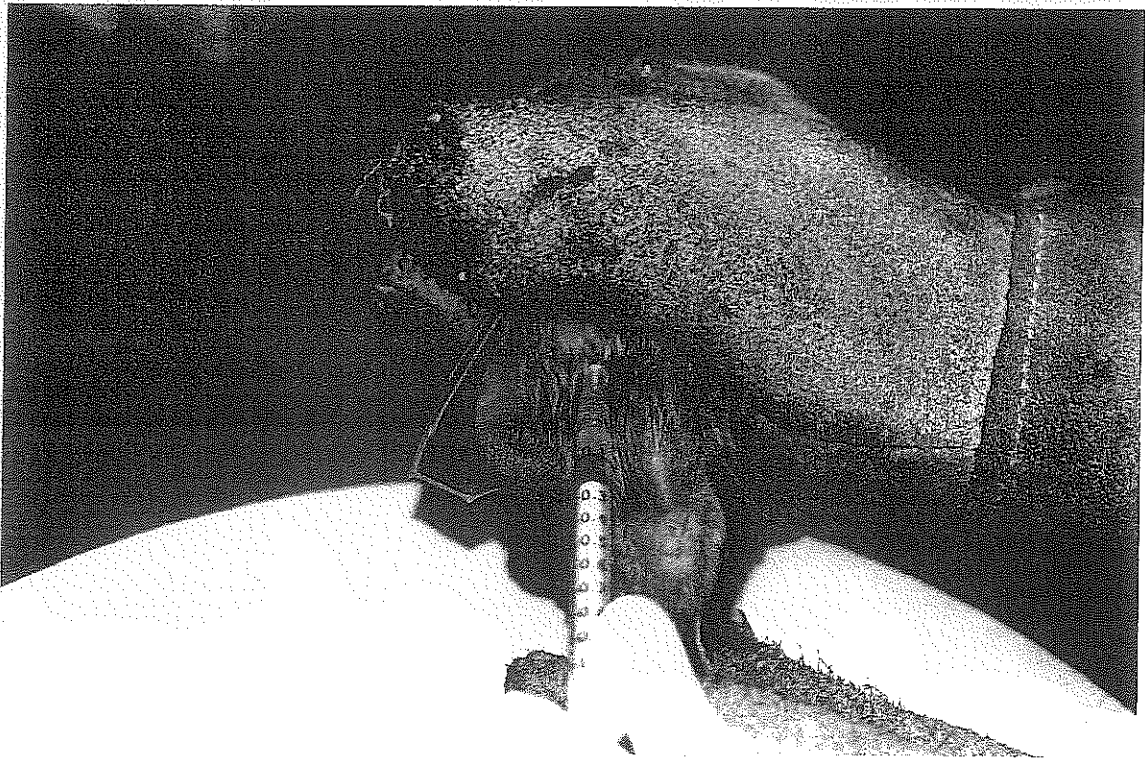
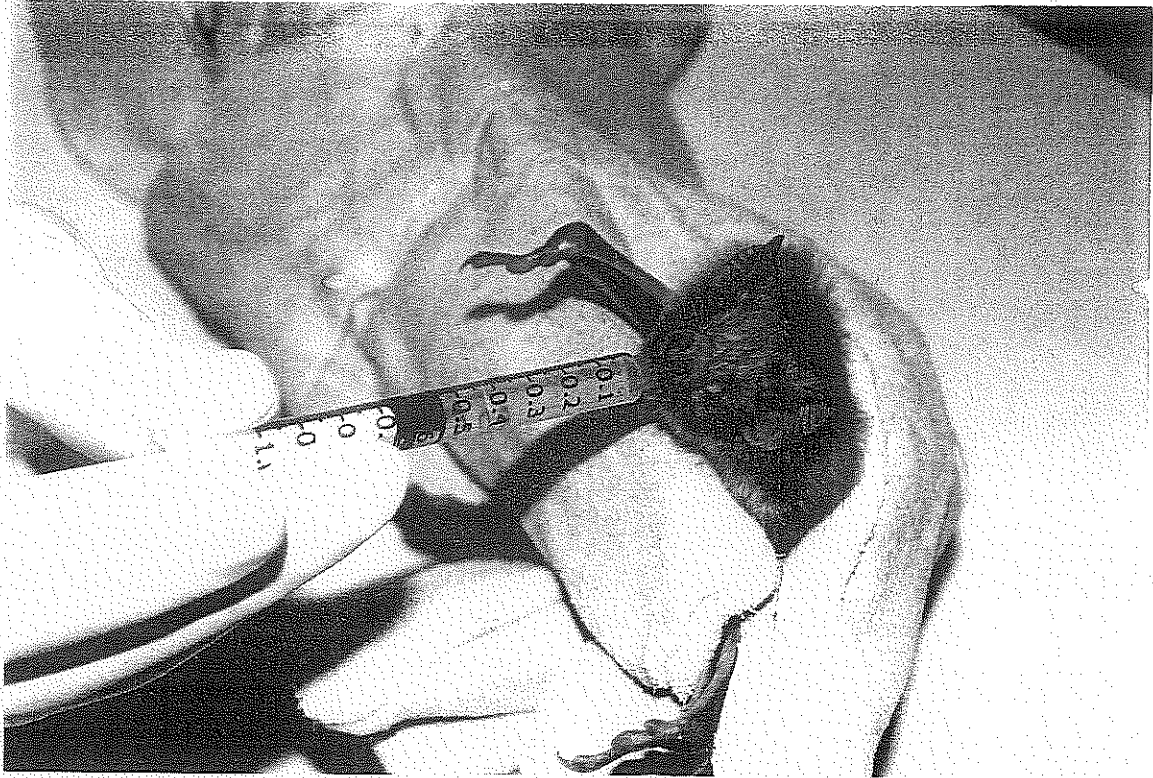
A pasta usada para os grupos A e B era de vaselina (LBS Laborasa Ind. Farmacêutica Ltda.). Para os outros grupos a pasta usada era a base de glicerina (nome comercial KY - Johnson e Johnson).

No dia 26 após a vacinação foi feita coleta de sangue de todos os animais para dosagem de AcN e dois dias após foi feito o desafio intra-

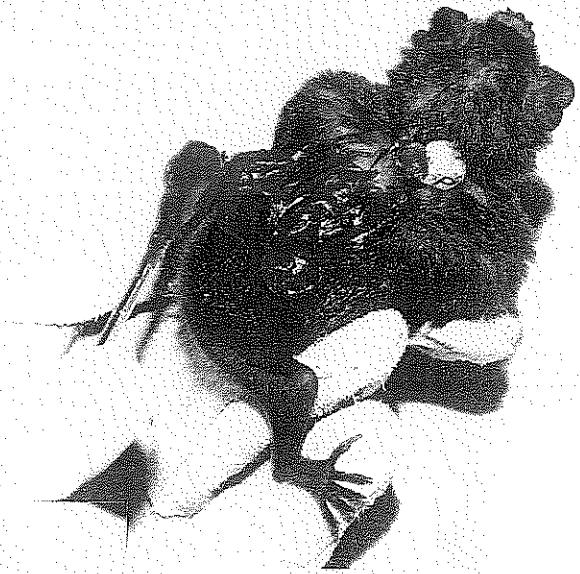
muscular dos animais (0,1ml no músculo peitoral), com 10^5 DL₅₀ICC da cepa utilizada na infecção experimental.

Os animais foram observados diariamente quanto ao surgimento ou não de quadro clínico associado a raiva, por um período de 90 dias após o desafio. Foi feita nova coleta de sangue 25 dias após o desafio e no dia da eutanásia. Os cérebros de todos os morcegos foram submetidos ao diagnóstico de raiva através da técnica IFD.

Fotos 18 e 19 - Vacinação de *Desmodus rotundus*, com vacina V-RG e desafio com vírus rábico no músculo peitoral.



Fotos 20, 21 e 22 - Aplicação da pasta com vacina e corante no dorso de um animal.



Resultados

CATIVEIRO

Cento e dezesseis morcegos foram utilizados nesse experimento (69 fêmeas e 47 machos). A taxa de mortalidade em cativeiro foi de 19,8%. Vinte e três animais morreram (7 machos e 16 fêmeas), a maioria (73,9%) durante os dez primeiros dias de cativeiro (período de adaptação). A mortalidade ocorreu tanto em pequenos grupos (2 a 6 animais) quanto em grandes grupos (7 a 15 animais). Não houve diferença significativa na mortalidade observada em pequenos e grandes grupos ($p=0,35$) (Tabela 1).

Em geral, no primeiro dia de cativeiro, o alimento oferecido não era consumido, porém a partir do segundo ou terceiro dia, o alimento passa a ser aceito e o consumo aumenta, estabilizando a partir da segunda semana. O consumo médio individual diário foi de 20,1ml, com variação entre 15,1ml e 29,1ml. Não houve diferença na média de consumo diário entre machos (20,3ml) e fêmeas não prenhas (20,0ml) (Gráfico 1).

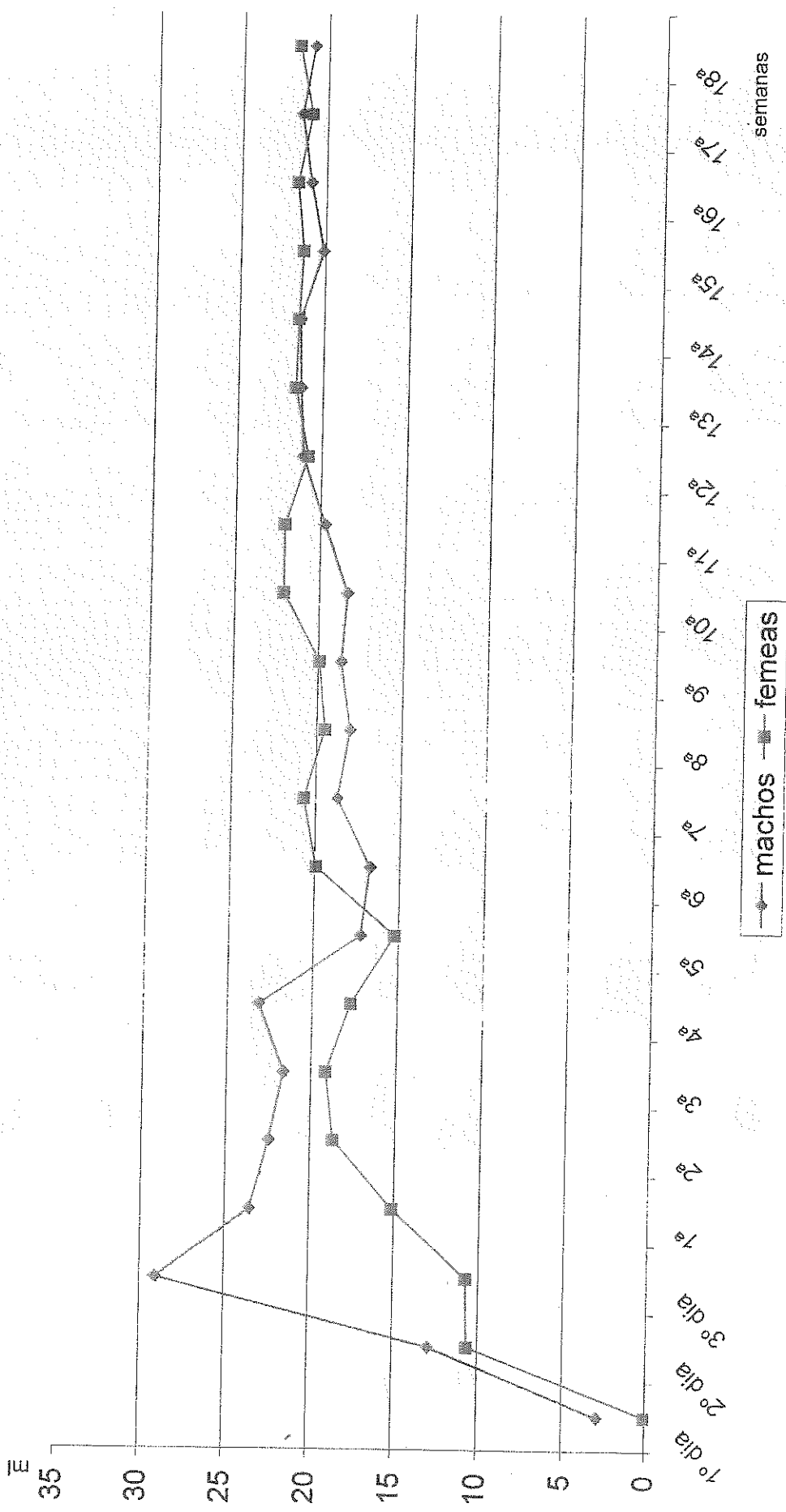
Todos os animais perdiam massa corpórea nos primeiros dias de cativeiro, porém recuperavam rapidamente após a primeira semana, mantendo-se estável com pequena flutuação de uma pesagem para outra. A média de massa de fêmeas adultas não prenhas foi de 33,4g com uma variação entre 30,6g e 38,7g; entre machos adultos a média de peso foi 28,6g com variação entre 25,4g e 30,5g. A maioria das fêmeas (88,9%) adquiriu peso no fim do período de cativeiro (em média 1,93g), enquanto a maioria dos machos (76,5%) perdia peso, em média 2,42g.

O consumo médio diário de 20,3ml para os machos e 20ml para fêmeas não prenhas representou um consumo de sangue diário equivalente a 71% e 60%, respectivamente da massa corpórea do animal, considerando a massa corpórea média de 28,6g para machos e 33,4g para as fêmeas.

A anilha de pequenas esferas de metal apresentou reação inflamatória local em 36,7% dos animais. A anilha de nylon causou reação local em 11,1% dos animais e foi então utilizada para identificação dos animais.

Durante o período de cativeiro foram observadas agressões entre os animais. A maioria entre fêmeas (69,7%). As regiões do corpo mais freqüentemente atingidas eram a cabeça (34,1%), a face: olhos, região nasal, queixo e lábios (26,8%), escápula (17,1%), orelha (14,6%), polegar (4,9%) e patágio (2,4%). (Fotos 23 e 24)

Gráfico 1: Média do consumo de sangue entre machos e fêmeas de *Desmodus rotundus* mantidos em cativeiro.



Fotos 23 e 24 – Agressões entre os animais.



INFECCÃO EXPERIMENTAL

A mortalidade total foi de 25%. Nos grupos 1000DL₅₀ICC e 10.000DL₅₀ICC a mortalidade foi 20%, no grupo inoculado com 100.000DL₅₀ICC, a mortalidade foi de 60%. No grupo que recebeu 100DL₅₀ICC não houve mortalidade. O período de incubação variou de 5 a 41 dias, com média de 16,8 dias e o período de morbidade foi entre 18 e 48 horas. Foi observada correlação negativa entre o período de incubação e a dose inoculada ($r=-0,89$). O período de incubação foi inversamente proporcional a dose inoculada. O período de incubação médio foi de 7,7 dias, 31,5 dias e 30 dias para os grupos 100.000DL₅₀ICC, 10.000DL₅₀ICC e 1.000DL₅₀ICC respectivamente (Tabela 2).

O vírus rábico foi detectado pelas técnicas IFD, IC e RT-PCR do cérebro de todos os animais infectados (sensibilidade 100%), entretanto, o vírus foi detectado das glândulas salivares de 40% dos morcegos pelas técnicas IFD e IC e 60% pela técnica RT-PCR. Os cérebros e as glândulas salivares de todos os morcegos do grupo controle e de todos os sobreviventes foram negativas nos três testes diagnósticos (Tabela 3).

Entre os dez morcegos que morreram de raiva, oito (R12, Q12, K12, X12, Z12, F12, H7 e Y7) apresentaram sinais de raiva paralítica: tremores e espasmos musculares, impossibilidade de se manter apoiado sobre os membros posteriores e os polegares, irritabilidade à luz, vento e som, paralisia e prostração. Dois deles apresentaram conjuntivite purulenta e um apresentou incontinência urinária. Nenhum sinal associado a raiva furiosa foi observado (Fotos 25, 26 e 27).

A perda de massa corpórea dos animais infectados foi acentuada nos dois dias anteriores à morte para a maioria dos animais, variando de 11,5% a 22,6% do peso do corpo. Três deles (H7, R12 e K12) estavam tão magros que não foi encontrada gordura marrom e em um deles (F12) a gordura marrom estava visivelmente diminuída. Entre os sobreviventes, 56,3% ganharam massa no fim do período de observação, e quando houve perda de massa corpórea, esta variou entre 4,1% e 11,2% do peso do corpo (Tabela 4).

Em dois morcegos inoculados com 1.000DL₅₀ICC, que morreram no 19º dia (A2) e 41º dia (B2), não foi observado nenhum sintoma associado a raiva. Não houve perda significativa de peso (1,2% e 1,1% da massa corpórea respectivamente) e nem decréscimo do consumo de sangue.

O animal F12, que morreu no 14º dia após inoculação com 100.000DL₅₀ICC, apresentou o menor período de incubação, em torno de 18 horas. Ele foi pesado e observado no dia anterior a sua morte e estava aparentemente bem. No dia seguinte ele estava prostrado, com acentuada

paralisia.

O consumo individual médio diário de sangue não sofreu alteração após inoculação do vírus rábico, os grupos infectados seguiram o mesmo padrão de consumo dos controles (Gráfico 2).

Nenhum dos animais apresentava título de AcN antes da inoculação. A maioria (97,2%), apresentou elevação no título de AcN 30 dias após a inoculação, independentemente da dose inoculada. O morcego A6 não apresentou aumento no título de AcN e manteve o título baixo durante todo o período. Apenas 52,7% dos animais atingiu o título de 0,5UI/ml, 30 dias após a infecção experimental. O título decrescia rapidamente e somente 34,5% deles mantinha o título acima de 0,5UI/ml no dia 90 (Tabela 5).

Animais que receberam as mais altas doses desenvolveram os mais altos títulos de AcN. Os quatro sobreviventes do grupo 100.000DL₅₀ICC apresentaram os mais altos títulos (2,2UI/ml-4,3UI/ml) no dia 90. Em contraste, somente três dos vinte e cinco sobreviventes dos outros grupos apresentaram títulos maiores que 1,0UI/ml. A diferença nos níveis de AcN desenvolvidos entre animais que receberam 100.000DL₅₀ICC e animais dos outros grupos foi significativa ($p=0,0002$). Não houve associação entre a sobrevivência do animal após inoculação com vírus rábico e o desenvolvimento de títulos maiores de 0,5UI/ml ($p=0,07$).

Doze fêmeas usadas na infecção experimental estavam prenhas, uma delas desenvolveu raiva (Y7) inoculada com 10.000DL₅₀ICC. Os cérebros de todos os fetos ou filhotes foram negativos quando analisados através das técnicas IFD e IC (Tabela 6).

Tabela 2. Dose letal 50%, mortalidade, incubação e morbidade em *Desmodus rotundus* experimentalmente infectados com vírus rábico por via intramuscular.

DL ₅₀ /CC	mortalidade(%)	morcego	período de incubação (dias)	quadro clínico	morbidade (horas)
100	0	-	-	-	-
1.000	20	A2 B2	19 41	-	? ?
10.000	20	H7 Y7	29 32	+	24
100.000	60	Q12 X12 Z12 K12 R12 F12	5 5 5 9 9 14	+	48
controle	0	-	-	+	24 18

Tabela 3: Infecção experimental de *Desmodus rotundus* com vírus rábico segundo teste diagnóstico.

DOSE (DI ₅₀ ICC)	morcego	IFD		ICC*		RT-PCR	
		cérebro	gland.salivar	cérebro	gland.salivar	cérebro	gland.salivar
1.000	B2	+	+	5/5	5/4	+	+
	A2	+	+	5/5	5/5	+	+
10.000	H7	+	+	5/5	5/1	+	+
	Y7	+	-	5/5	5/0	+	-
100.000	F12	+	-	5/5	5/1	+	+
	K12	+	+	5/5	5/0	+	+
	R12	+	-	5/5	5/0	+	-
	Z12	+	-	5/5	5/0	+	-
	X12	+	-	5/5	5/0	+	-
	Q12	+	-	5/5	5/0	+	+
sobreviventes	30	-	-	5/0	5/0	-	-
controle	10	-	-	5/0	5/0	-	-

* número de camundongos inoculados / número de camundongos mortos de raiva - IFD positiva

Tabela 4: Perda de massa corpórea de *Desmodus rotundus* infectados e de sobreviventes à inoculação com vírus rábico.

morcego	massa corpórea		massa corpórea perdida	
	dia da inoculação	dia da morte	(gramas)	%
infectados				
Q12	26,1	23,1	-3,0	-11,5
Z12	31,1	25,4	-5,7	-18,3
K12	26,1	21,3	-4,8	-18,4
F12	32,1	27,4	-4,7	-14,6
R12	30,1	23,3	-6,8	-22,6
X12	28,1	24,4	-3,7	-13,2
Y7*	35,1	34,7	-0,4	-1,1
H7	35,1	28,3	-6,8	-19,4
A2	34,5	34,1	-0,4	-1,2
B2	30,5	30,1	-0,4	-1,3
sobreviventes				
E2	28,5	27,3	-1,2	-4,2
O2	29,5	28,3	-1,2	-4,1
D3	30,1	27,3	-2,8	-9,3
M3	27,5	24,4	-3,1	-11,3
Y3	29,5	27,3	-2,2	-7,5
T3	27,1	24,3	-2,8	-10,3
S6	29,5	37,3	7,8	26,4
P4	26,5	27,3	0,8	3,0
O6	36,5	37,3	0,8	2,2
D7	30,1	36,1	6,0	19,9
F7	34,1	37,3	3,2	9,4
M7	36,1	34,3	-1,8	-5,0
E7	33,1	34,1	1,0	3,0
T12	24,1	27,4	3,3	13,7
U12	25,1	27,4	2,3	9,2

*prenha

As fêmeas prenhas ou com filhotes foram desconsideradas.

Gráfico 2: Média de consumo individual de sangue de *Desmodus rotundus*, antes e após a infecção experimental com vírus rábico.

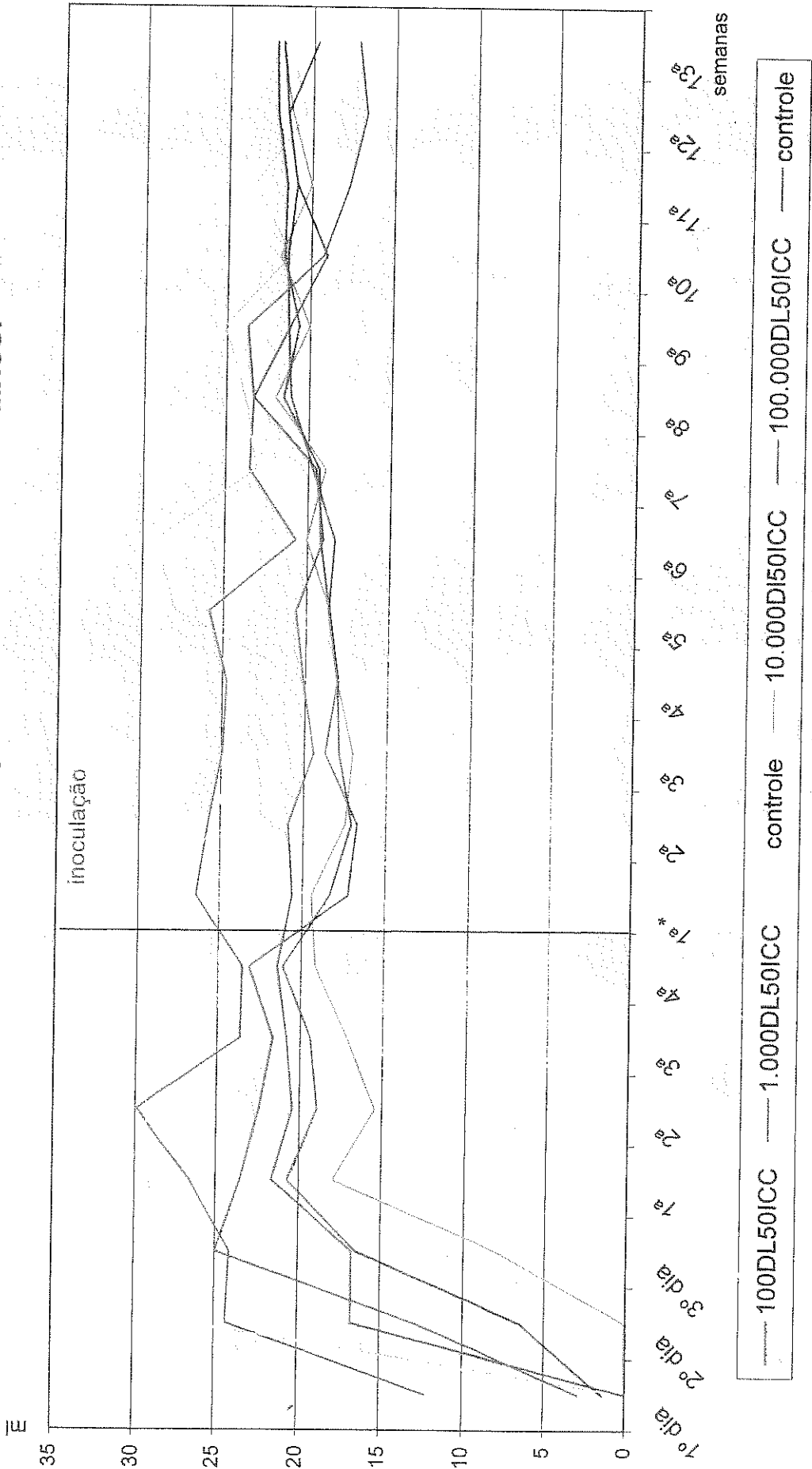


Tabela 5: Dosagem de anticorpos anti-rábicos em *Desmodus rotundus* antes e após infecção com vírus rábico.

dose	morcego	título de AcN			
		antes	30º dia	60º dia	90º dia
100 DL50ICC	K1	<0,13	0,78	0,26	0,26
	R1	<0,13	0,78	0,52	0,52
	X1	<0,13	0,52	0,52	1,07
	Z1	<0,13	0,52	0,26	0,26
	C6	<0,13	0,52	0,26	0,26
	E6	<0,13	0,39	0,26	0,13
	S6	<0,13	0,52	0,26	0,26
	T6	<0,13	1		
	A6	<0,13	0,13	0,26	0,26
	O6	<0,13	0,26	0,26	1,07
1000 DL50ICC	B2	<0,13	0,39	2	
	E2	<0,13	0,78	0,13	0,13
	A2	<0,13	3		
	O2	<0,13	0,39	0,13	0,13
	D3	<0,13	0,39	0,13	0,13
	M3	<0,13	0,39	0,2	0,13
	Y3	<0,13	0,26	0,2	0,13
	T3	<0,13	0,52	0,52	0,8
	P4	<0,13	0,52	0,52	0,52
	I4	<0,13	0,6	0,26	0,26
10.000DL50ICC	B7	<0,13	0,26	0,26	0,13
	D7	<0,13	0,26	0,26	0,13
	E7	<0,13	0,26	1,07	0,13
	F7	<0,13	0,52	0,52	0,13
	H7	<0,13	0,26	0,52	4
	I7	<0,13	>1,07	0,52	>1,07
	J7	<0,13	0,26	0,26	0,13
	M7	<0,13	0,26	0,52	<0,13
	N7	<0,13	0,26	0,52	0,13
	Y7	<0,13	0,26	0,26	4

Tabela 5: (continuação) Dosagem de anticorpos anti-rábicos em *Desmodus rotundus* antes e após infecção com vírus rábico.

dose	morcego	título de AcN			
		antes	30° dia	60° dia	90° dia
100.000DL50ICC	T12	<0,13	0,53	0,8	2,12
	W12	<0,13	0,8	>1,07	2,12
	C12	<0,13	0,8	>1,07	2,12
	U12	<0,13	0,4	0,4	4,28
	F12	<0,13	0,53	>1,07	⁴
	K12	<0,13	⁵		
	R12	<0,13	⁵		
	Z12	<0,13	0,8	⁴	
	X12	<0,13	0,8	⁴	
	Q12	<0,13	0,8	⁴	
controle	Q5	<0,13	0,13	0,13	0,13
	G5	<0,13	0,13	0,13	0,13
	V5	<0,13	0,13	0,13	0,13
	W9	<0,13	0,13	0,13	0,13
	Z9	<0,13	0,13	0,13	0,13
	C9	<0,13	0,13	0,13	0,13
	I9	<0,13	0,13	⁶	
	X9	<0,13	0,13	0,13	0,13
	Q9	<0,13	0,13	0,13	0,13
	R9	<0,13	0,13	0,13	0,13

¹eutanásia no dia 25 (T6) - IFD negativa

²morte no 41° dia após inoculação (B2)

³morto no 19° dia após inoculação (A2)

⁴título no dia da eutanásia (H7, Y7, Q12, Z12 e X12)

⁵morte no 9° dia sem coleta de sangue (R12 e K12)

⁶morto no dia 26 após inoculação - IFD negativa

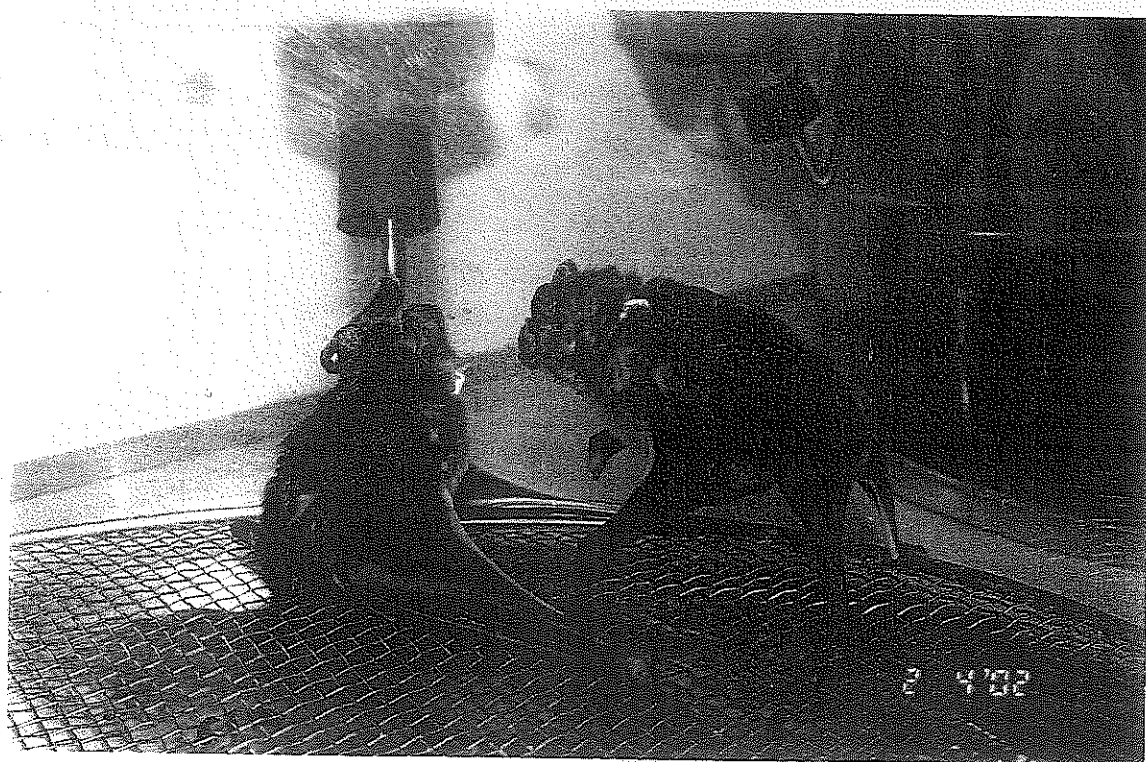
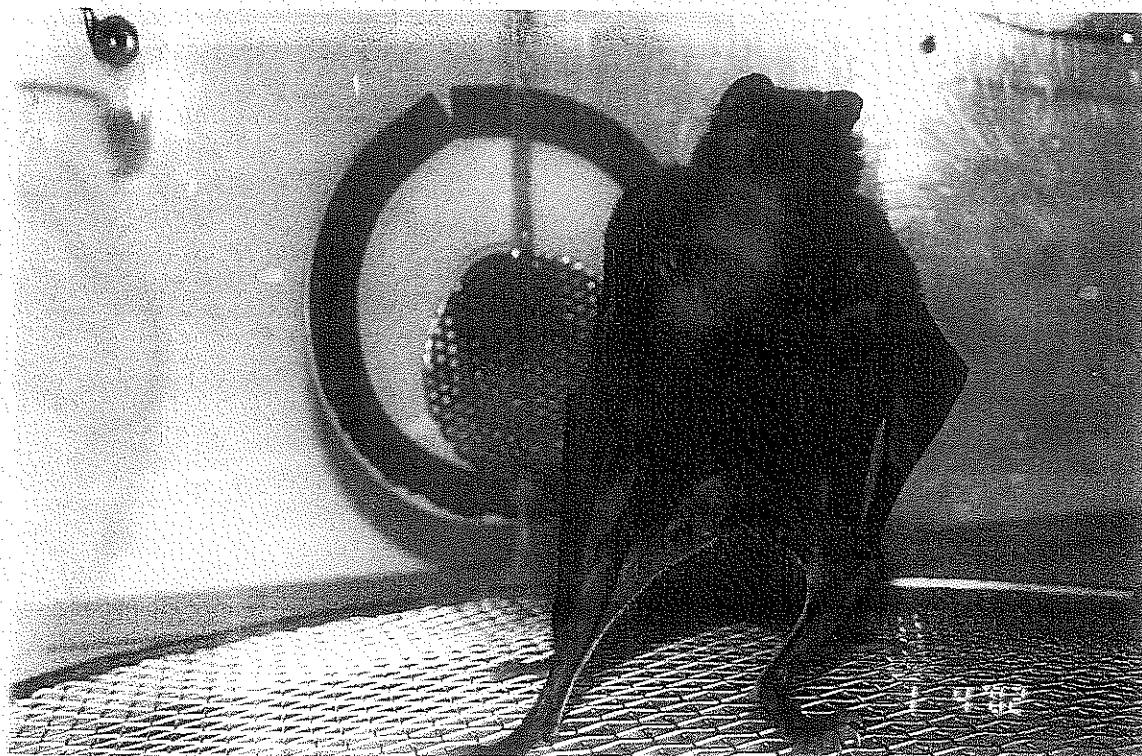
Tabela 6: IFD e ICC do cérebro dos fetos ou filhotes de fêmeas de *Desmodus rotundus* infectadas experimentalmente.

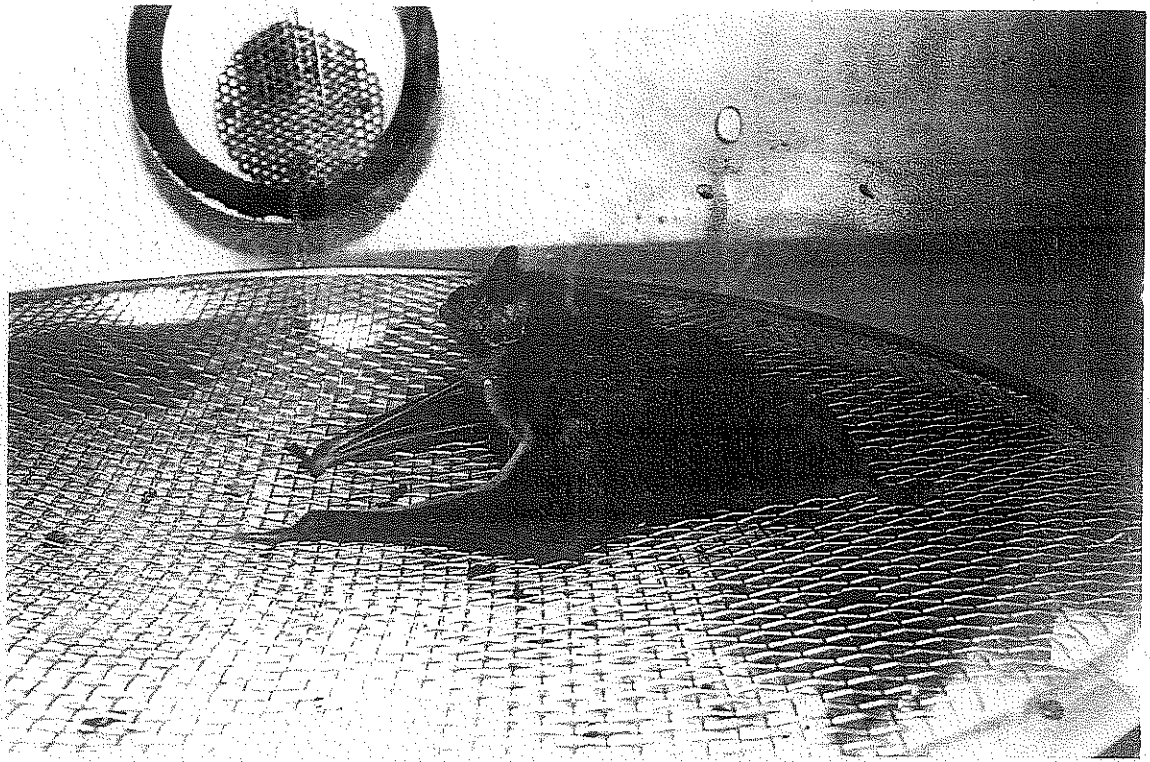
identificação	inoculação da mãe	IFD	ICC*
	DL50%ICC	cérebro	cérebro
feto de Z1	100	N	impossibilitado
feto de X1	100	N	5/4*
filhote de R1	100	N	5/5
feto de K1	100	N	5/5
feto de I 4	1000	N	5/2*
filhote de C6	100	N	5/5
feto de A6	100	N	5/5
feto de E6	100	N	5/5
feto de T6	100	N	5/5
filhote de J7	10.000	N	5/3*
filhote de I7	10.000	N	5/5

* número de camundongos inoculados / número de camundongos sobreviventes

Imunofluorescência Direta negativa dos camundongos mortos durante o período de observação

Fotos 25, 26 e 27 – Quadro clínico em *Desmodus rotundus* infectados com vírus rábico.





VACINAÇÃO

IMUNOGENICIDADE DA VIA ORAL ATIVA

A sobrevivência, após desafio, dos animais vacinados diretamente na boca com 0,25ml, 0,75ml, 1,25ml, 2,0ml e 3,5ml foi de 14%, 25%, 42%, 66% e 100% respectivamente (Gráfico 3). O período de incubação foi de 5 a 19 dias (média de 6,9 dias) e o período de morbidade variou de 24 a 48 horas. O morcego W13, vacinado com 0,25ml apresentou o maior período de incubação, 19 dias (Tabela 7).

O vírus rábico foi detectado pela técnica IFD do cérebro de todos os animais infectados. Todos os sobreviventes foram negativos.

Os 18 morcegos que morreram de raiva, apresentaram quadro clínico associado a raiva parálitica, os mesmos citados para a infecção experimental. Nenhum sintoma associado a raiva furiosa foi observado.

A perda de massa corpórea durante os dias anteriores a morte foi acentuada, para a maioria dos animais, como já havia ocorrido na infecção experimental, variando de 7,5% a 31,5% da massa do corpo. Entre os morcegos infectados somente o W13, que apresentou o maior período de incubação, ganhou massa corpórea, 24,5% (Tabela 8).

Nenhum dos animais usados no experimento apresentava título de AcN antes da vacinação. A maioria (94,7%) apresentou aumento de título 24 dias após a vacinação, porém apenas 26,3% deles atingiu o título de 0,5UI/ml. Após o desafio 92,1% dos animais atingiu títulos acima de 0,5UI/ml e 80% dos sobreviventes mantinha esses títulos no dia 90 (Tabela 9).

TRANSMISSIBILIDADE DA PASTA

A pasta era aplicada apenas no dorso do animal, entretanto algumas horas depois, o corante estava distribuído pelo corpo (patas, polegar, pelo do peito, etc.). Em outros animais o corante ficava restrito a poucas regiões do corpo ou nenhum sinal do corante era observado (Fotos 28 e 29).

Foi observado perda da pasta aplicada ao dorso do animal quando ele esbarrava na parede da gaiola, quando fazia movimentos bruscos ou quando a consistência da pasta não era adequada e escorria do dorso do animal. Essa perda não pode ser quantificada (Fotos 30 e 31).

Após 24 horas todos os animais dos dois grupos de 7 animais apresentaram sinais do corante no pelo do corpo, nas fezes e urina e estes

sinais ainda estavam presentes 48 horas após aplicação da pasta com corante (Fotos 32 e 33) .

Nenhuma lesão ou sinal de reação a pasta ou ao corante foi observada, como perda de pelo no local da aplicação, irritação, prurido, enregelamento, hematoma, etc. Todos os animais foram sacrificados saudáveis. O diagnóstico de raiva pela técnica IFD do cérebro dos animais foi negativa.

VACINA VIA PASTA

Nos oito grupos de 7, 7, 7, 7, 7, 9, 9 e 10 morcegos *Desmodus rotundus* que receberam vacina via pasta, a sobrevivência pós desafio foi de 42,8%(A), 71,4%(B), 57,1%(C), 57,1%(D), 62,5%(E), 71,4%(F), 55,5%(G) e 60%(H) (Gráfico 4). O período de incubação foi de 5 a 15 dias (média de 6,8 dias) e o período de morbidade variou de 18 a 48 horas (Tabela 10).

A pasta a base de vaselina usada nos dois primeiros grupos (A e B), embora apresentasse consistência firme, não escorrendo do dorso do animal, não absorvia totalmente a quantidade de vacina. Por isso foi trocada nos grupos posteriores para pasta a base de glicerina que absorvia quantidades maiores de vacina, mas não apresentava consistência final adequada. Houve maior perda de pasta nos grupos C, F e G.

O vírus rábico foi detectado pela técnica IFD do cérebro de todos os animais infectados. Todos os sobreviventes foram negativos.

Todos os morcegos que morreram de raiva, apresentaram quadro clínico associado à raiva paralítica, os mesmos citados para a infecção experimental. Nenhum sintoma associado à raiva furiosa foi observado.

A perda de massa corpórea durante o período de morbidade foi acentuada para a maioria dos animais, como já havia ocorrido na infecção experimental e na vacinação via esofágica (Tabela 11).

Nenhum dos animais usados no experimento apresentava título de AcN antes da vacinação. A maioria (71,7%) apresentou aumento de título 24 dias após a vacinação, porém apenas 20% deles atingiu o título de 0,5UI/ml. Após o desafio, 79,3% dos animais atingiu títulos acima de 0,5UI/ml e 57,1% dos sobreviventes manteve esses títulos no dia 90 (Tabela 12).

Nenhuma lesão associada ao vírus vaccinia foi observada no músculo dorsal nos dias posteriores a administração da pasta com vacina V-RG.

Quatro (26,6%) dos quinze animais que receberam a pasta com vacina e corante no dorso, morreram de raiva.

Gráfico 3: Sobrevivência (%) de morcegos *Desmodus rotundus* vacinados contra raiva, via oral, e desafiados com vírus rábico (10^5 DL₅₀ ICC).

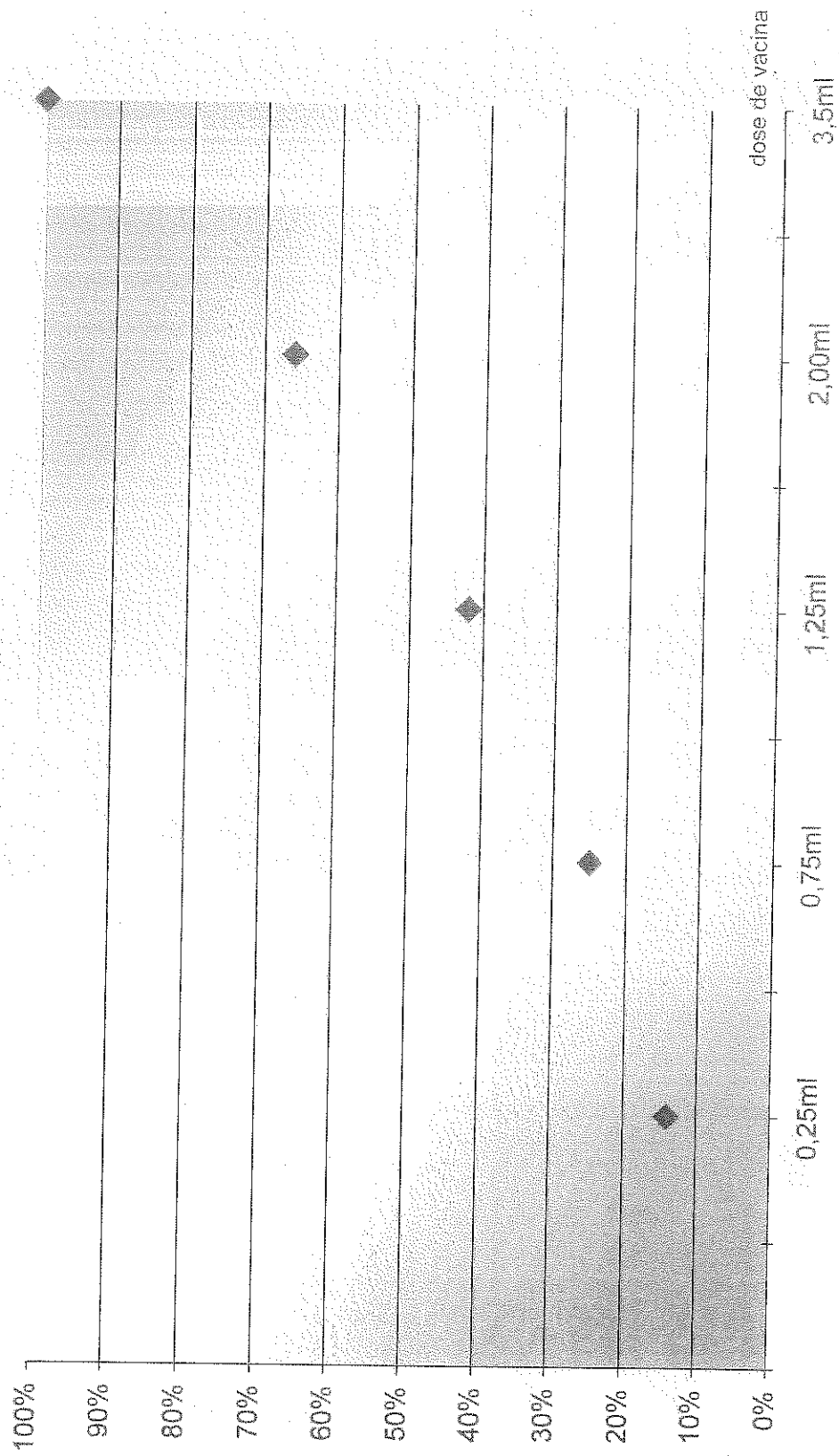


Tabela 7: Dose de vacina, incubação, morbidade e sobrevivência de *Desmodus rotundus* vacinados contra raiva, via oral e desafiados com vírus rábico $10^5 \text{DL}_{50} \text{CC}$

dose vacina	nº animais vacinados e desafiados	período de incubação (dias)	período de morbidade (horas)	sobrevivência
0,25ml	7	5 a 19		14%
0,75ml	8	6 a 8		25%
1,25ml	7	6 a 8	24 a 48	42%
2,00ml	6	6		66%
3,5ml	10	-		100%

Tabela 8 : Perda de massa corpórea de *Desmodus rotundus* vacinados contra raiva, via oral, e desafiados com vírus rábico 10^6 DL₅₀/CC

MORCEGO	DOSE VACINA	MASSA CORPÓREA		MASSA PERDIDA	
		dia desafio	dia morte	gramas	%
R13	0,25ml	32,4	29,5	-2,9	-9,0
I13		30,4	26,5	-3,9	-12,8
G13		31,4	25,5	-5,9	-18,8
U13		33,4	27,4	-6	-18,0
A13		30,4	24,4	-6	-19,7
W13		29,4	36,6	7,2	24,5
B14	0,75ml	27,4	25,5	-1,9	-6,9
I14		29,4	24,5	-4,9	-16,7
A14		26,4	22,5	-3,9	-14,8
P14		32,4	27,5	-4,9	-15,1
H14		28,4	24,5	-3,9	-13,7
S14		29,4	22,4	-7	-23,8
T15	1,25ml	25,4	19,5	-5,9	-23,2
M15		25,4	23,5	-1,9	-7,5
N15		28,4	22,5	-5,9	-20,8
Z15		26,4	19,9	-6,5	-24,6
L16	2,0ml	25,4	23,4	-2	-7,9
S16		31,4	21,5	-9,9	-31,5

Tabela 9. Título de AcN em *Desmoxidus rotundus* antes e após vacinação anti-rábica e desafio com vírus rábico.

dose	morcego	antes	24 dias/2dias*	dia da eutanásia	20º dia	90º dia
0,25ml	C13	<0,13	0,52		2,12	0,4
	U13	<0,13	0,26	1,5		
	I13	<0,13	0,2	1,6		
	W13	<0,13	0,2	1,06		
	R13	<0,13	0,52	1,6		
	A13	<0,13	0,13	2,1		
	G13	<0,13	0,26	0,8		
	J14	<0,13	0,2		>4,24	1,2
	K14	<0,13	0,26		0,52	0,6
0,75ml	H14	<0,13	0,26			
	B14	<0,13	0,52	1,6		
	A14	<0,13	0,26	1,6		
	P14	<0,13	0,26	1,6		
	S14	<0,13	0,26	4,2		
	I14	<0,13	0,26	1,6		
	M15	<0,13	0,26	1,6		
	T15	<0,13	0,2	1,6		
	Z15	<0,13	0,4	4,2		
1,25ml	N15	<0,13	0,4	1,6		
	Y15	<0,13	0,26		2,12	3,2
	P15	<0,13	0,26		2,12	2,4
	D15	<0,13	1,6		2,12	1,2
	N16	<0,13	0,8		>4,24	3,2
	D16	<0,13	0,4		2,12	0,4
	X16	<0,13	1,07		2,12	3,2
	C16	<0,13	0,4		2,12	3,2
	S16	<0,13	0,2	1,6		
2,00ml	L16	<0,13	0,13	0,4		
	R21	0,07	>0,8		1,02	3,5
	V21	0,07	0,2		0,52	3,5
	Z21	0,07	0,2		0,4	0,8
	J21	0,07	0,2		0,52	0,8
	K20	0,07	0,8		1,02	1,5
	C20	0,07	0,26		0,14	0,52
	T20	0,07	0,2		0,52	0,8
	N20	0,07	0,52		0,52	1,5
3,5ml	D20	0,07	0,2		0,52	0,2
	B20	0,07	0,52		1,02	1,5

*24 dias após a vacinação/2 dias antes do desafio

Gráfico 4: sobrevivência (%) de *Desmodus rotundus* após aplicação de pasta com vacina anti-rábica e desafio com vírus rábico (10^5 DL₅₀/CC).

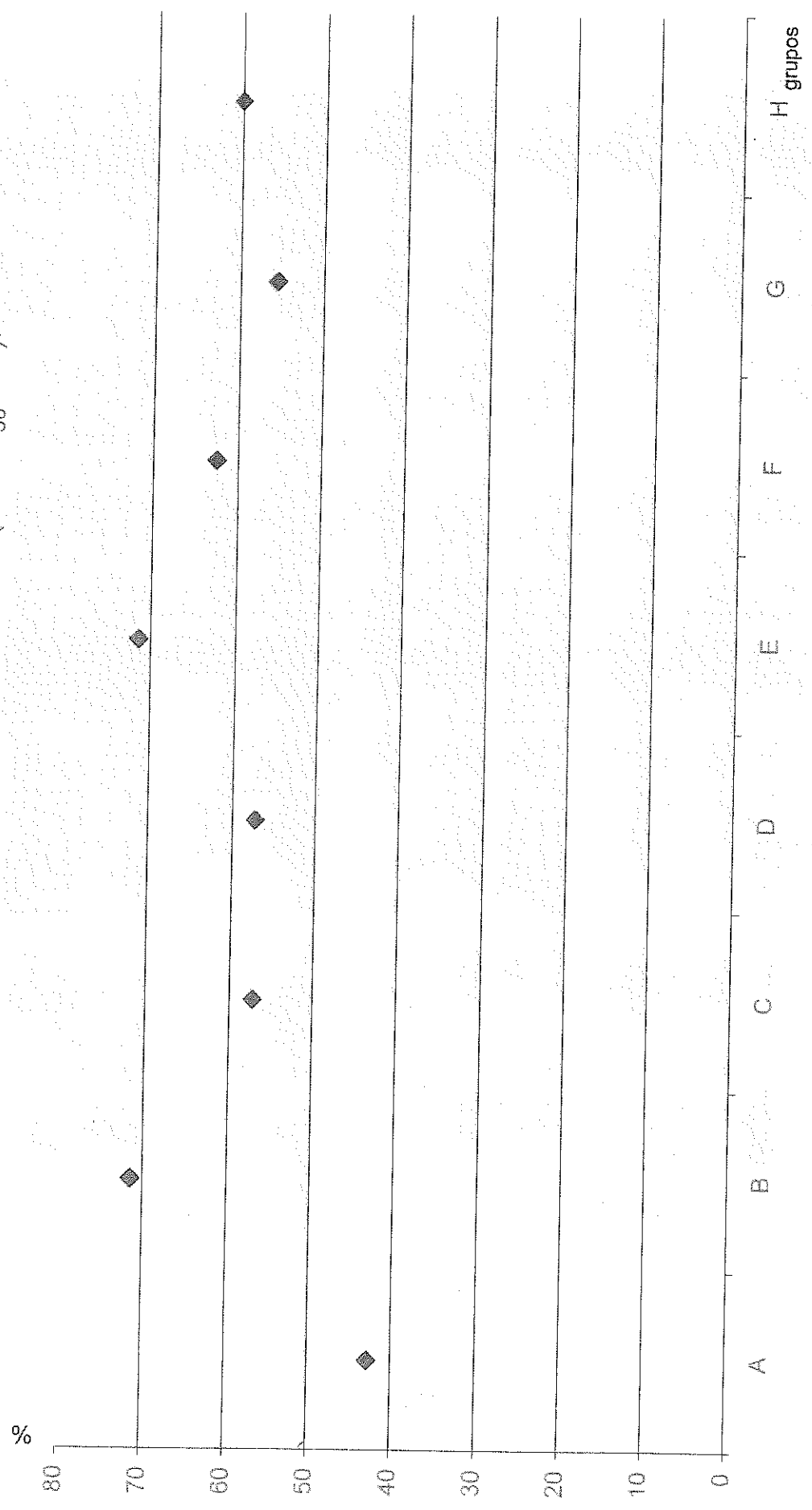


Tabela 10: Sobrevivência de *Desmodus rotundus* após aplicação da pasta com vacina anti-rábica e desafio com vírus rábico (10^5 DL₅₀ICC)

dose	morcego	sobrevivência	p.i.(dias)	p.m(horas)
vacina 9xC (A)	R8	42,8%	6	24
	T8			
	Q8*		6	24
	P8			
	N8			
	S8			
	F8			
vacina 9xC (B)	S18	71,4%	7	24
	X18			
	M18*			
	U18		11	18
	D18			
	G18*			
vacina 9xC (C)	V11	57,1%	5	24
	F22			
	U22		5	48
	E22			
	B22*			
	S22			
	Y22			
N22	9	24		
vacina 9xC (D)	O24	57,1%	5	48
	C24			
	E24		5	48
	F24*			
	I24			
	Y24*			
K24	5	24		
vacina 9xC (E)	N27	71,4%	6	24
	B27			
	D27		5	24
	T27			
	P27			
	G27			
	E27			

Tabela 10 (continuação): Sobrevivência de *Desmodus rotundus* após aplicação da pasta com vacina anti-rábica e desafio com vírus rábico (10^5 DL₅₀/CC)

dose	morcego	sobrevivência	p.i.(dias)	p.m(horas)
vacina 18C (F)	Q26	62,5%	5	48
	S26			
	E26*			
	I26			
	R26			
	Y26*		5	48
	Z26**			
	B26			
	M26		5	48
vacina 18xC (G)	Y23*	55,5%	5	24
	W23			
	A23			
	N23			
	J23		10	24
	H23			
	V23			
	L23		5	48
	Z23	5	24	
vacina 18xC (H)	G25*	60%		
	K25			
	C25			
	O25			
	Y25		8	24
	E25			
	R25		5	24
	L25		8	24
	X25		11	18
			M25*	

* animal que recebeu no dorso pasta com vacina e corante

** animal morto depois da vacinação e antes do desafio / IFD cérebro negativa

Tabela 11: Perda de massa corpórea em *Desmodus rotundus* vacinados contra raiva, via pasta e desafiados com vírus rábico 10^5 DL₅₀ICC

MORCEGO	MASSA CORPÓREA		MASSA PERDIDA		obs.
	dia desafio	dia morte	gramas	%	
M18	37,4	28,2	-9,2	-24,6	
V18	30,4	24,4	-6	-19,7	
S8	30,4	25,4	-5	-16,4	
F8	19,4	17,4	-2	-10,3	
T8	30,4	23,1	-7,3	-24,0	
N8	31,4	25,4	-6	-19,1	
F22	43,8	34,2	-9,6	-21,9	prenha
B22	42,8	36,2	-6,6	-15,4	prenha
N22	34,8	27,2	-7,6	-21,8	
Z23	40,8	39,2	-1,6	-3,9	prenha
L23	44,8	43,2	-1,6	-3,6	prenha
W23	30,8	26,2	-4,6	-14,9	
J23	33,8	25,2	-8,6	-25,4	
I24	32,8	28,2	-4,6	-14,0	
O24	42,8	38,2	-4,6	-10,7	prenha
K24	38,8	27,2	-11,6	-29,9	
Y26	36,8	32,2	-4,6	-12,5	
Q26	26,8	26,2	-0,6	-2,2	
M26	37,8	33,2	-4,6	-12,2	prenha
X25	33,4	28,9	-4,5	-13,5	
Y25	35,4	27,9	-7,5	-21,2	
L25	34,4	27,9	-6,5	-18,9	
R25	33,9	28,9	-5	-14,7	
B27	26,9	23,8	-3,1	-11,5	
N27	26,9	20,9	-6	-22,3	

Tabela 12: Anticorpos anti-rábicos em *Desmodus rotundus* antes e após aplicação da pasta com vacina anti-rábica e desafio com 10^5 DL₅₀/CC de vírus rábico.

dose	morcego	antes	vacinação		depois do desafio	
			24dias	sacrifício	25dias	91 dias
vacina 9xC (A)	R8	<0,13	1		1	0,8
	T8	<0,13	1	3,2		
	Q8*	<0,13	0,4		1	1,56
	P8	<0,13	0,8		2,4	3,1
	N8	<0,13	0,2		3,2	
	S8	<0,13	3,2	3,2		
	F8	<0,13	3,2	3,2		
vacina 9xC (B)	S18	<0,13	0,26		1,2	0,8
	X18	<0,13	0,52		2,4	1,56
	M18*	<0,13	1,07	3,2		
	U18	<0,13	0,52		1	0,4
	D18	<0,13	0,52		0,4	2,08
	G18*	<0,13	2,12		1,6	0,52
	V11	<0,13	0,8	3,2		
vacina 9xC (C)	F22	<0,13	<0,13	0,56		
	U22	<0,13	<0,13		2,08	0,26
	E22	<0,13	0,13		0,4	0,13
	B22*	<0,13	0,13	1,02		
	S22	<0,13	0,2		0,52	0,52
	Y22	<0,13	<0,13		4,16	0,4
	N22	<0,13	<0,13	1,02		
vacina 9xC (D)	O24	<0,13	0,2	1,02		
	C24	<0,13	<0,13		1,04	0,4
	E24	<0,13	0,2		2,08	0,8
	F24*	<0,13	0,2		2,08	0,13
	I24	<0,13	c/filhote	0,14		
	Y24*	<0,13	0,2		1,04	0,26
	K24	<0,13	<0,13	1,02		
vacina 9xC (E)	N27*	<0,13	0,2	2,08		
	B27	<0,13	0,52	0,13		
	D27*	<0,13	0,4		0,8	4,26
	T27	<0,13	0,13		0,13	0,2
	P27	<0,13	0,13		1,02	3,2
	E27	<0,13	0,52		0,8	1,6
	G27	<0,13	0,26		0,8	3,2

Tabela 12 (continuação): Anticorpos anti-rábicos em *Desmodus rotundus* antes e após aplicação da pasta com vacina anti-rábica e desafio com 10^5 DL₅₀ICC de vírus rábico.

dose	morcego	vacinação		depois do desafio		
		antes	24dias	sacrifício	25dias	91 dias
vacina 18xC (E)	Q26	0,07	0,8	1,02		
	S26	0,07	0,2		4,16	0,52
	E26*	0,07	0,2		1,5	0,13
	I26	0,07	<0,13		1,04	0,52
	R26	0,07	<0,13		4,16	0,52
	Y26*	0,07	<0,13	0,56		
	Z26**	0,07				
	B26	0,07	0,2		0,52	1,02
vacina 18xC (F)	M26	0,07	0,4	1,02		
	Y23*	0,07	0,13		0,26	² 0,13
	W23	0,07	<0,13	1,02		
	A23	0,07	0,2		1,04	0,26
	N23	0,07	0,13		0,52	0,26
	J23	0,07	0,2	1,02		
	H23	0,07	0,2		0,26	0,13
	V23	0,07	0,2		1,04	0,13
vacina 18xC (G)	L23	0,07	0,2	0,28		
	Z23	0,07	0,2	1,02		
	G25*	0,13	0,2		1	1
	K25	<0,13	0,13		0,13	<0,13
	C25	<0,13	0,26		0,8	4,26
	O25	1	0,2		0,52	0,8
	Y25	0,13	0,26	6,2		
	E25	0,13	0,4		0,52	1,06
	R25	0,13	0,2	0,8		
L25	<0,13	0,26	0,4			
X25	<0,13	0,2	1,5			
M25*	<0,13	0,4		0,26	<0,13	

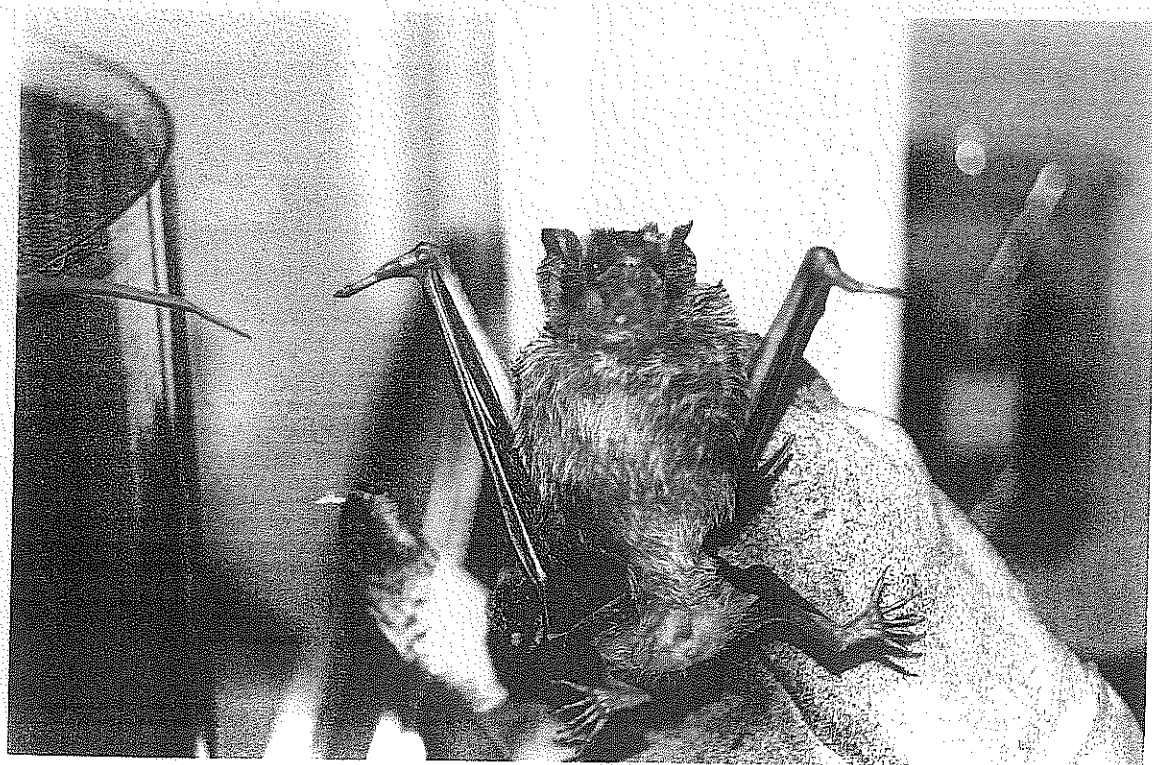
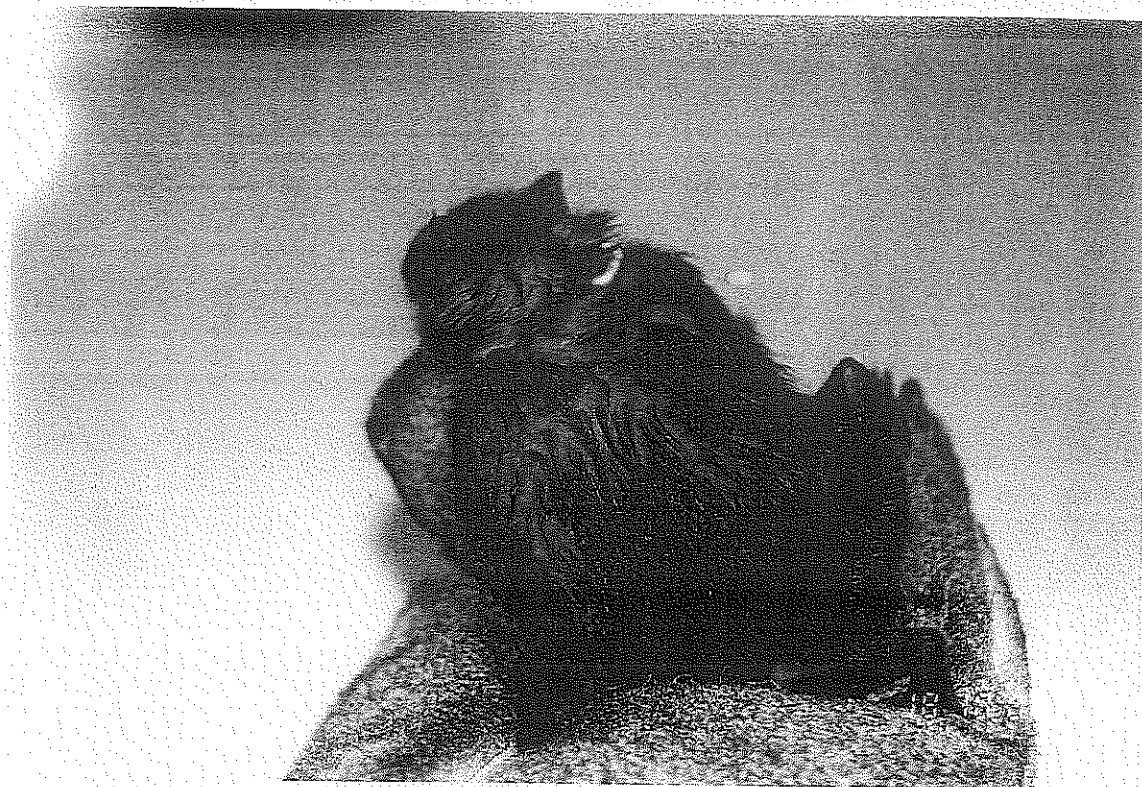
* animal que recebeu no dorso pasta com vacina e corante

¹ hemólise/soro insuficiente

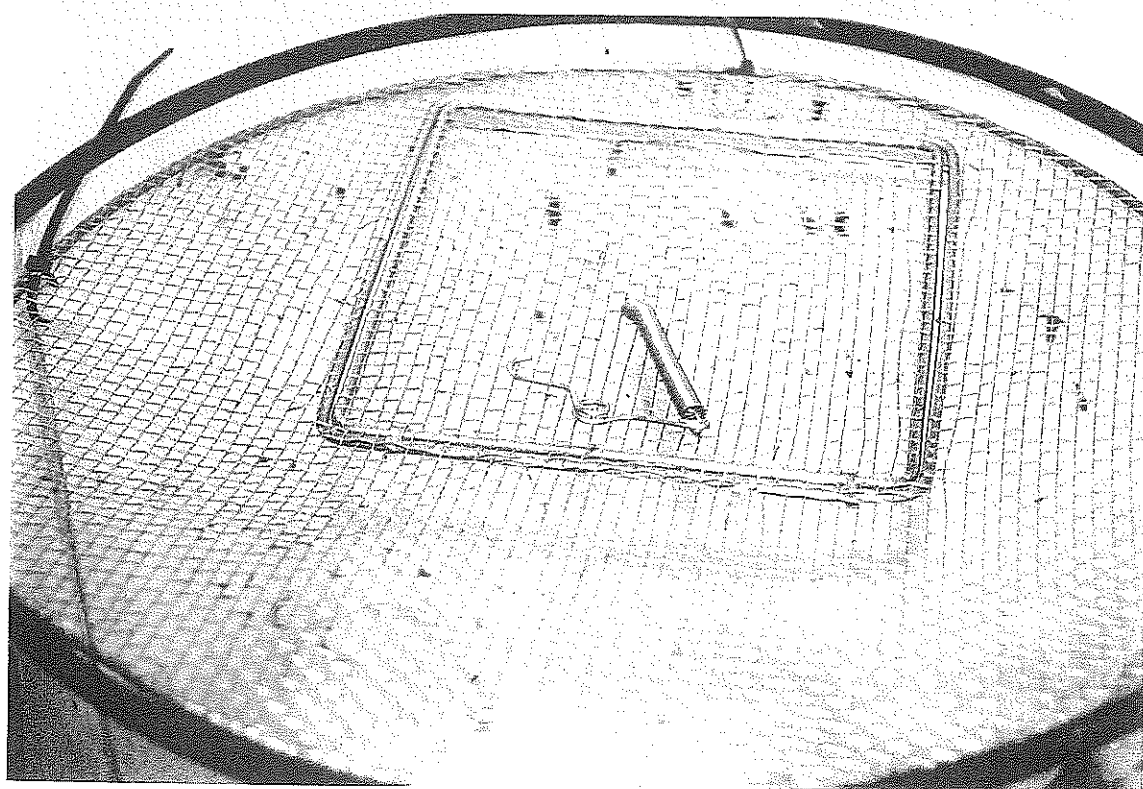
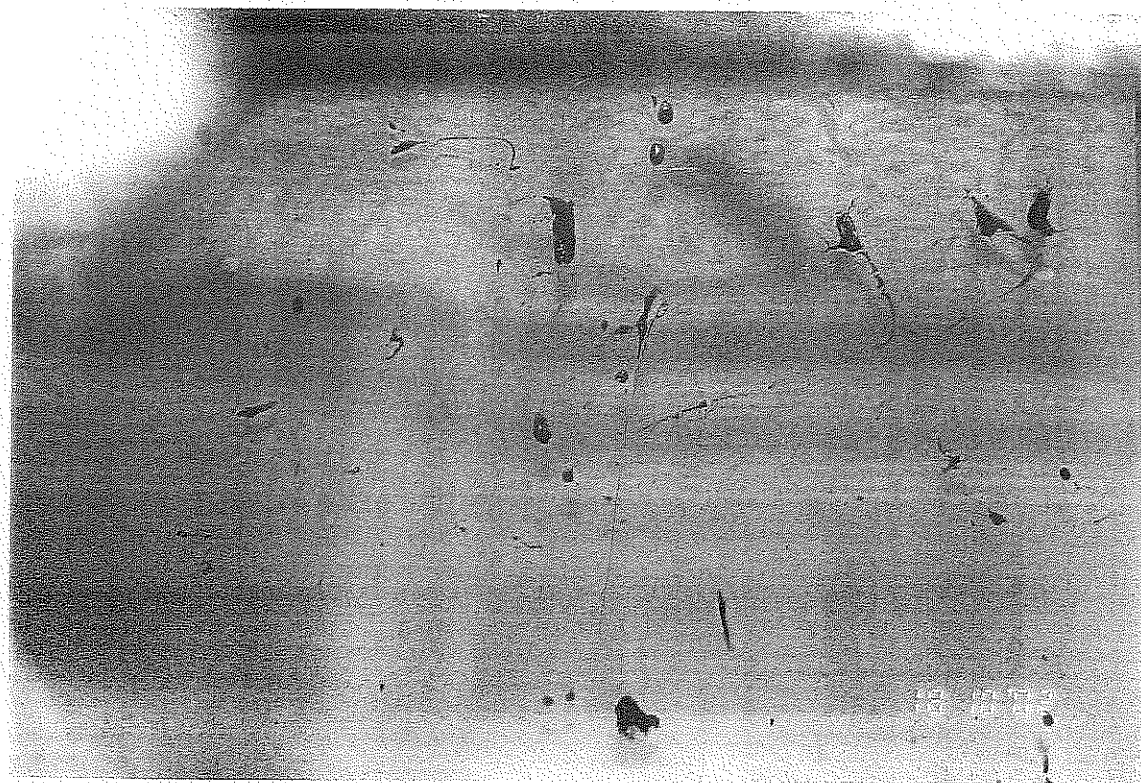
** morto 5 dias após a vacinação - IFD cérebro negativa

² morreu 30 dias após o desafio - IFD cérebro negativa

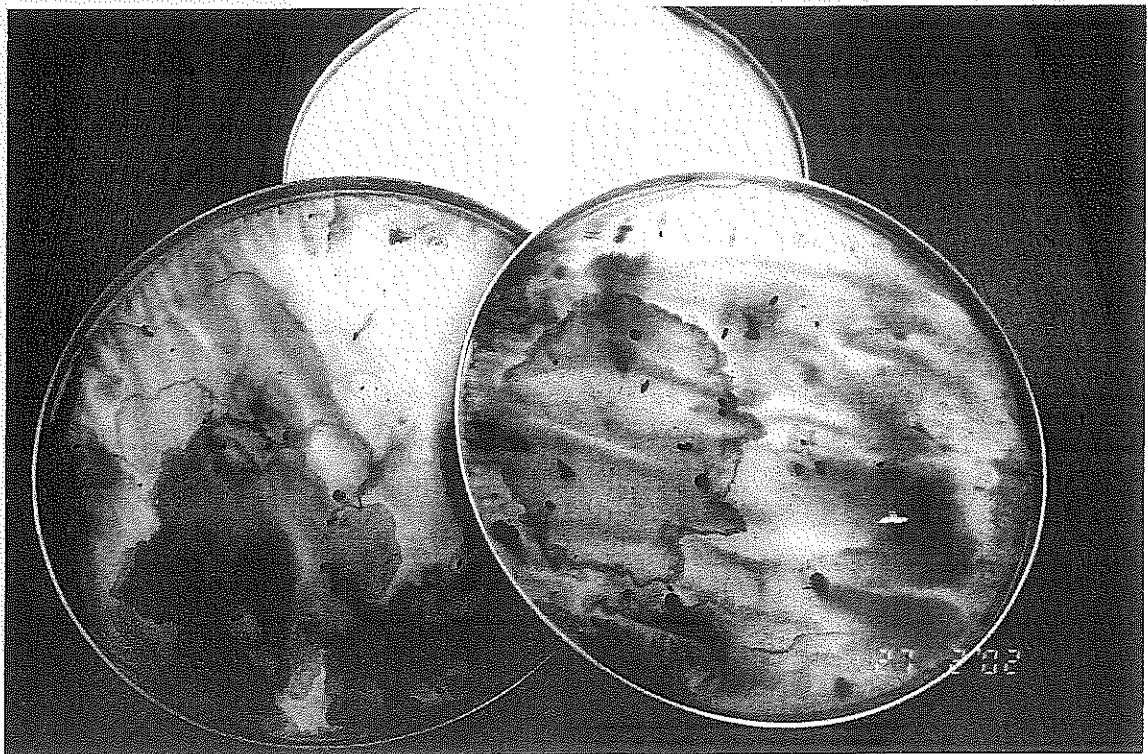
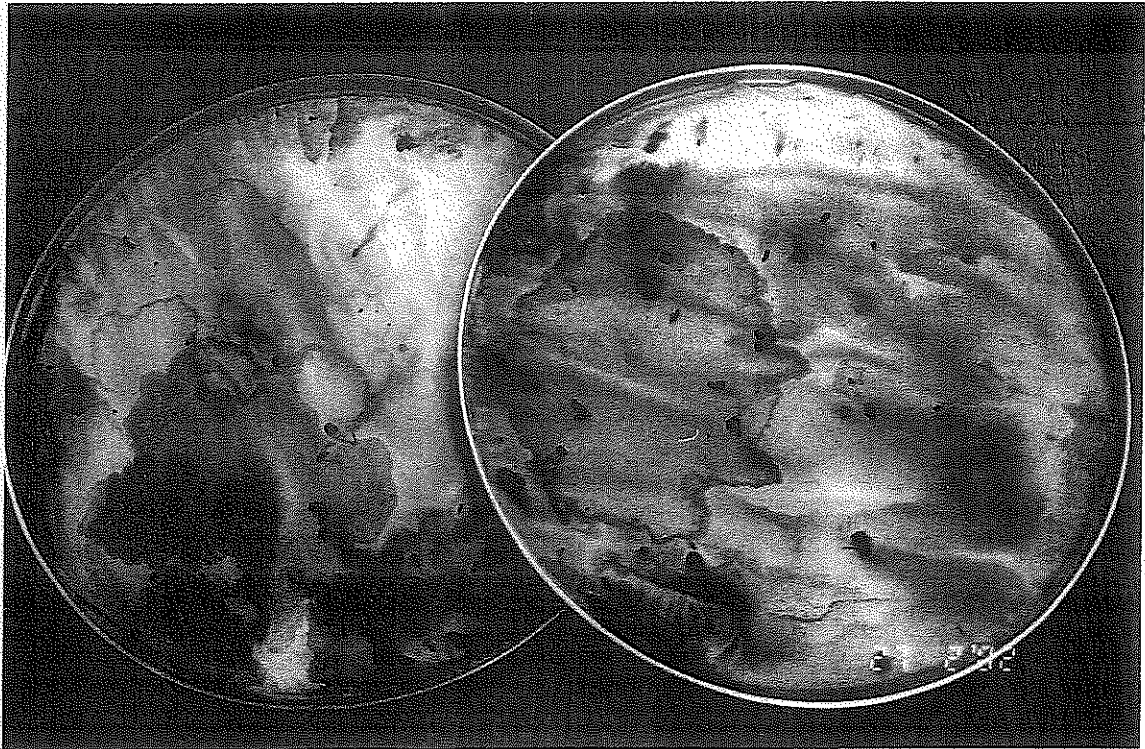
Fotos 28 e 29 - Corante distribuído pelo corpo, 24 horas após aplicação da pasta com vacina e corante



Fotos 30 e 31 - Perda de pasta com vacina e corante aplicada ao dorso do animal.



Fotos 32 e 33 - Eliminação da pasta com vacina e corante nas fezes e urina dos animais.



Discussão

CATIVEIRO

Conforme observado por Baer e Mclean (1971), as incisões provocadas para coleta de sangue cicatrizavam completamente em menos de 24 horas. O sangue para de fluir rapidamente da incisão, exigindo muitas vezes, mais de uma incisão para se obter 0,2 a 0,3 ml de sangue. Durante todo o experimento foram realizadas mais de 500 coletas de sangue e apesar do(s) hematoma(s) formado(s) no local da incisão, que desaparece em dois ou três dias, apenas um acidente ocorreu com a morte de um animal, machucado no asa/polegar durante a contenção. Dois animais tiveram problemas para cicatrização e ainda apresentavam hematomas uma semana após a coleta de sangue.

Os grupos de animais foram mantidos em cativeiro em aparente bom estado de saúde por no mínimo 4 meses ate mais de um ano. Tudo indica que poderiam ser mantidos em cativeiro por vários anos caso fosse necessário para estudo, confirmando a longevidade desses animais em cativeiro e a adaptação ao modelo de gaiola.

Foi feita opção por bebedouros externos e tampas inferiores e superiores removíveis porque dessa forma não seria necessário abrir as gaiolas diariamente para colocar e retirar o alimento, ou para higiene, o que diminui o estresse para os animais por manipulação desnecessária. Os bebedouros externos asseguram as condições sanitárias do alimento e são preferíveis a placas de petri ou tigelas, usadas em outros cativeiros (Winsatt e Guerrieri, 1962). O papel de filtro usado para absorver parte das fezes, urina e resto de sangue era trocado diariamente.

A identificação dos animais com um cubo com letras coloridas pendurado a anilha foi feita de forma a facilitar a retirada e observação de um animal específico do grupo quando necessário. A anilha de nylon apresentou melhores resultados que a anilha metálica com um numero menor de reações inflamatórias local. Quando a reação era observada, a anilha era retirada e as feridas cicatrizavam em dois ou três dias. As reações ocorriam, em geral, após um mês de uso das anilhas e muitas vezes estavam relacionadas ao cubo e não a anilha.

A taxa de mortalidade de *D.rotundus* em cativeiro é alta, por volta de 40% (Elizabeth Loza Rubio-comunicação pessoal). Em nosso cativeiro a mortalidade foi de 19,8%. A taxa de mortalidade esta relacionada a fatores internos ao cativeiro como por exemplo o número de animais por gaiola levando a uma maior competição por alimento, ou o animal ter feito repasto na noite anterior a captura e a fatores externos como as condições de captura, chuva, distancia do abrigo ao cativeiro, temperatura ambiente, etc.

A insuflação e exaustão do ar feita no interior das gaiolas foi aplicada

considerando a possibilidade de formação de aerossóis como demonstrado por Constantine (1962 e 1967) e as altas doses de vírus rábico que seriam usadas na infecção experimental e para desafio após vacinação. Além disso, o sistema de exaustão diminuía sensivelmente o cheiro característico das fezes e urina dos animais, permitindo a observação "in loco" quase sem desconforto para o pesquisador.

Inicialmente, o número de animais mantidos por gaiola era pequeno e progressivamente foi aumentado (2 a 15), para estabelecer o número adequado de animais por gaiola. Foi possível manter 15 animais em uma gaiola, mas oito a dez animais por gaiola pareceu ser o número ideal. Nessa condição dois bebedouros são suficientes, se mais animais são mantidos na gaiola, três ou quatro bebedouros são necessários. Esse cuidado é importante considerando que na natureza a obtenção de alimento é uma performance individual. Entretanto em uma gaiola coletiva o animal deve aprender a dividir o alimento, a disputa pelo bebedouro com brigas é inevitável e pode reduzir o consumo de alimento dos animais mais jovens, fracos ou submissos.

A escolha da temperatura da sala (19-24°C) e da quantidade de sangue oferecida (20 a 30ml) foi feita considerando estudos em cativeiro realizados com *D.rotundus* por Winsatt e Guerrieri (1961 e 1962). Entretanto em poucas ocasiões a temperatura chegou a 26°C sem que houvesse decréscimo da aceitação de alimento.

Em poucas ocasiões, por razões operacionais, nos precisamos reduzir a quantidade oferecida por dois ou três dias. Aparentemente os animais podem sobreviver com quantidades menores desde de que não menos que o mínimo necessário e por pequenos períodos. Normalmente o alimento foi oferecido ao entardecer, mas ocasionalmente foi oferecido em outros horários, sem decréscimo do consumo.

Em nosso cativeiro como descrito na literatura (Ditmars e Greenhall, 1935; Winsatt, 1969, Bush, 1988, Nowak, 1991), os morcegos se alimentam rapidamente. Em 10 a 30 minutos os bebedouros estão vazios. O consumo diário individual médio de sangue foi de 20,1ml, mas alto do que o relatado na literatura para grupos de 8 a 20 indivíduos (15 a 16ml). O consumo médio diário para grupos de 2 a 4 indivíduos foi de 25,3ml, também mais alto do que o relatado na literatura (21,4ml). Quando morcegos são mantidos em pequenos grupos ou isolados, o consumo diário de sangue tende a ser mais alto, porque não há competição pelo alimento ou a competição é menor (Winsatt e Guerrieri, 1962).

Em cativeiro *D.rotundus* consomem mais da metade do seu peso em sangue em uma noite (Winsatt e Guerrieri, 1962). No nosso cativeiro o consumo individual diário de sangue foi equivalente a 71% (machos) e 60% (fêmeas não prenhas), da massa corpórea do animal. Bush (1988) calculou

o consumo de sangue de machos em 59,5% (+/- 4,1%) da massa do corpo em uma noite, com variação entre 42,9% e 78,7%.

Nos primeiros dias água foi oferecida, mas permanecia intocada e não foi mais oferecida. De acordo com Winsatt e Guerrieri (1961), o sangue desfibrinado oferece toda água necessária para os animais, porém segundo Busch (1988), os morcegos consomem 38% menos sangue quando água é oferecida.

Na primeira semana de cativeiro, os morcegos não se alimentam quando a luz da sala está acesa ou na presença de pessoas, mas após alguns dias eles aceitam alimento nessas condições. Normalmente os morcegos comem imediatamente após o alimento ser oferecido, somente dois grupos de sete e oito machos nunca aceitaram alimento na presença de pessoas ou em ambiente iluminado, mesmo após cinco e seis meses de cativeiro respectivamente. Quando o alimento era oferecido eles aguardavam a luz ser apagada e a saída das pessoas, então eles desciam mas estavam sempre alertas e na presença do menor som, eles voltavam para a tela superior. Mas esse era um comportamento incomum, em geral, a maioria dos grupos mostrava boa adaptação e na hora da alimentação eles desciam da tela superior e aguardavam próximos ao local onde o bebedouro era colocado, já disputando o lugar uns com os outros.

Fêmeas adultas, não prenhas, pesaram mais que machos adultos conforme esperado, com massa corpórea variando entre 30,6g e 38,7g, média de 33,4g, mas alto do que o relatado por Winsatt e Guerrieri (1969), entre 29g e 33g. Entre os machos a média de massa corporal de 28,6g, com variação entre 25,4g e 30,5g foi próxima ao relatado por Bush (1988), 30,1g.

O alumínio das telas se mostrou resistente aos efeitos das excretas dos morcegos. As fezes e urina são abundantes, a amônia é corrosiva para muitos tipos de materiais e o fluxo de urina começa imediatamente após o início da ingestão de alimento. Entretanto a mistura de fezes, urina e sangue foi corrosiva para o policarbonato. No local onde o policarbonato entrava em contato com os resíduos surgiram rachaduras. Um reforço de PVC nesta região resolveu o problema.

A literatura relata que morcegos são fortemente infestados por ectoparasitas de diversas espécies (Winsart e Guerrieri, 1961; Greenhall, 1965). No nosso cativeiro, apenas uma espécie, identificada como *Necrobia rufipes* (besouro) da Família Cleridae e Ordem Coleóptera foi observado por um período curto porém em grande número. Os necrobia são insetos necrofagos atraídos por carcassas em decomposição e podem ser considerados como indicadores forense (Carvalho *et al.*, 2000). Sua presença em nosso cativeiro pode estar associada a proximidade com o

Instituto de Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Morcegos vampiros tem um comportamento de defesa naturalmente agressivo e interações sociais com níveis de dominância determinados por lutas. O número de agressões observado no cativeiro pode refletir esse comportamento e poderia explicar porque oito animais sofreram mais de uma agressão enquanto outros nunca apresentaram sinais de agressões. Provavelmente na hierarquia do grupo tratavam-se de animais submissos. A região do corpo atingida com maior frequência eram a cabeça e a face (olhos, queixo, lábios e região nasal). Em cativeiro é razoável esperar que a competição por alimento aumente a agressividade e em consequência as lutas e ferimentos.

Não era objetivo desse estudo observar a reprodução de *Desmodus rotundus* e a sobrevivência de filhotes em cativeiro. Entretanto entre as 69 fêmeas, 27 (39,1%) estavam prenhas, concebidas anteriormente ao cativeiro. Quatro delas, (14,8%) foram eutanasiadas prenhas no fim do período de observação, 12 (44,4%) abortaram, 3 filhotes (11,1%) sobreviveram menos que 12 horas porque eram prematuros, 5 filhotes (18,5%) sobreviveram menos que 5 dias, provavelmente porque foram rejeitados por suas mães, e três sobreviveram por 14 dias, 51 dias e até a idade adulta respectivamente. A maioria dos abortos (91,7%) ocorreu entre um e dois meses após a introdução das fêmeas no cativeiro. Somente um aborto ocorreu dois dias após a chegada ao cativeiro e pode estar associado ao estresse da captura.

A maior desvantagem do sistema de exaustão e insuflação diretamente no interior das gaiolas e o custo. O filtro HEPA é caro e deve ser trocado periodicamente, porém essa despesa é compensada pela durabilidade das gaiolas, a qualidade da observação e a biosegurança dos pesquisadores.

As gaiolas ofereceram condições dos animais sobreviverem longo tempo, diminuindo o estresse do cativeiro e a necessidade de manuseá-los. Os indicadores como o consumo adequado de sangue, a manutenção da massa corpórea, a baixa mortalidade e a longevidade demonstraram a boa adaptação dos morcegos a esse tipo de gaiola.

INFECÇÃO EXPERIMENTAL

A dosagem de anticorpos antes da infecção experimental, foi feita para que os animais que apresentassem título detectável de AcN, fossem retirados do experimento, não interferindo nos resultados.

Os anticorpos anti-rábcicos neutralizantes tem um papel crítico na imunoproteção, dessa forma a presença de AcN é considerada um indicador da proteção contra a infecção. Entretanto, o grau de resistência indicado pela presença de AcN no sangue tem sido questionado e título de anticorpos não é paralelo ao título de imunidade. A sobrevivência esta associada a resposta das células T, a produção de anticorpos, a alta expressão do complexo de histocompatibilidade principal e a presença de células apoptoides (Lafon, 2002).

Embora 97,2% dos animais apresentasse aumento no nível de AcN no dia 30 após inoculação, demonstrando que o sistema imune foi acionado, apenas 52,7% dos animais atingia título de 0,5UI/ml e somente 35,5% deles mantinha o título acima de 0,5UI/ml no dia 90. O título de AcN decrescia rapidamente em todos os grupos, com exceção do grupo 100.000DL₅₀ICC no qual todos os sobreviventes mantiveram títulos acima de 0,5UI/ml no dia 90.

Títulos de AcN acima de 0,5UI/ml no dia da eutanásia ou em dosagens anteriores, não foi suficiente para evitar a morte dos animais Z12, X12 e Q12, que apresentaram período de incubação muito curto (5 dias), do F12 (14 dias) e do H7 (29 dias). Dois animais (Y7 e B2), não apresentaram aumento significativo no título de AcN antes da morte. Os outros três animais (A2, R12 e K12) foram encontrados mortos na gaiola.

Neste experimento foi observado resistência a infecção experimental em animais soronegativos ou com baixos títulos de anticorpos, independentemente da dose inoculada. Entretanto, animais que receberam as mais altas doses desenvolveram os mais altos títulos de AcN. Setien *et al.*, 1998 relataram que animais exibindo níveis indetectáveis de AcN resistiram ao desafio com altas doses de vírus.

Como esperado, animais que receberam as doses mais baixas sobreviveram mais tempo que os animais que receberam as doses mais altas. A correlação inversamente proporcional entre a duração do período de incubação e a dose inoculada já havia sido observada para outras espécies (Sikes, 1962, Parker e Wilsnack, 1966, Blancou *et al.*, 1979).

O período de incubação de 5 a 41 dias (média de 16,8 dias) observado nesse experimento, e o período de morbidade, entre 18 e 48 horas, foram similares aos reportados na literatura, 9 a 38 dias e 1 a 3 dias (Acha, 1967); 7 a 30 dias e menos de 24 horas (Setien *et al.*, 1998).

As três técnicas usadas para diagnóstico de raiva (IFD, ICC e RT-PCR) apresentaram a mesma sensibilidade para detecção do antígeno no cérebro dos morcegos (100%). Entretanto, a sensibilidade da detecção do antígeno nas glândulas salivares foi maior através da técnica RT-PCR (60%) do que da IFD e ICC (40%). Alguns autores tem mostrado a RT-PCR como uma

alternativa rápida e sensível para diagnóstico de raiva (Sacramento *et al.*, 1991, Heaton *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 2000) e mais eficiente para amostras com baixa atividade viral (Echevarria *et al.*, 2001) ou em autólise (Martorelli *et al.*, 2000).

O período de quarentena dos morcegos usados neste experimento foi relativamente curto, 30 a 45 dias, porém cobria o período de incubação da doença caso o animal estivesse encubando o vírus adquirido na natureza. Entretanto a literatura relata excepcionalmente períodos mais longos, por essa razão o RNA viral dos dez morcegos infectados foi sequenciado (cérebro e glândulas salivares) apresentando 100% de homologia com a cepa R2918-97, usada na infecção experimental.

A incordenação motora dos membros posteriores era o primeiro sintoma observado, o animal apresentava dificuldade de se manter apoiado sobre os mesmos, caindo para traz ou para os lados. Esse quadro evoluía e o animal não conseguia mais se manter apoiado sobre os polegares. Até o momento em que descia para se alimentar ou caía da grade superior e não conseguia mais subir, permanecendo prostrado por várias horas, não reagindo com agressividade ou fúria mesmo se provocado.

Os sintomas iniciais da doença eram observados principalmente quando o animal se separava do grupo. Se um animal doente estivesse no meio do grupo, formando o grupamento característico, os sintomas podiam passar despercebidos. Por essa razão dentro do período de incubação os animais eram forçados a se separar para melhor observação.

O quadro clínico de raiva parálitica dos oito animais doentes foi semelhante ao citado na literatura. Nenhum sinal associado a raiva furiosa como agressividade anormal, aumento na tendência de morder ou atacar repetidamente outro animal na gaiola, lançar-se contra as paredes da gaiola ou mover-se viciosamente de uma lado para o outro na gaiola, como relatado por Pawan (1936) foi observado.

Pawan (1936) relatou que morcegos doentes são isolados da colônia. Nesse experimento esse fato foi observado uma única vez. O morcego A2, inoculado com 1.000DL₅₀ICC, se isolou ou foi isolado do grupo a maior parte do tempo nos dois dias que antecederam a sua morte. Em contraste, o morcego H7, já visivelmente doente, dividiu o bebedouro com outros 3 morcegos no dia anterior a sua morte.

O fato de um morcego claramente sintomático (H7), dividir o bebedouro com outros animais, enquanto outro assintomático (A2) foi segregado do grupo, mostra o quanto pode ser variável as características dos animais doentes.

Por outro lado, os dois animais que morreram de raiva no grupo inoculado com 1.000DL₅₀ICC (A2 e B2), permaneceram assintomáticos até a morte. Nos dias anteriores à morte, eles desceram para comer e nenhum sintoma associado a raiva foi observado nesses animais, eles foram encontrados mortos próximos ao bebedouro. A perda de massa corpórea foi insignificante (1,2% e 1,1% da massa corpórea, respectivamente) e não houve decréscimo do consumo de sangue no grupo. Diversos autores tem relatado a ausência de sintomas em *Desmodus rotundus* (Torres e Queiroz Lima, 1935; Pawan 1936; Setien *et al.*, 1998; Rodrigues e Tamayo, 2000).

O morcego F12 teve o menor período de morbidade. No dia anterior a sua morte (18 horas) ele foi retirado da gaiola e observado durante a coleta de saliva, sem que nada anormal fosse percebido. As 14:30 do dia posterior estava prostrado. O emagrecimento dos animais H7, X12 e Q12 foi tão acentuado que não havia gordura marrom e no morcego F12 a gordura marrom estava visivelmente diminuída.

Chama a atenção a capacidade de sobrevivência dos animais que mesmo prostrados, resistiam várias horas. E mesmo doentes (mas não na fase final), ainda tentavam se alimentar, embora com muita dificuldade. Eram encontrados sempre próximos ao bebedouro.

Para que a eficiência da vacina pudesse ser avaliada, era necessário que os animais vacinados fossem desafiados com uma dose de vírus rábico comprovadamente capaz de induzir a doença. A infecção experimental, visava estabelecer a dose letal capaz de induzir doença em 50% dos animais do experimento (Dose Letal 50%) .

A despeito da importância desses animais como reservatório de raiva, a literatura é limitada em dados sobre infecção experimental de *D.rotundus* com vírus rábico isolado de *D.rotundus*, via intramuscular. O experimento realizado por Moreno e Baer (1980), utilizou 3 grupos de 5, 7 e 6 animais, inoculados com 5, 56 e 562DL₅₀ICC, respectivamente. O grupo que recebeu 562DL₅₀ICC apresentou 100% de mortalidade, e os outros menos de 50%. Setien *et al.* (1998), usando 3 grupos de 10 animais que receberam 5x10⁴, 5x10⁵ e 10⁶DL₅₀ICC, relatou mortalidade de 50%, 62,5% 87,5% respectivamente.

Os outros trabalhos encontrados na literatura, foram realizados com morcegos de outras espécies. Sulkin (1957 e 1959) realizou infecção experimental com morcegos do gênero *Tadarida*, obtendo 23,8% de mortalidade (32/137) usando 8.000DL₅₀ICC, porém a cepa de vírus rábico usada era de humano. Constantine (1966) realizou infecção experimental com morcegos *Lasiurus borealis*, apresentando 20% de mortalidade quando inoculados com 100 e 500DL₅₀ICC, de vírus rábico isolado de glândula salivar de morcego. Baer (1956) inoculou 200 e 2.000DL₅₀ICC (cepa de morcego),

em grupos de 6 e 7 morcegos *Tadarida brasiliensis* obtendo 33,3% e 28,6% de mortalidade respectivamente.

Em contraste com a extrema ou relativa suscetibilidade de alguns animais silvestres à sua cepa homóloga, quando infectados experimentalmente, via intra-muscular, o *D.rotundus* tem mostrado resistência à sua cepa homóloga. Estudo recente de infecção experimental mostrou ser necessário 5×10^4 DL₅₀ICC para produzir infecção por via intramuscular em 50% dos animais (Setien *et al.*, 1998), o que é ratificado por esse estudo no qual 10^5 DL₅₀ICC produziu doença em 60% dos animais. Raposas inoculadas com variante de vírus homóloga requerem entre 0,33 a 14DL₅₀ICC para tornarem-se infectados (Sikes, 1962, Blancou *et al.*, 1979), skunks necessitam de 80 a 100DL₅₀ICC (Parker, 1966), e raccoons requerem entre 7.000 e 11.000DL₅₀ICC (McLean, 1975).

VACINAÇÃO

A infecção experimental mostrou que a diluição 10^{-5} DL₅₀ICC da cepa de vírus rábico isolada de *D.rotundus*, administrada via intra-muscular, induzia doença em 60% dos animais do experimento. Esta diluição foi usada como desafio nos experimentos de vacinação.

Quando administrada diretamente na boca a vacina se mostrou imunogênica e a resposta a vacina foi claramente dose-dependente. A porcentagem de sobrevivência aumentava a medida que a dose de vacina administrada aumentava. Considerando que os animais foram desafiados com DL₆₀, era esperado que até 60% dos animais do experimento morressem após desafio. Porém a porcentagem de proteção atribuída a vacina aumentava a medida em que a dose de vacina administrada aumentava. A dose dependência da vacina V-RG administrada via oral para raposas foi observada por Blancou *et al.* (1986).

Já a vacina administrada via pasta não mostrou essa relação dose dependência. Os resultados dos grupos F, G e H, que receberam vacina 18 vezes concentrada não mostram diferença significativa em relação aos grupos A, B, C, D e E que receberam vacina 9 vezes concentrada. A vacina administrada via pasta se mostrou contato-dependente. Obviamente, quando houve contato dos membros do grupo com o animal "tratado" e quanto maior foi esse contato, os resultados foram melhores.

Era esperado que, como no caso do controle da população de morcegos *D.rotundus* através da aplicação da pasta anticoagulante, que a administração da vacina, via pasta, em um ou dois morcegos pudesse induzir imunidade no morcego que recebeu a pasta e ser hábil para indiretamente induzir proteção em outros morcegos do grupo. Tomando essa

linha básica como princípio, nossos resultados são encorajadores porque um número significativo de morcegos que não receberam vacina foram imunizados indiretamente e sobreviveram ao desafio. Nos grupos B e E quatro dos cinco morcegos que não receberam pasta, sobreviveram ao desafio (80%). Nos grupos C e F, quatro em seis animais que não receberam vacina sobreviveram ao desafio (67%).

Com relação a sobrevivência dos animais "tratados", a maioria (73,3%) sobreviveu ao desafio. Entre os quatro que morreram, um havia recebido vacina em pasta de vaselina (M18) e os outros três (B22, Y26 e N27) receberam vacina em pasta glicerizada.

Foi considerado desnecessário manter um grupo controle para os experimentos de vacinação, o qual receberia pasta e corante, sem vacina e seria desafiado nas mesmas condições dos grupos experimento uma vez que, as pastas e o corante usados no experimento são neutros e inócuos, conforme orientação dos fabricantes. O grupo que recebeu pasta e corante como forma de testar a transmissibilidade da pasta, apresentou 100% de sobrevivência, sem reações adversas observáveis ao uso da pasta ou do corante. A pasta de vaselina tem sido usada como veículo de anticoagulante aplicado ao dorso de *D.rotundus* há vários anos e a pasta de glicerina é indicada para uso humano. O corante é alimentício para uso humano.

Uma das dificuldades encontradas nesse experimento foi obter a consistência adequada da pasta com vacina a ser aplicada ao dorso do animal. Os dois primeiros grupos (A e B) receberam pasta de vaselina, que apresentava consistência final firme após homogeneizada com a vacina, mas não absorvia totalmente a quantidade de vacina. Os grupos seguintes, receberam pasta glicerizada, que absorvia maiores quantidades de vacina, mas não apresentava consistência final adequada, escorrendo do corpo do animal.

Nos grupos C, F e G, a perda de pasta foi mais acentuada. Em razão do volume final de vacina ser maior, a quantidade de pasta também foi aumentada e a consistência final não foi adequada, o que deve ter prejudicado os resultados. Se fosse um experimento em campo, a quantidade de pasta aplicada ao dorso dos animais desses grupos poderia inclusive prejudicar o vôo. O ideal é que a quantidade de pasta com vacina não ultrapasse 10% do peso do animal (por volta de 3 gramas).

Outra questão importante é escolher o animal que recebera a pasta com vacina, os animais muito jovens ou fracos podem ter comportamento submisso na colônia e não interagirem com os outros indivíduos da colônia, prejudicando a transmissibilidade da pasta+vacina. Devem ser escolhidos animais adultos, fortes e vigorosos para a aplicação da vacina.

Tanto na vacina aplicada diretamente na boca, quanto na vacina aplicada via pasta, a maioria dos animais apresentou aumento no título de AcN após a vacinação (94,7% e 71,7% respectivamente) demonstrando que o sistema imune foi acionado. Apesar desse aumento, apenas 26,3% e 20% deles atingiu o título de 0,5UI/ml. A maioria dos animais (92,1% e 79,3%) só atingiu esse título após o desafio. Os animais que receberam vacina na boca, atingiam títulos mais altos e 80% deles, os mantiveram até o final do período de observação, enquanto que 57,1% dos animais vacinados via pasta mantinham o título no final do período de observação.

Um animal do grupo que recebeu 3,5ml de vacina, dois animais do grupo F, dois do grupo G e um do grupo E, não atingiram 0,5UI/ml e resistiram ao desafio. Fato semelhante também foi observado por Ruprecht *et al.*, (1993) com a vacina V-RG, em raccoons (*Procyon lotor*). Dos 18 raccoons vacinados, 14 sobreviveram ao desafio intramuscular ($10^{4.5}DL_{50}ICC$), com variante de vírus rábico isolada de raccoons, apesar de apenas 7 terem título de AcN maior que 0,5UI/ml. Blancou *et al.* (1986), utilizou a vacina V-RG em raposas. O desafio via intramuscular ($17.000DL_{50}ICC$) foi feito 28 dias após a vacinação com variante de raposa. A sorologia apresentou altos títulos de AcN em todos animais, menos um, que não teve título detectável e resistiu ao desafio. Nesses casos, a sobrevivência do animal deve estar associada a imunidade celular.

A Organização Mundial da Saúde (1992), considera protegidos contra infecção com o vírus rábico, indivíduos que apresentem títulos maiores ou iguais a 0,5UI/ml, 21 dias após a vacinação, quando analisados pelas técnicas RFFIT ou SNC - Soroneutralização em camundongos. Esse valor foi obtido a partir de experimentos realizados com camundongos e extrapolado para seres humanos. Com relação a sorologia animal, a maioria dos autores utilizam 0,5UI/ml como ponte de corte, porém outros autores tem utilizado valores significativamente menores.

Rosatte e Gunson (1984) trabalhando com cangambás em Alberta (Canadá) considerou como negativos na RFFIT, títulos abaixo de 0,13UI/ml. Aubert (1992) analisando a resposta humoral de cães e gatos a várias vacinas anti-rábicas mostrou que usando títulos de 0,03UI/ml na SNC e 0,05UI/ml na RFFIT, havia uma expectativa de sobrevivência após desafio com vírus canino de 95% dos animais. Em 288 cães que tinham o título superior a 0,1UI/ml, a sobrevivência era de 100%. O autor sugere a adoção de um ponto de corte de 0,1UI/ml para gatos e 0,2UI/ml para cães como nível seguro de medida da proteção. Aghomo *et al.* (1990), estudando a resposta imune humoral de cães vacinados com vacina anti-rábica de cultura celular através da técnica RFFIT considerou como negativos títulos menores que 0,2UI/ml.

A ausência de patogenicidade da vacina V-RG, via oral, para morcegos observada nesse experimento, também foi demonstrada em diversas

espécies de animais silvestres, animais domésticos e de laboratório (Blancou *et al.*, 1989; Brochier *et al.*, 1989). Nenhuma lesão atribuída a vacina foi observada em mais de 50 espécies de vertebrados.

É imperativo que a epidemiologia desse vetor de raiva seja melhor compreendida. Estudos biológicos e ecológicos e sua interação com animais domésticos e o homem devem ser observados para estabelecer medidas de controle. A falta de conhecimento sobre a distribuição, ocorrência e ecologia do vírus e dos hospedeiros tem sido responsável pela ineficiência dos programas de controle da raiva silvestre (Carey *et al.*, 1978).

Segundo De Mattos *et al.*, (2000c), a epidemiologia molecular da raiva em morcegos vampiros no Brasil tem revelado uma intrincada transmissão inter-espécies, na qual os morcegos vampiros são a fonte de infecção de diferentes espécies de morcegos insetívoros e frugívoros. Para Steece e Altenbach (1989), a infecção dos morcegos insetívoros pode ocorrer durante a interação inter-espécies, uma vez que, esses morcegos dividem o mesmo habitat com espécies hematófagas (Taddei, 1996). São observadas com frequência agressões entre os filhotes causando perfurações nas asas e patas. Esse comportamento proporcionaria oportunidade para transmissão do vírus (Baer, 1975). Moreno e Baer (1980) consideravam que o reservatório de infecção do vírus rábico do morcego insetívoro pode ser o morcego vampiro.

Já em países onde o morcego hematófago *D. rotundus* não habita, são os morcegos insetívoros que são responsabilizados pela introdução da raiva entre mamíferos silvestres terrestres em áreas livres dessa zoonose como na América do Norte (Daoust *et al.*, 1996).

Inúmeros pontos devem ser esclarecidos antes que a vacinação oral de morcegos possa se tornar um método praticável de controle da doença nessa espécie e medida de controle indireta para a doença na população de herbívoros: baseando-se nesses resultados iniciais uma vacina muito mais concentrada deve ser produzida e testada em um veículo (pasta) mais adequado.

Procurar alternativas para controle da raiva em populações de morcegos é sem dúvida, um grande desafio. Não é admissível que a única medida de controle para *Desmodus rotundus* seja a eliminação do animal e de colônias pela aplicação de anticoagulante.

Conclusões

1 - Houve adaptação dos morcegos *Desmodus rotundus* ao cativeiro no modelo de gaiola escolhido.

2 - Na infecção experimental, via intramuscular, com variante de vírus rábico isolada de *Desmodus rotundus*, naturalmente infectado, 100.000DL₅₀ICC de vírus rábico foram necessárias para induzir a doença em mais da metade dos animais do experimento. Doses baixas (100DL₅₀ICC) falharam em produzir a doença.

3 - Todos os 53 animais que desenvolveram raiva (10 na infecção experimental, 43 na vacinação), apresentaram sintomas de raiva paralítica, dois animais permaneceram assintomáticos até o momento da morte. Nenhum sintoma de raiva furiosa foi observada nos animais doentes.

4 - A maioria dos animais apresentou elevação do título de anticorpos após a infecção experimental, vacinação via esofágica ou vacinação via pasta.

5 - Animais com títulos baixos de AcN resistiram à infecção experimental ou ao desafio com vírus rábico após vacinação.

6 - A vacina V-RG administrada via esofágica se mostrou imunogênica e a sobrevivência, após desafio, dos *D.rotundus* vacinados se mostrou dose-dependente.

7 - A vacina V-RG administrada via pasta se mostrou imunogênica e a sobrevivência, após desafio, dos morcegos *D.rotundus* vacinados se mostrou contato-dependente.

8 - Quando um ou dois morcegos de um grupo recebiam a vacina homogeneizada na pasta e corante, os outros animais do grupo entravam em contato com o animal "tratado". Esse contato não pôde ser determinado numericamente, apenas estimado indiretamente pela sobrevivência após desafio. Parte da pasta aplicada ao dorso do animal era perdida. Essa perda não pôde ser quantificada.

9 - Nenhuma lesão associada ao vírus vaccinia foi observada no músculo dorsal nos dias posteriores a administração da pasta com vacina V-RG.

10 - A administração da vacina V-RG, via pasta, em um ou dois morcegos de um grupo, induziu imunidade e proteção após desafio, no morcego que recebeu a pasta e se mostrou hábil para indiretamente induzir proteção em outros morcegos do grupo.

11 - A vacina anti-rábica V-RG produzida para ser usada em *D.rotundus* deve ser mais concentrada e a pasta neutra (veículo) deve ter consistência final mais adequada.

Referências
Bibliográficas

ACHA, P.N. Epidemiology of paralytic bovine rabies and bat rabies **Bull. Off. Int. Epiz.** **67**:343-382, 1967.

ACHA, P.N. e ARAMBUCO III, P. Rabies in the Tropics-History and Current **Status in Rabies in the tropics** Kuwert, E; Merieux, C; Koprowski, H. Bogel, K. Berlin Springer-Verlag , 343-359, 1985.

AGHOMO, H.O.; AKO-NAI, A.K. ODUYE, O.O.; TOMORI, O.; RUPPERCHT, C.E. Detection of rabies virus antibodies in fruit bats (*Eidolon helvum*) from Nigeria. **Journal of Wildlife Diseases** **26**(2):258-261, 1990a.

AGHOMO, H.O.; ODUYE, O.O.; RUPPERCHT, C.E. The serological response of young dogs to the flury lep strain of rabies virus vaccine. **Vet. Res.Com.**, **14**:415-425, 1990b.

AGUIAR, L.M. e TADDEI, V.A. Workshop sobre a conservação dos morcegos brasileiros. **Chiroptera Neotropical** **1**(2):24-29, 1995.

ALBERT, M.F.A. Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs **Rev.sci. tech.Off.int.Epiz.**, **11**(3), 735-760, 1992.

ALMEIDA, M.F.; AGUIAR, E.A.C.; MARTORELLI, L.F.A.; NUNES, V.F.P. "Laboratory diagnosis and research of rabies antibodies in chiroptera in the state of Sao Paulo, Brazil". IX International meeting on research advances and rabies control in the americas. Mexico, december 8-12, 1998.

ANDA LOPEZ, D., IBARRA VELARDE, F. FLORES CRESPO, R. Evaluacion de tres vampiricidas comerciales de aplicacion topica en el control del vampiro (*Desmodus rotundus*) **Tecnica Pecuaria Mexicana** **28**:31-33, 1975.

ARELLANO-SOTA, C. Biology, Ecology, and Control of the vampire Bat. **Reviews of Infectious Diseases** **10**(4):S615-S619), 1988.

ARELLAMO-SOTA, C.; SUREAU, P.; GREENHALL, A.M. Preferencia de la predacion del vampiro en relacion a la edad y raza del ganado y la epoca del ano. **Tecnica Pecuaria Mexicana** **17**:23-29, 1971.

ATANASIU, Titrage des anticorps rabiques pratiqué sur les sérums humains. **Bull. Off. int. Epiz.** **67**(3-4), 383-387, 1967.

BAER, G.M. **Rabia em murcielagos no hematofagos** in Baer G.M. Historia Natural da Raiva, 1:85-104, 1975.

BALLANTYNE,E.E. e O'DONOGHUE, J.G. Rabies Control in Alberta **J. Amer.Vet Med. Ass.** **125**, 316-326, 1954.

BAER, G. e MCLEAN, R.G. A new method of bleeding small and infant bats. **Journal of mammology** **53**(1):231-2, 1971.

BATISTA DA COSTA M., BONITO R.F. e NISHIOKA S.A. An outbreak of vampire bats bite in the Brazilian village. **Trop Med Parasitol** **44** (3):219-20, 1993.

BIRNEY, E.C. e RISING, J.D. Notes on distribution and reproduction of some bats from Kansas, with remarks on incidence of rabies. **Transactions of the Kansas Academy of Science** **80**:519-524, 1967.

BLANCOU, J., AUBERT, M. F. A., ANDRAL, A. e ARTOIS, M. Rage experimentale du renard roux (*Vulpes vulpes*) I.Sensibilite selon la voie d'infection et la dose infectante. **Rev. Med. Vet.** **130**:1001-1015,1979.

BLANCOU, J.; KIENY, M.P.; LATHE, R. LECOCQ, J.P.; PASTORET, P.P.; SOULEBOT, J.P. AND DESMETTRE, P. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. **Nature** **322**:(24)373-375, 1986.

BLANCOU, A.B., PASTORET, T.P.P., DESMETTRE, P., LANGUET, B, KIENY, M.P. Safety and efficacy of na antirabies vaccine consisting of recombinant vaccinia-rabies virus administered orally to the fox, dog and cat. **Annales de Recherches Veterinaires** **20**:195-204, 1989.

BRASS, D.A. **Rabies in bats**: natural history and public health implications. Capítulo 6: vampire bats of the american tropics 57-82. Livia Press, 1994.

BROCHIER, B.M.; LANGUET, B.; BLANCOU, J.; KIENY, M.P.; LECOCQ, J.P.; COSTY, F. DESMETTRE, P; PASTORET, P.P. Use of recombinant Vaccinia-Rabies Virus for Oral Vaccination of Fox Cubs (*Vulpes vulpes*) against Rabies **Veterinary Microbiology** **18**:103-108, 1988.

BROCHIER, B.; BLANCOU, J.; THOMAS, I.; LANGUET B.; ARTOIS, M.; KIENY, M-P.; LECOCQ, J-P.; COSTY, F.; DESMETTRE, P.; CHAPPUIS, G. and PASTORET, P-P. Use of recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus for oral vaccination of wildlife against rabies: innocuity to several non-target bait consuming species. **Journal of Wildlife Diseases** **25**(4): 540-547, 1989.

BROCHIER, B.; THOMAS, I.; BAUDUIN, B.; LEVEAU, T.; PASTORET, P.P.; LANGUET, B.CHAPPUIS, G.; DESMETTRE, P. BLANCOU, J. ARTOIS, M. Use of a vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies **Vaccine**, **8**:101-104, 1990.

BROCHIER, B. KIENY, M.P., COSTY, F. COPPENS, P., BAUDUIN, B. LECOCQ, J.P., LANGUET, B., CHAPPUIS, G. DESMETTRE, P. BLANCOU, J., ARTOIS, M.

Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. **Nature**, **354**:520-522, 1991.

BURNETT, C.D. Bat rabies in Illinois: 1965 to 1986 **Journal of Wildlife Diseases** **25**(1):10-19, 1989.

BUSCH C. Consumption of blood, renal function and utilization of free water by the vampire bat (*Desmodus rotundus*). **Comparative Biochemistry Physiology** **90 A**(1):141-146, 1988

CARABALLO, A J. Outbreak of vampire bats biting in a Venezuelan village. **Rev Saude Publica** **30** (5):483-4, 1996.

CAREY, A.B. GILES, R.H. Jr., McLEAN, R.G. The Landscape epidemiology of rabies in Virginia. **Am. J.Trop.Med.Hyg.** **27**(3): 573-580, 1978.

CARINE, A Sur une grande epizootie de rage **Ann.Inst.Pasteur** **25**:843-846, 1911.

CARRIERI, M.L.; FAVORETTO, S.R.L.; CARNIELI, P.; QUEIROZ, L.H.; SOUZA, M.C.A.M.; PANACHÃO, M.R.I.; TAKAOKA, N.Y.; HARMANI, N.M.S.; KOTAIT, I. **Desmodus Rotundus como transmissor da raiva canina e felina no Estado de São Paulo**. In Seminário Internacional da Raiva, 22-24 agosto, São Paulo, Brasil, 2000.

CARVALHO, L.M.L. THYSSEN, P.J.; LINHARES, A X.; PALHARES, F.A B. A checklist of arthropods associated with Pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** **95**(1):135-138, 2000.

CLARK, H.C. e DUNN, L.H. Experimental studies on Chagas' Disease in Panama. **American Journal Tropical Medicine** **12**(1):49-77, 1932.

C.D.C. Human Rabies-California, Georgia, Minnesota, New York and Wisconsin, 2000. **MMWR** **49**(49): 1111-5, 2000.

COONS A.H. e KAPLAN, M.M. Localization of antigen in tissue cells. Improvements in a method for the detection of antigen by means of a fluorescent antibody. **Journal of Experimental Medicine** **91**:1-13, 1950.

CONSTANTINE, D.G. An automatic bat-collecting device. The **Journal of Wildlife Management**. **22**(1):17-22, 1958

CONSTANTINE, D.G. Rabies transmission by nonbite route. **Public Health Reports** **77**(4):287-289, 1962.

CONSTANTINE, Experimental rabies infection. **Am.J.Vet Res** 27:16-19, 1966.

CONSTANTINE, D.G. Rabies transmission by air in bat caves **Public Health Reports** 82:867-888, 1967.

CONSTANTINE, D.G.; TIERKEL, E.S.; KLECKNER, M.D. HAWKINE, D.M. Rabies in New Mexico caverns bats **Public Health Reports** 83:303-316, 1968.

CONSTANTINE, D. EMMONS, R.W.; WOODIE, J.D. Rabies in nasal mucosa of naturally infected bats. **Science** 175:1255-56, 1972.

DAOUST, P.Y.; WANDERLER, A.I.; CASEY, G.A. Cluster of rabies cases of probable bat origin among red foxes in Prince Edward Island, Canada. **Journal of Wildlife Diseases** 32:403-406, 1996.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P., 1996. **The fluorescent antibody test** in Meslin, F-X; Kaplan, M.M. and Koprowski, H. Laboratory techniques in rabies - WHO, 1996 - 4ª edição.

DELPIETRO H. et al Determination de la tasa de ataque en murcielagos **Boletim Oficina Sanitaria Panamericana LXIII**(3)63:222-230, 1972.

DELPIETRO, H.A.; GURY-DHOMEN, F.; LARGHI, O.P.; MENA-SEGURA, C. and ABRAMO, L. Monoclonal Antibody Characterization of Rabies Virus Strains Isolated in the River Plate Basin. **J. Vet.Med.B** 44:477-483, 1997.

DELPIETRO, H. **Aspectos económicos y sanitarios del problema de la rabia parálitica y de la agresión del vampiro**. In Seminário Internacional da Raiva, 22-24 agosto, São Paulo, Brasil, 2000.

DE MATTOS, C.A.; DE MATTOS, C.C.; SMITH, J.S.; MILLER, E.T.; SARA PAPO, A.V. e OSBURN B.I. Genetic characterization of rabies field from Venezuela. **American Society for Microbiology** 34(6):1553-58, 1996.

DE MATTOS, C.A.; FAVI, M.; YUNG, V. PAVLETIC, C. DE MATTOS, C.C. Bat rabies in urban centers in Chile. **Journal of Wildlife Diseases** 36(2):231-40, 2000a.

DE MATTOS, C.A.; BENITEZ, G. BAER, G.M. e DE MATTOS, C.C. **Molecular characterization of vampire bat rabies isolates from Mexico** In XI Reunion Internacional sobre avances en la investigation y control de la rabia en las Américas, 18-21 outubro, Lima, Perú, 2000b.

DE MATTOS, C.A.; DE MATTOS, C.C.; FAVI, M.; FAVORETTO, S.R.; YUNG, V.; LOZA-RUBIO, E.; MORAIS, N.; AGULAR-SETIEN, A. **Silvatic rabies in**

Latin America In XI Reunion Internacional sobre avances en la investigation y control de la rabia en las Américas, 18-21 outubro, Lima, Perú, 2000c.

DESMETTRE, P.; LANGUET, B.; CHAPPUIS, G.; BROCHIER, B.; THOMAS, I.; LECOCQ, J.P.; KIENY, M.P.; BLANCOU, J.; AUBERT, M.; ARTOIS, M.; PASTORET, P.-P. Use of vaccinia rabies recombinant for oral vaccination of wildlife. **Veterinary Microbiology** **23**:227-236, 1990.

DIAZ, A.M.; PAPO, S.; RODRIGUES, A.; SMITH, J.S. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. **Journal of Veterinary Medicine B** **41**,153-160, 1994.

DITMARS R.L. e GREENHALL, A.M.. The vampire bat : A presentation of undescribed habits and rewiw of its history. **Zoologica** XIX (2), 53-76, 1935.

ECHEVARRÍA J.E., AVELLÓN A., JUSTE J., VERA M. e IBÁÑEZ C. Screening of Active Lyssavirus Infection in Wild Bat Populations by Viral RNA Detection on Oropharyngeal Swabs. **Journal of Clinical Microbiology**. 39(10):3678-83, 2001.

ESBÉRARD, C.E.L.; LUZ, E.M.; CHAGAS, A. S. Uso de residências para refúgios por morcegos no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Medicina Veterinaria** **21**(1):17-20, 1999.

FARRY S.C.; HENKE S.E.; BEASOM S.L.; FEARNEYHOUGH Efficacy of Bait distributional strategies to deliver canine rabies vaccines to coyotes in Southern Texas **Journal of Wildlife Diseases** **34**(1):23-32, 1998.

FAVORETO S.R., CARRIERI M.L., CUNHA E.M. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Rev Inst Med Trop São Paulo** **44**(2):91-5, 2002.

FEARNEYHOUGH, M G , WILSON, P.J. CLARCK, K.A Results of na oral rabies vaccination programs for coyotes. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **212**:498-502, 1998.

FERNANDEZ, A.Z.; TABLANTE, A.; BARTOLI, F.; BEGUIN, S. HEMKER, H.C.; APITZ-CASTRO, R. Expression of biological activity of draculin, the anticoagulant factor from vampire bat saliva, is strictly dependent on the appropriate glycosylation of the native molecule. **Biochim Biophys Acta** **1425**(2):291-9, 1998.

FLORES CRESPO R.; LINHART, S.B.; e BURNS, R.J. Comportamiento del vampiro (*Desmodus rotundus*) en cautiverio. **Southwestern Naturalist**, **17**:139-43, 1972.

FLORES-CRESPO, R., BURNS, R. J., SAID FERNANDES, S. Evaluación de una técnica para combatir los vampiros en sus refugios. **Boletim Oficina Sanitaria Panamericana** 76(5):427-432, 1974.

FLORES-CRESPO, R. IBARRA VELARDE, F. ANDA LOPES, D. Un producto utilizable en tres métodos para el combate del murciélago hematófago **Técnica Pecuaria Mexicana** 30:67-75, 1976.

FLORES-CRESPO, R.; SAID FERNANDES, S. Efectividad de un vampiricida sistémico experimental en condiciones de laboratorio **Técnica Pecuaria Mexicana** 33:59-62, 1977.

FLORES CRESPO, R. **Biología de murciélagos hematófagos** In Seminário Internacional da Raiva, 22-24 agosto, São Paulo, Brasil, 2000

FORMENT, W.L.; SCHMIDT, U.; GREENHAL, A.M. Movement and population studies of the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Mexico. **Journal of Mammalogy**, 52(1): 227-28, 1971.

FORNES, A., LORD, R.D., KUNS, M.L., LARGHI, °P.; FUENZALIDA, E. LAZARA, L. Control of bovine rabies through vampire bat control. **Journal of Wildlife Diseases** 10:310-316, 1974.

GOULD, E. The feeding efficiency of insectivorous bats. **Journal of Mammology** 36(3)399:407, 1955.

GOODWING, G. G. e GREENHAL, A. M. A review of the bats of Trinidad and Tobago. **Bull of the American Museum of Natural History**, New York, 122: 187-301, 1961.

GREENHALL, A.M. Notes on behavior of captive bats **Mammalia** 29(4):441-451, 1965.

GREENHALL, A. M. Lucha contra los murciélagos vampiros **Boletim Oficina Sanitaria Panamericana** 71(3):231-245, 1971.

GREENHALL, A. M. Vampire bat control in the americas: a review and proposed program for action. **Bull Pan Amer. Health Org.** 8(1):30-36, 1974.

GREENHALL, A. M. **House Bat Management**. Fish and Wildlife Service. U.S. Department of the interior. Resource Publication 143. Washington, 1982.

GURY DOHMEN, F.E. e MENA SEGURA, C.A. **Tipificación antigenica de cepas de virus rábico, I.Z.L Pasteur, 1992-2000**. In XI Reunion Internacional sobre avances en la investigation y control de la rabia en las Américas, 18-21 outubro, Lima, Perú, 2000.

HANLON C. A., NIEZGODA M., HAMIR A. N, SCHUMACHER C., KOPROWSKI H., RUPPRECHT C. E. First North American Field Release of a Vaccinia-Rabies Glycoprotein Recombinant virus. **Journal of Wildlife Diseases** **34**(2):228-239, 1998.

HAUPT, H. e REHAAG, H. Durch Fledermäuse vertebreite seuchenhafte tollwut unter Viehbeständen in Santa Catarina. **Zeitschr. Infektions Hyg. Haustiere XXII**:76-90;104-127, 1921.

HAUPT, H. e REHAAG, H. A raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina, Sul do Brasil, transmitida por morcegos. **Boletim Sociedade Brasileira Medicina Veterinaria** **12**,1924 e 2 (1-2):17-47, 1925.

HEATON P.R., JOHNSTONE P., MCELHINNEY L.M., COWLEY R., O'SULLIVAN E., WHITBY J.E. Heminested PCR Assay for Detection of Six Genotypes of Rabies and Rabies-Related Viruses. **Journal of Clinical Microbiology** **35**(11):2762-66, 1997.

HURST E.W. e PAWAN J.L. An outbreak of rabies in Trinidad, without history of bites and with symptoms of acute ascending myelitis. **Lancet**;2:622-8, 1931.

HURST, E.W. e PAWAN, J.L. A further account of the Trinidad outbreak of acute rabic myelitis **J. Pathol. Bacteriol.** **35**:301-321, 1932

ITO M, ARAI YT, ITOU T, SAKAI T., ITO FH, TAKASAKI T, KURANE I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoir, dogs and vampire bats. **Virology** **284**:214-22, 2001

KIENY M.P.; LATHE R.; DRILLIEN, R.; SPEHNER, D.; SKORY, S.; SCHMITT, D.; WIKTOR, T.; KOPROWSKI, H.; LECOCQ, J.P. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. **Nature** **312**(8):163-166, 1984.

KOPROWISKI, H. **The mouse inoculation test** in Kaplan, M.M. Koprowiski, H., Meslin, F-X, Laboratory techniques in rabies, fourth edition. WHO, 1996.

LINHART, S.B.; FLORES CRESPO, R.; MITCHELL, G.C. Control de murcielagos vampiros por medio de un anticoagulante **Boletim Oficina Sanitaria Panamericana** **73**:100-109,1972.

LAFON M. **Immunology** In: Jackson, AC and Wunner WH. Eds. Rabies. Academic press, London, 351-65, 2002.

LEWIS, J.C. Use of Poison Bait to Control Rabies in Tennessee Wildlife. **Public Health Reports** **33**(1): 69-74, 1968.

LOPEZ R.A.; MIRANDA, P.P.; TEJADA, V.E.; FISHBEIN, D.B. Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle **The Lancet** **339**:408-12, 1992.

LOPES, R.L.; ANAYA, E.; ARENAS, A.; FERNANDEZ, M. **Tipificación antigenica del virus rabico en el Peru**. In IX International meeting on research advances and rabies control in the americas. Mexico, december 8-12, 1998.

LORD, R.D. Seasonal Reproduction of Vampire Bats and Its Relation to Seasonality of Bovine Rabies. **Journal of Wildlife Disease** **28**(2):292-94, 1992.

MACINNES C. D., SMITH S. M., TINLINE R. R., AYERS N. R., BACHMANN P., BALL D. G. A., CALDER L. A., CROSGREY S. J., FIELDING C., HAUSCHILD P., HONIG J. M., JAONHSON D. H., LAWSON K. F., NUNAN C. P., PEDDE M. A., POND B., STEWART R. B., VOIGT D. R.. **Journal of Wildlife Diseases** **37**(1):119-132, 2001.

MALAGA-ALBA, A. Rabies **Bol. Ofic. Panamer** **53**:105-114, 1962

McCARTHY, T.J. Human depredation by vampire bats (*Desmodus rotundus*) following a hog cholera campaign. **American Journal Tropical Medicine Hygiene** **40**(3):320-322, 1989.

MANSKE, U.; SCHMIDT U. Visual acuity of the vampire bat, *Desmodus rotundus*, and its dependende upon light intensity. **Z.Tierpsychol** **42**(2):215-21, 1976.

MARX, M.B. e SWINK, F.N. The Virginia Predator Rabies Control Program, 1961-1962. **J.A.V.M.A.** **143**(2)170-177, 1963.

MARTORELLI L.F.A, AGUIAR E.A C., ALMEIDA M.F., DURIGON E.L. **Genetic characterization of rabies virus isolates from São Paulo State, Brazil, during the period 1989-2000**. XII International Meeting on Research Advances and Rabies Control in the Americas. November, 12-16. Peterborough, Canada, 2001.

MARTORELLI, L.F.A.; AGUIAR, E.A.C.; ALMEIDA, M.F.; DURIGON, E.L. **Molecular diagnosis of isolated rabies virus in the State of São Paulo between 1989 and 2000** In XI Reunion Internacional sobre avances en la investigation y control de la rabia en las Américas, 18-21 outubro, Lima, Perú, 2000.

McLEAN R.G. **Raccoon rabies**. In: Baer G.M. ed. The Natural History of Rabies New York: Academic Press, (vol 2):53-77, 1975.

McKENNA, M.C. e BELL, S.K. **Classification of Mammals - above the**

species level. Columbia University Press, New York, 631pg, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL - Fundação Nacional da Saúde: Coordenação de Doenças transmitidas por vetores e antroponozoonoses. **Informes Técnicos.** Brasília, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL - Fundação Nacional da Saúde. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e Controle,** Brasília, 1996.

MITCHELL G.C. e BURNS, R.J. **Combate Químico de los murcielagos vampiros.** 2ª ed. Washington, D.C. US Government Printing Office, 40 pg., 1973

MOORE, G.J. RAYMOND, G.H. Prolonged incubation period rabies in a naturally infected insectivorous bat *Eptesicus fuscus*. **Journal of Wildlife Diseases** 6:167-168, 1970.

MORENO, J.A. e BAER, G.M. Experimental rabies in the vampire bat **American Journal Tropical Medicine Hygiene** 29(2):254-259, 1980.

NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world.** 5ª ed. Baltimore and London, Johns Hopkins University Press, 2 vols. 393pg, 1991.

NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world.** 7ª ed. Baltimore and London, Johns Hopkins University Press, 2 vols. 397pg, 2003.

OPAS-Organização Panamericana de Saúde - Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) Boletín **Vigilância epidemiológica de la rabia en las Americas,** XXX (1-12), 2000.

PASTORET, P.-P.; BROCHIER, B.; LANGUET, B.; THOMAS, I.; PAQUOT, A. BAUDUIN, B.; KIENY, M.P.; LECOCQ, J.P.; DE BRUYN, J. COSTY, F. ANTOINE, H. DESMETRE, Ph. First field trial of fox vaccination against rabies using a vaccinia-rabies recombinant virus. **The Veterinary Record,** November 5:481-483, 1988.

PARKER R.L. e WILSNACK R.E. Pathogenesis of skunk rabies virus: Quantitation in skunks and foxes. **Am J Vet Res;** 27(116):33-8, 1966.

PAWAN, J.L. Rabies in the vampire bat of Trinidad with special reference to the clinical course and the latency of infection **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 30:401-422, 1936.

PICCININI, R.S.; CURVELO, V.T.; CAVALCANTI, R.J.G.; JORGE, M. A; TABOSA, A G. Resultados do controle de vampiros *Desmodus rotundus rotundus* em Pernambuco, Brasil. **Bol. Ofic. Sanit. Anim.** XI (1-4):85-92,

1977.

PICCININI, R.S. e AQUINO, C.A. Aplicação experimental do anticoagulante diphenadiona no combate ao vampiro *Diphylla ecaudata* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Bol.Def.Sanit.Anim.** **13**(1-4):126-131, 1979.

PRICE, J.L. e EVERARD, C.O.R. Rabies virus and antibody in bats in Grenada and Trinidad. **Journal of Wildlife Diseases** **13**:131-134, 1977.

PRINS, L. e YATES, W.D.G. Rabies in Western Canada 1978-84 **Can.Vet.J.** **27**:164-169, 1986.

QUEIROZ DA SILVA, L.H.; PEDRO W.A.; FERRARI, C.I.L.; CARDOSO, T.C. "Rabies in bats from a southeastern area of Brazil". IX International meeting on research advances and rabies control in the Americas. Mexico, 1998.

QUEIROZ LIMA, E. A transmissão da raiva dos herbívoros pelos morcegos hematófagos da família Desmodontidae. **Rev. Depto Nac. Prod. Anim** **1**:165- ,1934.

REED, L.J. e MUENCH, H. A single method of estimating fifty per cent and points. **Am. J. Hyg.** **27**:493-497, 1938.

RICHARDSON, J.H.; RAMSEY, R.L.; STARR, L.E. Bat rabies in Georgia, 1956-1965. **Public Health Reports** **81**:1031-1035, 1966.

RODRIGUES Y.J.L. e TAMAYO J.G. Pathogeny of the Experimental Infection with the Rabies Virus in Hematophagous Bat (*Desmodus rotundus*). **Rev Fac Cs Vets** **41**(1-3):71-2, 2000.

ROSATTE, R.C. e GUNSON, J.R. Presence of neutralizing antibodies to rabies virus in striped skunks from areas free of skunk rabies in Alberta. **Journal of Wildlife Diseases**, **20**(3), 171-176, 1984.

RUPPRECHT C. E, WIKTOR, T.J. JOHNSON, D.H. HAMIR, A.N., DIETZSCHOLD, B. WUNNER, W.H., GLICKMAN, L.T., KOPROWSKI, H. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, **83**:7947-7950, 1986

RUPPRECHT, C.E. e KIENY, M.P. **Development of a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine.** in Rabies Campbell, J.B. & Charlton, K.M. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1988.

RUPPRECHT, C.E., HANLON, C.A., NIEZGODA, M. BUCHANAN, J.R., DIEHL, D. e KOPROWSKI, H. Recombinant rabies vaccines: efficacy assessment in free-

ranging animals **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, **60**:463-468, 1993.

RUPPRECHT, C.E., BLASS, L., SMITH K., ORCIARI, L.A., NIEZGODA, M.S., WHITFIELD, S.G., GIBBONS, R.V. GUERRA, M., HANLON, C.A. Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. **The New England Journal of Medicine**. 345 (8):582-586, 2001.

SACRAMENTO D, BOURHY H, TORDO N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Mol Cell Probe** 5:229-40, 1991.

SÃO PAULO - Secretaria de Estado de Saúde (SES) Coordenação do Programa de Controle da Raiva. **Informes Técnicos**, 2000.

SÃO PAULO - Secretaria de Estado de Saúde (SES) **Manual de Normas Técnicas**. Profilaxia da Raiva em Humanos, 2ª ed., 1996.

SÃO PAULO- Secretaria de Estado de Saúde. Manual Técnico do Instituto Pasteur. **Controle da raiva dos herbívoros**. de São Paulo, 1998

SCHNEIDER, M. C., ARON, J. SANTOS-BURGOA C., UIEDA W., RUIZ-VELAZCO S. Common vampire bat attacks on humans in a village of the Amazon region of Brazil. **Cad.Saude Publica** 17(6):1531-6, 2001.

SCHOWALTER, D.B. Characteristics of bat rabies in Alberta. **Canadian J. Comparative Medicine** 44:70-76,1980.

SETIEN, A.A.; BROCHIER, B.; TORDO, N.; DE PAZ, O.; DESMETTRE, P.; PÉHARPRE, D. e PASTORET, P-P; Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*) **Vaccine** 16(11-12):1122-6, 1998.

SIERRA, M.G.; MEDINA, I.P.; RODRIGUEZ, G.H.; JUAREZ-ISLAS, V.; SOLORZANO, T.A.; VILLALPANDO, J.R.; FELIX, A.M. **Rabies virus antigenic characterization in support of rabies surveillance in Mexico: one of the first approaches for rabies control and prevention** In XI Reunion Internacional sobre avances en la investigation y control de la rabia en las Américas, 18-21 outubro, Lima, Perú, 2000.

SIKES R.K. Pathogenesis of rabies in wildlife. I Comparative effect of varying doses of rabies virus inoculated into foxes and skunks **Am J Vet Res**; **23** 1041-7, 1962.

SMITH, J.; YAGER, P.; e BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibodies. **Bull W.H.O.** 48, 535-541, 1973.

SMITH J., MCELHNNNEY L.M., HEATON P. R., BLACK E. R., LOWINGS JP. Assessment of template quality by the incorporation of an internal control into a RT-PCR for the detection of rabies and rabies-related viruses. **J Virol Methods** 2000; **4**:107-15.

SCHMIDT, U. e SCHMIDT, C. Echolocation performance of vampire bat (*Desmodus rotundus*). **Z.Tierpsychol** **45**(4):349-58, 1977.

STEECE R.S. e CALISHER, C.H. Evidence for prenatal transfer of rabies virus in the mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*) **Journal of Wildlife Diseases** **25** (3):329-334, 1989.

STEECE, R.S.; ERICKSON, T.J.; SIEM, R.A. Chiropteran rabies in Minnesota: 1976-1980. **Journal of Wildlife Diseases** **18**:487-489, 1982.

STEECE, R.S. & ALTENBACH J.S. Prevalence of rabies specific antibodies in the mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*) at Lava cave, New Mexico. **Journal of Wildlife Diseases** **25**(4):490-496, 1989.

SCHOWALTER, D.B. Characteristics of bat rabies in Alberta. **Can.J. Comp.Med.****44**:70-76, 1980.

SOUZA, M.C.A.M. Epidemiologia da raiva: Aspectos biológicos e sorológicos do vírus da raiva obtidos de morcegos *Desmodus rotundus* capturados no Vale do Paraíba, região sudeste do Brasil. [dissertação de mestrado-Fac.Med.Vet.Zoot.-USP] São Paulo, 1995.

SULKIN, S.E., KRUTZSCH, P. WALLIS, C. e ALLEN, R. Role of brown fat in pathogenesis of rabies in insectivorous bats (*Tadarida b. mexicana*) **Proc. Soc. Exp. Biol. and med.** **96**-461-464, 1957

SULKIN, S.E. KRUTZSCH, P.H.; ALLEN R., WALLIS.C. Studies on the pathogenesis of rabies in insectivorous bats I. **J. Exp. Med.** **110**:369-388, 1959.

TADDEI, V.A. Morcegos, algumas considerações sistemáticas e biológicas. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. **Boletim Técnico** **172**, 30pg, 1983.

TADDEI, V.A. Sistemática de quirópteros. **Boletim Instituto Pasteur** São Paulo, **1**(2):3:15, 1996.

THOMPSON, R.D.; MITCHELL, G.C.; BURNS, R.J. Vampire bat control by systemic treatment of livestock with na anticoagulant **Science** **177**:806-808, 1972.

TRAJANO, E. e SOBRINHO, R.B. O morcego hematófago. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. **Boletim Técnico 142**, 25 pg., 1980.

TOLSON, N.D.; CHARLTON, K.M.; CASEY, G.A.; KNOWLES, M.K.; RUPPRECHT, C.E.; LAWSON, K.F. e CAMPBELL, J.B. Immunization of foxes against with a vaccinia recombinant virus expressing the rabies glycoprotein. **Archives of Virology 102**:297-301, 1988.

TORRES S. e QUEIROZ LIMA, E. A raiva e sua transmissão por morcegos hematophagos infectados naturalmente. **Revista Depto Nacional Produção Animal 2**:1-55, 1935.

TORRES S. e QUEIROZ LIMA, E. A raiva e os morcegos hematófagos. Morcegos que resistem a infecção tornam-se portadores e eliminadores do vírus? **Revista Depto Nacional Produção Animal 3**:165-174, 1936.

TRIMARCHI e DEBBIE, Naturally occurring rabies virus and neutralizing antibody in two species of insectivorous bats of New York State. **Journal of Wildlife Diseases 13**, 366-369, 1977.

TUTLE, M.D. **Bats, order Chiroptera** in Allen, T.B. & Scoth S.L. Wild animals of North America. National Geographic Society. Washington, 1979b.

UIEDA, W.; HAYASHI, M.M.; GOMES, L.H.; SILVA, M.M.S. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil **Boletim Instituto Pasteur, São Paulo, 1(2)**:17-35, 1996.

VILLALOBOS, R.; ROCHA, A. GUAQUETA, A. **Variantes antigênicas del virus rábico en Colombia** In XI Reunion Internacional sobre avances en la investigation y control de la rabia en las Américas, 18-21 outubro, Lima, Perú, 2000.

VILLA-RAMIREZ, B. **The ecology and biology of vampire bats and their relationship to paralytic rabies**. Report to the government of Brazil. UNDP/FAO Report TA 2656, 16 pg., 1969.

WARNER, C.K.; ZAKI, S.R.; SHIEH, W.J.; WHITFIELD, S.G.; SMITH, J.S.; ORCIARI, L.A.; SHADDOCK, J.H.; NIEZGODA, M. WRIGHT, C.W.; GOLDSMITH, C.S.; SANDERLIN, D.W.; YAGER, P.A.; RUPPRECHT, C.E. Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in Peru. **American Journal Tropical Medicine Hygiene 60(3)**:502-7, 1999.

WEBSTER, L.T. e DAWSON, J.R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. **Proc.Soc.Biol.Med. 32**:570-3, 1935.

WIKTOR, T.J., MACFARLAN, R.I. REAGAN, KJ, DIETZSCHOLD, B. CURTIS, P.J. WUNNER, W.H. KIENY, M-P, LATHE, R. LECOCQ, J-P, MACKETT, M. MOSS, B. KOPROWSKI, H. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. **Proceedings of the National Academy of Science USA** **81**:7194-7198, 1984

WIKTOR, T.J. MACFARLAN, R.I. DIETZSCHOLD, B. RUPPRECHT, C.E. e WUNNER, W.H. Immunogenic properties of vaccinia recombinant virus expressing the rabies glycoprotein. **Annals of the Institute of Pasteur Virology** **136E**:405-411, 1985.

WILSON, D.E. **Bats in question**. The Smithsonian Institution Press. Washington and London, 168 pg., 1997.

WIMSATT, W.A. e GUERRIERI, A. Care and maintenance of the common vampire bat in captivity. **Journal of Mammalogy**, **42**(4)449-52, 1961.

WIMSATT, W.A. e GUERRIERI, A. Observations on the feeding capacities and excretory functions of captive vampire bats. **Journal of Mammology**, **43**(1):17-27, 1962.

WIMSATT, W. A. Transient behavior, nocturnal activity patterns, and feeding efficiency of vampire bats (*Desmodus rotundus*) under natural conditions. **Journal of Mammology** **50**(2):233-244, 1969.

WORD HEALTH ORGANIZATION - **Technical Report Series**-Expert Committee on rabies- eighth report, Geneve, 1992.

WORD HEALTH ORGANIZATION - WORLD HEALTH ORGANIZATION **World Survey of Rabies** n° 32, 1996.

Anexos

Anexo 1- Casos de raiva humana notificados segundo o tipo de animal agressor. Brasil, 1986-00.

AGRESSOR	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	2000	Total
CÃO	28	44	27	44	50	49	38	38	16	27	20	18	17	21	24	461
GATO	1	3	2	1	2	3	2	4	2	1	1	3	2	0	1	28
MORCEGO	4	2	4	2	11	8	14	5	3	2	1	1	4	2	0	63
SILVESTRES*	3	1	2	3	2	5	2	2	0	0	1	0	3	0	0	24
OUTROS**	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	7
IGNORADO	2	6	1	7	8	5	3	1	1	2	2	2	0	2	0	42
TOTAL	39	58	36	58	73	70	60	50	22	32	25	25	26	25	26	625

Fonte: FNS/CENEPI/CGVEP

* raposas, macacos, gambás, caitutu e gato selvagem

** herbívoros e suínos

Anexo 2: Raiva animal segundo espécie, Brasil, 1994 a 2000

espécie/ano	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Total
bovina	1488	2634	3276	2570	1099	2628	2660	16355
canina	672	641	1058	945	1746	970	761	6793
eqüina	328	311	247	211	79	325	320	1821
felina	55	45	107	65	118	93	69	552
silvestres*	45	55	46	36	84	37	61	364
ovina/porcina/caprina	22	43	44	87	39	6	28	269
Total	2610	3729	4778	3914	3165	4059	3899	26154

Fonte: OPAS - Fonte (1998): FNS/CENEPI/ICGVEP

*1994 (41 morcegos, 3 primatas e 1 raposa)

*1995 (22 raposas, 13 morcegos, 4 primatas, 4 não especificado)

*1996 (25 raposas, 15 morcegos, 1 primata, 5 não especificado)

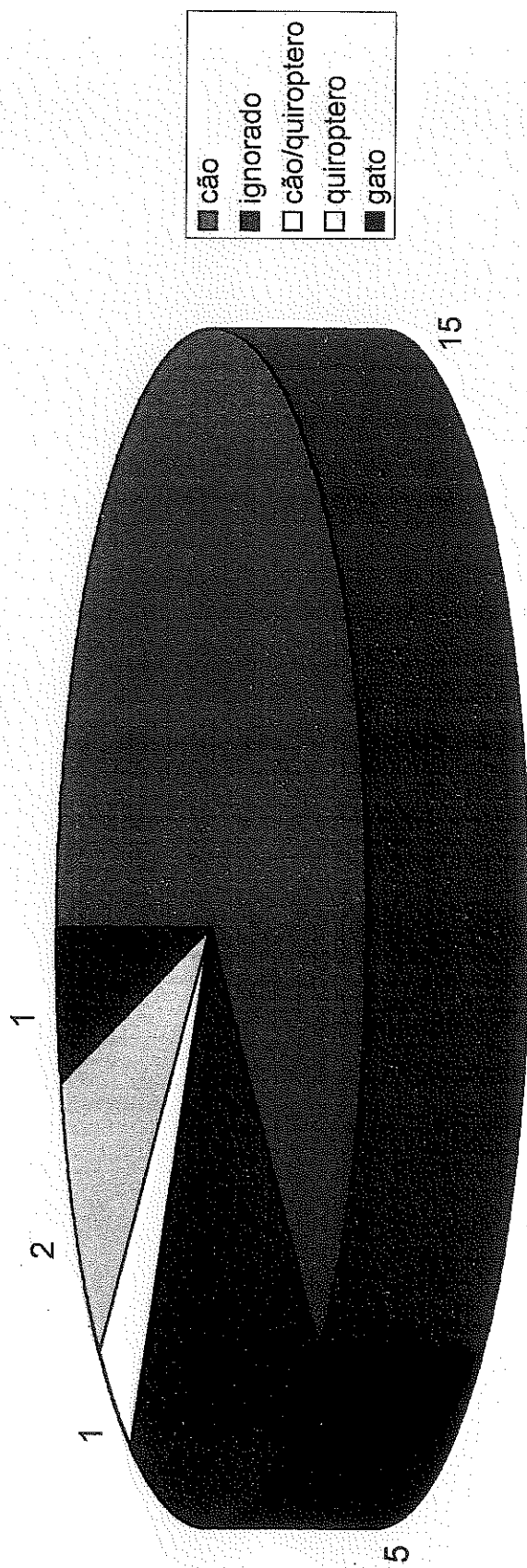
*1997 (17 raposas, 11 morcegos, 2 primatas, 2 quatis e 4 não especificado)

*1998 (não especificado)

*1999 (15 raposas, 10 morcegos, 1 primata, 3 cangambá, 8 não especificado)

*2000 (22 raposas, 30 morcegos, 5 primatas, 4 não especificado)

Anexo 3: Casos de raiva humana segundo provável espécie animal transmissora. Estado de São Paulo, 1983 a 2001



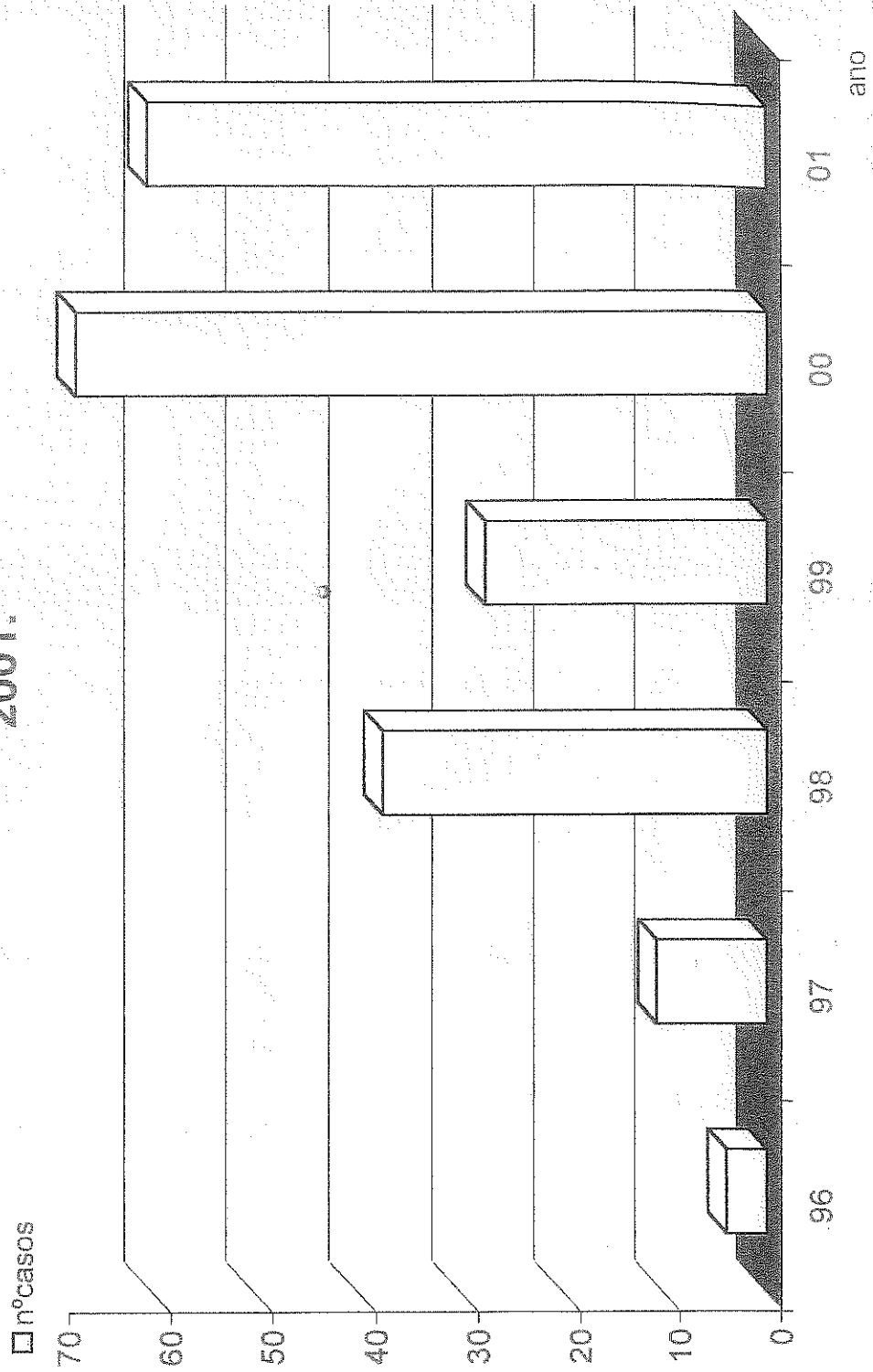
Fonte: SVE/SP-Raiva

Anexo 4: Raiva animal, Estado de São Paulo, 1995 a 2001.

	95	96	97	98	99	00	01	Total
cães	158	95	11	7	4	4	8	279
gatos	11	9	0	0	1	0	4	21
morcegos	2	4	11	38	28	68	60	151
bovinos	169	77	149	188	431	621	424	1635
equinos	32	12	23	35	104	230	185	436
silvestres	0	0	0	0	0	1	0	1
ovino	1	0	2	1	1	8	7	13
suino	1	0	0	0	0	4	9	5
bubalino	0	1	0	1	3	0	2	5
asinino	0	0	1	0	1	1	0	3
caprino	0	0	1	0	2	1	1	4
muar	0	0	0	0	1	6	14	7
Total	374	198	198	270	576	944	714	3274

Fonte: SES -IP- Coordenação do Programa de Controle de Raiva

Anexo 5: Raiva em quirópteros, Estado de São Paulo, 1996-2001.



Sintomas: nos herbívoros o sintoma principal é a paralisia. Na fase inicial, os animais se isolam, emitem mugidos frequentes e roucos, têm dificuldade para urinar e defecar, apresentam sinais de engasgo e andar cambaleante. Por paralisia dos membros posteriores, deitam-se, não conseguindo mais se levantar, até morrer.

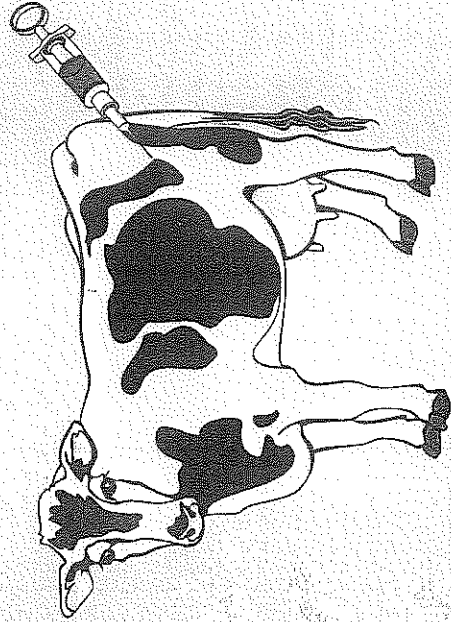
O CÉREBRO DOS ANIMAIS COM SINTOMAS DA RAIVA DEVE SER ENCAMINHADO PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.

O controle da raiva dos herbívoros deve ser feito através de duas ações conjuntas e sistemáticas: vacinação dos rebanhos e controle de população de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*).

A vacina que deverá ser utilizada é a inativada. Em animais que nunca foram vacinados (primovacinados), a recomendação é a de duas doses, com intervalo de 30 dias, a partir do 3º mês de idade.

A revacinação, em áreas epidêmicas, é, obrigatoriamente, de 6 em 6 meses e, em áreas endêmicas, anualmente.

VACINAÇÃO SISTEMÁTICA DE HERBÍVOROS



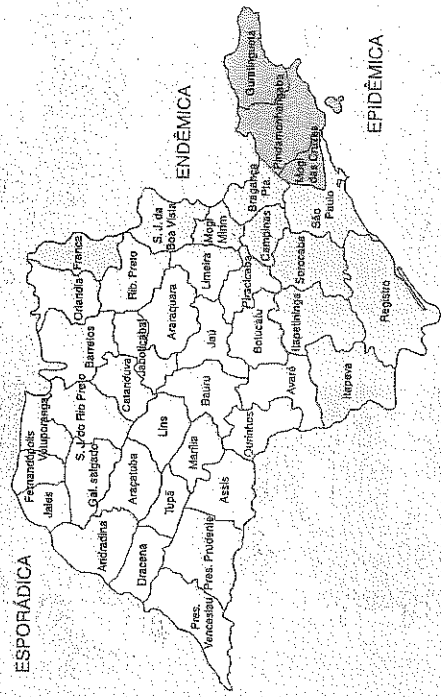
Controle da população de morcegos hematófagos é feito, atualmente, utilizando-se pasta anticoagulante (vampiricida), que pode ser aplicada no dorso dos morcegos ou no local da mordedura nos herbívoros. Esta pasta, uma vez ingerida pelos morcegos, provoca hemorragias que levam a sua morte.

Quando a pasta é pincelada no dorso de um morcego, ela é distribuída para outros, visto o hábito

que estes animais têm de se lamberem. Quando é pincelada na mordedura nos herbívoros, ela é ingerida pelos morcegos, que têm o hábito de retornar, na maioria das vezes, à mesma presa, para se alimentarem.

O sucesso das campanhas oficiais de controle da raiva depende da participação dos produtores, vacinando seus animais e notificando focos e abrigos de morcegos hematófagos.

ÁREAS EPIDEMIOLÓGICAS DE RAIVA DOS HERBÍVOROS, SEGUNDO OS ESCRITÓRIOS DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO



A RAIVA É UMA ZOONOSE.

NUNCA MANIPULAR MORCEGOS OU ANIMAIS COM OS SINTOMAS DE RAIVA E NÃO INGERIR CARNE OU LEITE DOS ANIMAIS SUSPEITOS DEVIDO AO RISCO DE CONTRAIR A DOENÇA.

RESPEITE A SAÚDE DE SEU SEMELHANTE. NÃO COMERCIALIZE ANIMAIS SUSPEITOS OU PRODUTOS DESTES ANIMAIS.

PARA ONDE ENVIAR MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO DE RAIVA

LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA

Centro de Controle de Zoonoses / SMS / PMSP

Rua Santa Eulália, 86 – Santana

Fone: (011) 290-9755 – Fax: (011) 299-9823

Instituto Biológico / SAA

Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 – V. Mariana

Fone: (011) 572-9822 – Fax: (011) 570-4234

Instituto Pasteur / CIP / SES

Av. Paulista, 393 – Paraíso

Fone: (011) 288-0088 – Fax: (011) 289-0831

LABORATÓRIOS CREDENCIADOS

Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP

Campus de Aracatuba – R. Clóvis Pestana, 793 – Jd. Amélia

Fone: (018) 622-4542

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP

Campus de Botucatu – Distrito de Rubião Jr, s/nº

Fone: (014) 821-2121 – R. 2270

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

R. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87

Cidade Universitária – SP

Fone: (011) 818-7653

Laboratório Regional de Aracatuba – Inst. Biológico

Av. Alcides Fagundes Chagas, 122

Fone: (018) 623-0447 / 623-8110 R. 54

Laboratório Regional de Pindamonhangaba – Inst. Biológico

R. Soldado Roberto Marcenon, 324

Fone: (012) 242-5499

Laboratório Regional de Presidente Prudente – Inst. Biológico

Rod. Raposo Tavares Km 563

Fone: (018) 222-8688



Contato Técnico:

Ivanete Kofalt (IP/CIP/SES)

Celso Alberto Gonçalves (CAIT/SAA)

Nilton Fidalgo Peres (CAII/SAA)

Maria Conceição A. Macedo Souza (IB/SAA)

Coordenação do Programa de Controle da Raiva

do Estado de São Paulo

Comissão Especial de Raiva dos

Herbívoros e Quirópteros

HERBÍVOROS

RAIVA DOS

É uma doença incurável, sempre fatal, causada por um vírus da família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus*, que infecta mamíferos, principalmente os bovinos, eqüinos, suínos, cães, gatos, morcegos e outras espécies.

É também um grave problema de saúde pública, porque atinge o homem, colocando em risco sua vida.

Na zona rural, o principal transmissor é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, causando prejuízos econômicos da ordem de 15 milhões de dólares no Brasil. Na raiva humana, os morcegos já ocupam o segundo lugar em importância como espécie transmissora, sendo, ainda, a espécie canina a principal.

Sintomas: nos herbívoros o sintoma principal é a paralisia. Na fase inicial, os animais se isolam, emitem mugidos frequentes e roucos, têm dificuldade para urinar e delectar, apresentam sinais de engasgo e andar cambaleante. Por paralisia dos membros posteriores, deitam-se, não conseguindo mais se levantar, até morrer.

O CÉREBRO DOS ANIMAIS COM SINTOMAS DA RAIVA DEVE SER ENCAMINHADO PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.

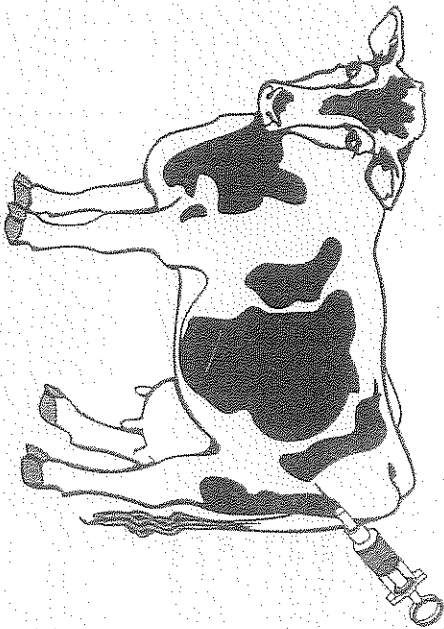
O controle da raiva dos herbívoros deve ser feito através de duas ações conjuntas e sistemáticas: vacinação dos rebanhos e controle de população de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*).

A vacina que deverá ser utilizada é a inativada. Em animais que nunca foram vacinados (primovacinações), a recomendação é a de duas doses, com intervalo de 30 dias, a partir do 3º mês de idade.

A revacinação, em áreas epidêmicas, é, obrigatoriamente, de 6 em 6 meses e, em áreas endêmicas, anualmente.

Anexo 6 b

VACINAÇÃO SISTEMÁTICA DE HERBÍVOROS



O controle da população de morcegos hematófagos é feito, atualmente, utilizando-se pasta anticoagulante (vampinida),

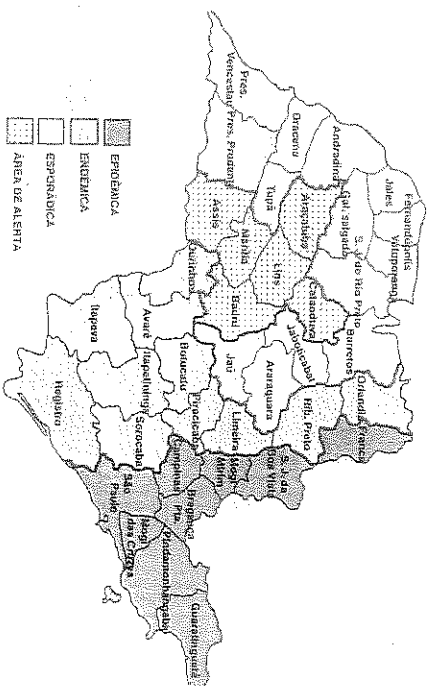
que pode ser aplicada no dorso dos morcegos ou no local da mordedura nos herbívoros. Esta pasta, uma vez ingerida pelos morcegos, provoca hemorragias que levam a sua morte.

Quando a pasta é pincelada no dorso de um morcego, ela é distribuída para outros, visto o hábito

que estes animais têm de se lambem. Quando é pincelada na mordedura nos herbívoros, ela é ingerida pelos morcegos, que têm o hábito de retornar, na maioria das vezes, à mesma presa, para se alimentarem.

O sucesso das campanhas oficiais de controle da raiva depende da participação dos produtores, vacinando seus animais e notificando focos e abrigos de morcegos hematófagos.

ÁREAS EPIDEMIOLÓGICAS DE RAIVA DOS HERBÍVOROS, SEGUNDO OS ESCRITÓRIOS DE DEFESA AGRPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO



A RAIVA É UMA ZONOSE.

PARA ONDE ENVIAR MATERIAL
PARA DIAGNÓSTICO DE RAIVA

LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA

Centro de Controle de Zoonoses / SMS / PMSP

Rua Santa Eulália, 86 - Santana

CEP: 02031-020 - São Paulo / SP

Fone: (011) 6221-9755 - Fax: (011) 6221-9823

Instituto Biológico / SAA

Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 - V. Mariana

CEP: 04014-002 - São Paulo / SP

Fone: (011) 572-9822 - Fax: (011) 570-4234

Instituto Pasteur / CIP / SES

Av. Paulista, 393 - Paraíso

CEP: 01311-000 - São Paulo / SP

Fone: (011) 288-0088 - Fax: (011) 289-0831

LABORATÓRIOS CREDENCIADOS

Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP

Campus de Aracatuba

R. Clóvis Pestana, 793 - Jd. Amélia

CEP: 15035-040 - São Paulo / SP

Fone: (018) 622-4542

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP

Campus de Botucatu

Distrito de Rubião Jr., s/nº

CEP: 18618-000 - Botucatu / SP

Fone: (014) 6821-2121 - R. 2270

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

R. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - Cid. Universitária

CEP: 05508-900 - São Paulo / SP

Fone: (011) 3818-7653

Laboratório Regional de Pindamonhangaba - Inst. Biológico

R. Soldado Roberto Marcondes, 324

CEP: 12400-000 - Pindamonhangaba / SP

Fone: (012) 242-5499

Laboratório Regional de Presidente Prudente - Inst. Biológico

Rod. Raposo Tavares km 563

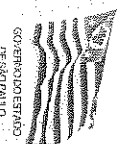
CEP: 19100-000 - Presidente Prudente / SP

Fone: (018) 222-8688

**NÃO ESQUEÇA DE
VACINAR OS EQUÍDEOS**



SECRETARIA
DE ESTADO DA
SAÚDE



Conteúdo Técnico:

Ivanete Kotait (IP/CIP/SES)

Celso Alberto Gonçalves (CATI/SAA)

Nilton Fidalgo Ferraz (CATI/SAA)

Maria Conceição A. Macedo Souza (IB/SAA)

Coordenação do Programa de Controle da Raiva

do Estado de São Paulo

Comissão Especial de Raiva dos

Herbívoros e Quípteros

Órgãos envolvidos com o
controle de raiva dos herbívoros

Secretaria de Agricultura e Abastecimento

Secretaria de Estado da Saúde

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Prefeituras Municipais

TIRAGEM REVISADA E ATUALIZADA

ANO: 2000

ARTE FINAL: SUZETE J. DA SILVA

RAIVA DOS HERBÍVOROS

É uma doença incurável, sempre fatal, causada por um vírus da família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus*, que infecta mamíferos, principalmente os bovinos, eqüinos, suínos, cães, gatos, morcegos e outras espécies.

É também um grave problema de saúde pública, porque atinge o homem, colocando em risco sua vida.

Na zona rural, o principal transmissor é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, causando prejuízos econômicos da ordem de 15 milhões de dólares anuais no Brasil. Na raiva humana, os morcegos já ocupam o segundo lugar em importância como espécie transmissora, sendo, ainda, a espécie canina a principal.

Anexo 7: Raiva em quirópteros segundo hábito alimentar,

Estado de São Paulo, 1992 a 2001

hábito alimentar	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	Total
não hematófago				2	2	7	17	9	13	20	2
insetívoro											66
frugívoro						2	16	8	13	11	50
hematófago	6	1	4	2	2	2	5	11	42	25	87
não identificado					0	0	0	0	0	0	5
Total	6	1	4	2	4	11	38	28	68	61	223

Fonte: SES -IP- Coordenação do Programa de Controle da Raiva

Atividades da ADESP em 2002 (até setembro)

VACINAÇÃO

Ano de 2000 400.000 bovinos vacinados

Ano de 2001 2.800.000 bovinos vacinados

Maio de 2002

EDA	CRIADORES			BOVINOS		
	EXISTENTES	VACINARAM	%	EXISTENTES	VACINADOS	%
BOTUCATU	2802	2753	98,25%	296108	292581	98,81%
BRAGANÇA PAULISTA	5110	5054	98,90%	145028	143927	99,24%
CAMPINAS	1745	1597	91,47%	97619	94719	97,03%
CATANDUVA	3638	3670	99,24%	199395	197647	99,12%
DRACENA	5014	4963	98,98%	512959	500792	97,63%
FRANCA	2886	2809	97,33%	232940	231578	99,42%
GUARATINGUETÁ	4484	4194	93,53%	242440	231993	95,69%
ITAPETINGA	6231	5816	93,34%	355190	349958	98,53%
ITAPEVA	4524	4518	93,66%	311037	290644	93,44%
LIMEIRA	2223	2091	94,06%	110106	100792	91,54%
MOGI DAS CRUZES	685	432	62,97%	31132	16660	53,51%
MOGI MIRIM	2231	2123	95,16%	95955	94195	98,17%
ORLÂNDIA	1538	1538	100,00%	123674	123674	100,00%
PINDA MONTE ALEGRE	5223	5446	93,53%	307617	297642	96,76%
PIRACICABA	2757	2555	91,35%	192472	183623	95,40%
REGISTRO	1903	1738	91,33%	79030	75146	95,09%
RIBEIRÃO PRETO	2482	1904	76,71%	154520	139214	90,09%
SÃO JOÃO DA BOA VISTA	4191	3741	89,26%	254571	246971	97,01%
SÃO PAULO	520	520	100,00%	8711	8711	100,00%
SOROCABA	4887	4651	95,17%	175983	168765	95,90%
TOTAL	66076	62113	94,00%	3926487	3789232	96,50%

CONTROLE DA POPULAÇÃO DE HEMATÓFAGOS

ATIVIDADES	Unidade de Medida	TOTAL
VISITAS A PROPRIEDADES COM ATAQUE DE MORCEGOS	Nº VISITAS	4.721
INSPEÇÃO DE REBANHOS	Nº REBANHOS	3.412
INSPEÇÃO DE ABRIGOS	Nº DE ABRIGOS	3.741
CAPTURAS EM ABRIGOS	Nº CAPTURAS	743
CAPTURAS NOTURNA	Nº CAPTURAS	281
ANIMAIS TRATADOS C/ANTICOAGULANTE	Nº BOVINOS	238
ANIMAIS TRATADOS C/ANTICOAGULANTE	Nº EQUINOS	215
ANIMAIS TRATADOS C/ANTICOAGULANTE	Nº SUÍNOS	16
ANIMAIS TRATADOS C/ANTICOAGULANTE	Nº CAPRINOS / OVINOS	12
D. ROTUNDUS CAPTURADOS	Nº MORCEGOS	10.036
PROPRIEDADES QUE RECEBERAM ORIENTAÇÃO TÉCNICA	Nº PROPRIEDADES	8.320
PESSOAS QUE RECEBERAM ORIENTAÇÃO TÉCNICA	Nº PESSOAS	12.568
PALESTRAS PROFERIDAS	Nº PALESTRAS	82
PARTICIPANTES DA PALESTRA	Nº PESSOAS	626
ESCOLAS VISITADAS	Nº ESCOLAS	19
PROFESSORES ORIENTADOS	Nº PROFESSORES	51
ALUNOS ORIENTADOS	Nº ALUNOS	287

Fizemos o trabalho de mutirão em Piracicaba, Campinas e Franca.



NÚMERO DA LICENÇA 107/00	Nº de Registro no IBAMA	PERÍODO DE VALIDADE 20/01/2000 a 20/01/2001	PROCESSO IBAMA 02027.003666/00-20
-----------------------------	-------------------------	--	--------------------------------------

OBJETO:

- CAPTURA /COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- COLETA/ TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO/ PESQUISA CIENTÍFICA
- TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA
- EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES
- OUTROS (ESPECIFICAR)

FAVORECIDO:

- ZOOLOGICO
- INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA
- PESQUISADOR
- EXPOSITOR / CONCURSIONISTA
- CRIADOURO CONSERVACIONISTA
- CRIADOURO COMERCIAL
- CRIADOURO CIENTÍFICO
- OUTROS -

FAVORECIDO - ESPECIFICAÇÃO:

NOME: Marilene Fernandes de Almeida -Faculdade de Medicina da USP

ENDEREÇO: Depto de Fisiopatologia Experimental - Faculdade de Medicina da USP

Av. Dr. Arnaldo , 455, São Paulo CEP 01246-903

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA/CAPTURA):

TRANSPORTADOR: Marilene Fernandes de Almeida

MEIO DE TRANSPORTE: rodoviário

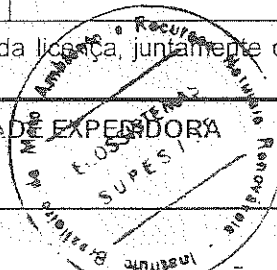
PROCEDÊNCIA /LOCAL/DA PESQUISA: estado de São Paulo

DESTINO: Depto de Fisiopatologia Experimental - Faculdade de Medicina da USP

Quantidade	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
00/00/10	<i>Desmodus rotundus</i>	morcego

Obs.É obrigatório o envio de relatório de atividades após o término da licença, juntamente com cópia da mesma.

DATA DE EMISSÃO	ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA
SÃO PAULO, 16/02/2000	Jorge Linhares Ferreira Jorge IBAMA / SP



- VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO NACIONAL.
- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DUA): INSTITUIÇÕES IDENTIFICADAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.
- VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.

amsf.



NÚMERO DA LICENÇA 20/2001	n.º de registro no IBAMA	PERÍODO DE VALIDADE- Maio/2001 a maio/ 2002	PROCESSO IBAMA N.º 02027.003666/00-20
------------------------------	--------------------------	--	--

OBJETO:	FAVORECIDO:
<input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA/ COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO	<input type="checkbox"/> ZOOLOGICO
<input checked="" type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO	<input type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTIFICA
<input type="checkbox"/> COLETA/ TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO/ PESQUISA CIENTIFICA	<input checked="" type="checkbox"/> PESQUISADOR
<input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA	<input type="checkbox"/> EXPOSITOR/CONCURSIONISTA
<input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES	<input type="checkbox"/> CRIADOUROCONSERVACIONISTA
<input type="checkbox"/> OUTROS (ESPECIFICAR)	<input type="checkbox"/> CRIADOURO COMERCIAL
	<input type="checkbox"/> CRIADOURO CIENTIFICO

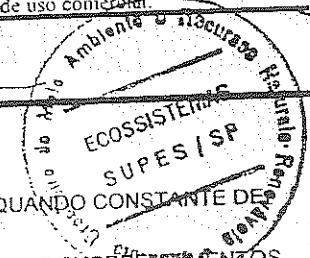
FAVORECIDO - ESPECIFICAÇÃO

NOME: Marilene Fernandes de Almeida
 ENDEREÇO: Depto de Fisiopatologia Experimental - Faculdade de Medicina da USP - Av. Dr. Arnaldo, nº 455, São Paulo/SP CEP 01246-903
 INSTITUIÇÃO: Faculdade de Medicina Experimental da USP
 RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA/CAPTURA): Marilene Fernandes de Almeida
 TRANSPORTADOR: o pesquisador favorecido
 PROCEDÊNCIA / LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA - estado de São Paulo
 DESTINO: Depto de Fisiopatologia Experimental - Faculdade de Medicina da USP

LISTA DAS ESPÉCIES QUANT. (TIPO)	NOME CIENTIFICO	NOME COMUM
00/00/10	Desmodus rotundus	morcego

Observações: 1. Os responsáveis pela Expedição deverão apresentar relatório final ao término da validade desta licença, e encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objetos da presente licença
 2. Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte da espécie vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *in situ*, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial.

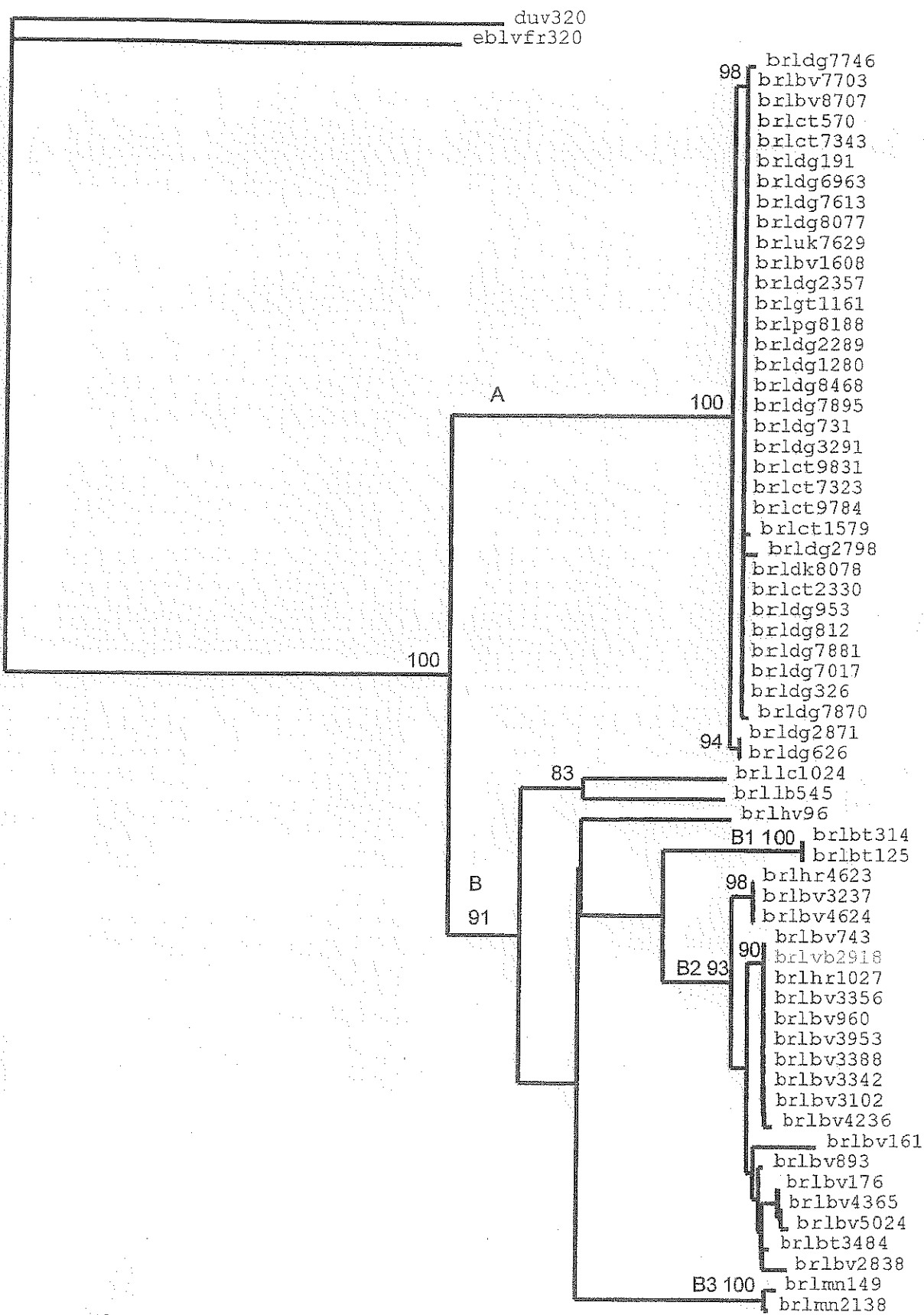
DATA DE EMISSÃO São Paulo 18/05/2001	ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA Murli Penteadó - Ecossistemas/IBAMA/SP
---	--



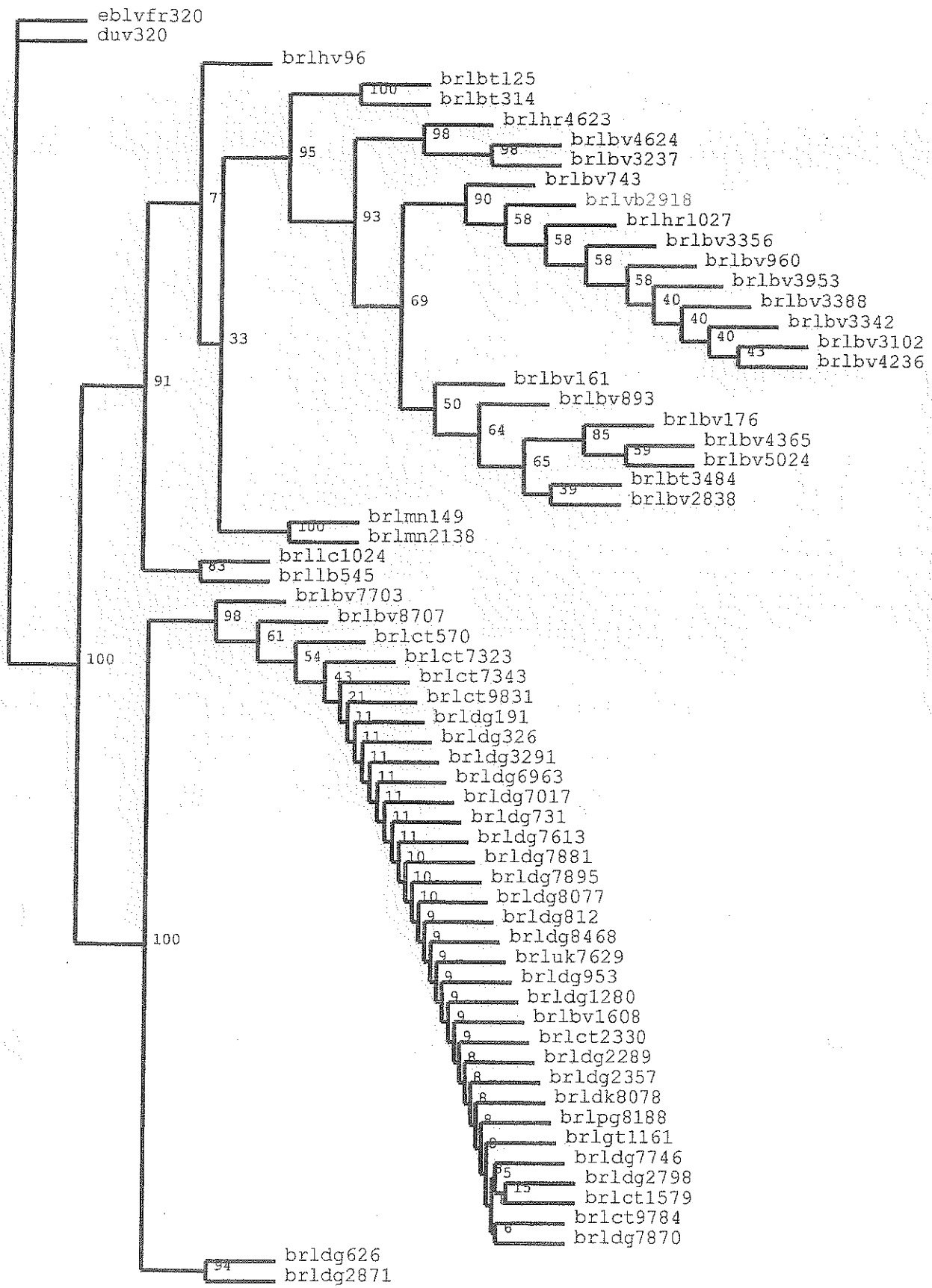
- VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO NACIONAL.
- ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:
 1. CAPTURA/COLETA E TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO CONSTANTE DE PROJETO ESPECÍFICO APROVADO
 2. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO
 3. CAPTURA/ COLETA/ TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL
 4. CAPTURA / COLETA/ TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSETIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE
 5. EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS OU MATERIAL BIOLÓGICO
- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR): INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.
- VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.

FICHA INDIVIDUAL DE CONTROLE

LOCAL DE CAPTURA:		DATA:
ANILHA	PESO	
SEXO		
OBS		
COLETA DE SANGUE:		DATA:
ml		
TÍTULO DE AcN:	UI/ml	PESO
OBS		
SALIVA		PESO
OBS		
INFECCAO DATA		ml via intra-muscular
CEPA: Desmodus rotundus		DL50ICC
OBS		
VACINA DATA:		ml
VIA		PESC:
OBS		
COLETA DE SANGUE:		DATA:
ml		
TÍTULO DE AcN:	UI/ml	PESO
OBS		
DESAFIO DATA:		ml via intra-muscular
TÍTULO DE AcN:	UI/ml	PESO
CEPA: Desmodus rotundus		DL50ICC
OBS		
SALIVA		PESO
OBS		
SALIVA		PESO
OBS		
SALIVA		PESO
OBS		
SALIVA		PESO
OBS		
SALIVA		PESO
OBS		
SALIVA		PESO
OBS		
EUTANASIA DATA		
IFD:		IC:
OBS		



brlsolo3nei1



100

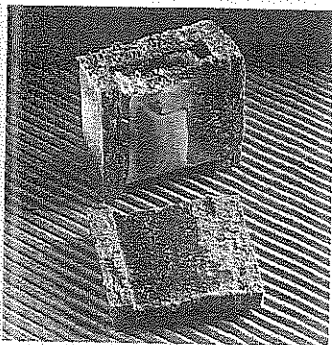
briso3nei

RABORAL V-RG Baits

RABORAL V-RG consists of a fishmeal polymer bait that is hollowed out through the center. This not only provides a strong attractant to raccoons, but also is strong enough to withstand being dropped from airplanes. A toll-free number is imprinted on each bait allowing anyone who comes in contact with the bait to call for expert advice.



A sachet containing rabies vaccine is inserted into the baits and sealed in with wax (bait shown cut open below). When the raccoon bites into the bait, the sachet is ruptured allowing the vaccine to flow into the raccoon's mouth and throat.



RABORAL V-RG

INTRODUCTION

RABORAL V-RG is a product developed and manufactured using state-of-the-art biotechnology. The product is specifically designed to impede or prevent the spread of lethal rabies disease in raccoons. Since rabies is spread by animal-to-animal contact, vaccination of a significant number of raccoons may effectively establish a barrier between rabies enzootic and uninfected areas. Over time, repeat vaccination campaigns may reduce the reservoir of susceptible raccoons.

While a program to vaccinate raccoons against rabies may reduce the rate of infection in wild animals, the main objective of any rabies vaccination program is to limit the exposure of domestic animals to rabid wild animals. Because people are more likely to contact domestic animals, the ultimate goal is to protect the human population from rabies.

A raccoon vaccination program does not and is not intended, in any way, to eliminate the need for vaccination of pets or other domestic animals. All animal owners are encouraged to have their animals vaccinated in accordance with local, state, or federal regulations by qualified veterinarians.

INDICATIONS

RABORAL V-RG is recommended for the oral vaccination of raccoons against disease caused by pathogenic rabies virus. The vaccine is restricted for use in rabies control programs approved and directed by an appropriate federal or state agency. Control of the use of the vaccine rests with the sponsoring agency which has the responsibility to define conditions for proper use in its program. Assessment of such factors as raccoon population, baiting densities, competitive species, habitat, methods and frequency of distribution, public awareness, safety procedures, and any appropriate parameters is the responsibility of the sponsoring state or federal agency.

COMPOSITION

RABORAL V-RG is composed of vaccine-filled plastic sachets contained in fishmeal polymer baits. The vaccine is a Category III recombinant virus which means it contains a live virus vector which carries and expresses a foreign gene. In this case, the viral vector is vaccinia virus and the expressed gene product is rabies virus glycoprotein. This vaccine cannot cause rabies because it expresses only the antigen which is important in inducing immunity. It has been demonstrated safe in more than 60 species of animals including primates. It has been shown to be effective in protecting raccoons against virulent rabies challenge in controlled studies in the United States. The vaccine contains gentamicin as a preservative.

ROUTE OF ADMINISTRATION

This vaccine is effective when administered by the oral route.

PACKAGING AND STORAGE

Shipped refrigerated. Store refrigerated 2-7°C (35-45°F). Do not freeze. Each bait contains one single-dose sachet ready for field use.

QUALITY CONTROL

The quality of RABORAL V-RG is confirmed by testing for:

PURITY - Tested for bacteria, fungi, and mycoplasma to assure no detectable contaminants in accordance with USDA requirements.

POTENCY - Tested to assure each lot meets or exceeds the viral content required in accordance with Production Outline specifications approved by USDA.

SAFETY - Tested for safety to assure no adverse effects are attributable to the vaccine in accordance with USDA requirements.

IDENTITY - Tested to ensure the vaccinia virus identity and to confirm the expression of rabies in accordance with USDA requirements.

PRECAUTIONARY MEASURES

Labels are printed on each bait, clearly identifying the recombinant vaccine and listing a toll-free phone number to contact for the phone number for the appropriate public health authorities. It is recommended that public education should be conducted prior to distribution of the baits to inform local communities as to the purpose of distribution, the type of vaccine, times and areas of distribution, public health concerns, and reasons for not disturbing the baits. This education may include newspaper articles, local television and radio reports, public meetings, and the distribution of brochures and posters. In certain areas, signs may be posted at the periphery and at strategic points within the distribution area notifying visitors of rabies control efforts and warning them not to disturb the vaccine-filled baits.

The local public health authorities in the areas where the recombinant rabies vaccine is used should be notified prior to the distribution of the baits. This notification should include instructions for addressing animal and human exposure to the vaccine.

The key personnel conducting the rabies control programs should be trained in the appropriate precautions and techniques for handling and distributing the vaccine-filled baits. All personnel who will be handling the vaccine should be nonpregnant adults at least 18 years of age, who are free of any known immunosuppressive conditions.

Any adverse reactions observed in the areas where the recombinant rabies vaccine is used should be reported to the licensed manufacturer, who will forward this information to the USDA-APHIS, Center for Veterinary Biologics.

Mail or fax the reports to: **MERIAL**
 Rabies Vaccine - Program Director
 115 Transtech Drive
 Athens, GA 30601
 Telephone: (706) 548-9292 or 1-800-765-7724
 Fax: (706) 548-0608
 E-mail: raboral@merial.com
 Web site: www.merial.com
MERIAL, INC. USDA License No. 298
 MERIAL Product Code 3214R-01 RABR-VRG Raccoon

ma. Akim
e. Chéroux

Bési P 0AA000363



254, rue Marcel Merieux
69007 Lyon - France
TEL : (33) 04 72 72 30 00
Fax : (33) 04 72 72 34 91

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Anexo 13

PRODUCT : RABORAL V-RG

COMMERCIAL LOT : 00H472

MANUFACTURING DATE : 24/08-2000

EXPIRY DATE : 04/09-2001



FINAL PRODUCT TESTING

DOCUMENT 1

CONTROLS	TECHNIQUES	RESULTS	DATES
<u>Physico-chemical controls</u>			
pH	10 010	7.14	01.08.00 / 18.08.00
<u>Sterility</u>			
Bacterial and fungal sterility	11 000	No growth	02.08.00 / 30.08.00
<u>Identity</u>	000 582	Positive fluorescence	11.09.00 / 14.09.00
<u>Titration</u>	00 584	10 ^{6.6} TCID 50	04.09.00 / 11.09.00
<u>Safety on dogs</u>	001920	2/2 healthy dogs	02.08.00 / 16.08.00

All manufacturing processes were carried out at MERIAL (LYON - FRANCE).

We certify that this product satisfies the registration file requirements.

LYON, 11 DEC. 2000

M. DAUVERGNE
Head of Quality Control



Comissão de Ética para Análise de Projetos de
Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.09.01, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 276/01, intitulado: "Imunização de morcegos hematofagos *Desmodus rotundus* em cativeiro, com vacina recombinante de glicoproteína rábica em vírus vaccinia, veiculada em pasta de vaselina", da Área de Fisiopatologia Experimental.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Eduardo Massad

Pesquisador Executante: Dra. Marilene Fernandes de Almeida

CAPPesq, 13 de setembro de 2001.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Encaminhe-se à CPG-FMUSP

para as devidas providências.

S.P., 18/09/01

Prof.ª Maria Mízi Brentani
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
em Ciências
Área de Fisiopatologia Experimental

18/09/01
181910

Anexo 15 : Temperatura media mensal, moda da temperatura máxima e mínima mensal, na sala do cativeiro de *Desmodus rotundus*, no periodo de 16 de julho de 2001 a fevereiro de 2002.

	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês
temperatura in	19,7	22,2	23,1	21,7
temperatura out	20,4	21,6	23,8	23,7
moda temperatura mínima	19,5	23	22,9	22,4
moda temperatura máxima	20,4	22,2	23,8	23,4

	5º mês	6º mês	7º mês	8º mês
temperatura in	22,8	22,1	23,5	22,5
temperatura out	23,6	23,1	23,8	23,2
moda temperatura mínima	23,1	21,7	23,2	21,4
moda temperatura máxima	23,8	22,5	23,6	23,5