

*Artigo original*

## **Método de diagnóstico *antemortem* da raiva humana por meio de técnicas de biologia molecular, utilizando saliva e biópsia de pele da região da nuca**

### ***An antemortem method for diagnosis of human rabies by molecular techniques using saliva and neck-skin biopsy***

**Juliana Galera Castilho; Carla Isabel Macedo; Saulo de Oliveira Santos; Rafael de Novaes Oliveira; Samira Maria Achkar; Maria Luiza Carrieri; Ivanete Kotait; Pedro Carnieli Jr.**  
Instituto Pasteur, São Paulo, SP – Brasil

#### **RESUMO**

Por meio das técnicas de RT-PCR com *primers* direcionados para o gene da glicoproteína e RT-PCR e hemi-nested RT-PCR com *primers* direcionados para o gene da nucleoproteína, o RNA do vírus da raiva foi identificado em 95,2% de 21 amostras, 18 de saliva e três de biópsia de pele da região da nuca, coletadas entre a hospitalização e a morte de um paciente com sinais clínicos da raiva. O tratamento administrado ao paciente incluiu a indução de coma e terapia antiviral. Cada técnica, isoladamente, detectou RNA viral em 90,5%; 57,1% e 85,7% das amostras, respectivamente. Nossos resultados sugerem que a amplificação em paralelo de diferentes regiões do genoma do vírus da raiva pode fornecer maior confiabilidade ao diagnóstico *antemortem* da doença, auxiliando a decisão médica quanto à aplicação do protocolo de tratamento com antivirais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Raiva. Diagnóstico *Antemortem*. Reação em cadeia da Polimerase.

**ABSTRACT**

By using RT-PCR with primers targeted to the glycoprotein gene and RT-PCR and hemi-nested RT-PCR with primers targeted to the nucleoprotein gene, rabies viral RNA was identified in 95.2% of 21 samples, 18 of saliva and three of neck-skin biopsy, taken between hospitalization and death from a patient with clinical signs of rabies. Treatment administered to the patient included induction of coma and antiviral therapy. Each technique in isolation detected viral RNA in 90.5%, 57.1% and 85.7% of the samples, respectively. Our findings suggest that the parallel amplification of different regions of the genome of rabies virus can provide greater reliability to the *antemortem* diagnosis of rabies assisting medical decision regarding the application of the protocol treatment with antivirals.

**KEYWORDS:** Rabies. *Antemortem* Diagnosis. Polymerase Chain Reaction.

**INTRODUÇÃO**

A raiva é uma doença aguda, progressiva e fatal, causada por um vírus RNA da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, denominado vírus da raiva (RABV). O genoma do RABV é composto por RNA de fita simples, polaridade negativa, de aproximadamente 12kb e codifica cinco proteínas estruturais.<sup>1</sup> Apesar do grande progresso obtido no desenvolvimento de vacinas e no controle da doença, o número anual de mortes por raiva no mundo é estimado em 55.000.<sup>2</sup> No Brasil, 166 casos de raiva humana foram confirmados no período de 2000 a 2010.<sup>3</sup>

O diagnóstico da raiva humana apenas baseado em sintomatologia clínica é difícil e incerto, exceto quando sinais específicos de hidrofobia e aerofobia estão presentes.<sup>4,2</sup>

A raiva deve ser incluída como diagnóstico diferencial nos casos de encefalites infecciosas agudas e progressivas de origem desconhecida, independentemente de histórico de agressão animal.<sup>5</sup> O diagnóstico precoce pode eliminar

custos com testes diagnósticos desnecessários e tratamentos médicos inapropriados.<sup>6</sup> Além disso, também reduz o número de pessoas potencialmente expostas ao vírus durante o contato com o paciente e permite a identificação de pessoas que são candidatas ao tratamento profilático.<sup>7,8</sup>

As amostras usadas para o diagnóstico *antemortem* incluem soro, líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva, decalque de córnea e biópsia de pele da região da nuca.<sup>9-11,6,8</sup> As técnicas convencionais, como detecção de antígeno, detecção de anticorpos e isolamento viral, têm sucesso limitado e as duas últimas são demoradas. As técnicas de biologia molecular para diagnóstico *antemortem* da raiva humana vêm sendo aprimoradas, provando serem bastante promissoras.<sup>12,13,4,11</sup>

Os relatos de cura da raiva em dois pacientes, um nos Estados Unidos em 2004<sup>14</sup> e um no Brasil em 2008,<sup>15</sup> tornaram ainda mais necessário o aperfeiçoamento de técnicas rápidas e confiáveis

para monitorar o paciente durante o tratamento. O adequado diagnóstico *antemortem* deve ocorrer antes da utilização da terapia experimental, especialmente porque não existem ainda drogas antivirais licenciadas para raiva.<sup>5</sup>

Assim, o Instituto Pasteur, no Brasil, vem realizando e aprimorando protocolos baseados em técnicas moleculares para a identificação e caracterização molecular do RABV a partir de amostras de biópsia de pele da região da nuca e saliva coletadas em pacientes suspeitos de raiva. Um destes pacientes apresentou elevado número de amostras, coletadas em dias consecutivos, acarretando a possibilidade de realizar avaliação destes protocolos.

O presente estudo foi realizado para verificar, na rotina do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur – SP, a eficiência de um protocolo preestabelecido de diagnóstico

*antemortem* de raiva humana utilizando saliva ou biópsia de pele da região da nuca. O protocolo em questão utiliza técnicas de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) e heminested PCR (hnPCR) com *primers* específicos direcionados aos genes da glicoproteína (G) e nucleoproteína (N) do RABV.

## MATERIALE MÉTODOS

### Amostras

Foram coletadas 21 amostras (3 de folículo piloso e 18 de saliva) de um paciente com diagnóstico clínico epidemiológico de raiva, entre 19/06/09 a 06/07/2009 (Tabela 1). Esses paciente foi submetido ao tratamento utilizando o Protocolo de Milwaukee modificado, denominado Protocolo de Recife,<sup>15</sup> a partir do 5º dia de internação.

**Tabela 1.** Resultados de RT-PCR, hnPCR e IVC de amostras de paciente tratado com o protocolo de Milwaukee modificado

Amostras Código/tipo	Data da coleta	Primers utilizados para RT-PCR e hnPCR			IVC
		21G-304*	304-504**	GA3222-40/GB4119-39*	
IP4384/09 - saliva	19/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4385/09 - saliva	20/06/2009	POS	NEG	POS	IMP
IP4386/09 - saliva	21/06/2009	POS	POS	POS	IMP
IP4387/09 - saliva	22/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4388/09 - biópsia de pele	22/06/2009	POS	POS	POS	NR
IP4493/09 - biópsia de pele	23/06/2009	POS	POS	POS	NR
IP4494/09 - saliva	23/06/2009	NEG	NEG	NEG	POS
IP4495/09 - saliva	24/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4496/09 - saliva	25/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4578/09 - saliva	26/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4579/09 - saliva	27/06/2009	POS	POS	POS	IMP
IP4580/09 - biópsia de pele	27/06/2009	NEG	POS	POS	NR
IP4582/09 - saliva	28/06/2009	POS	POS	POS	IMP
IP4583/09 - saliva	29/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4687/09 - saliva	30/06/2009	NEG	POS	POS	IMP
IP4688/09 - saliva	01/07/2009	NEG	NEG	POS	IMP
IP4690/09 - saliva	02/07/2009	NEG	POS	POS	IMP
IP4784/09 - saliva	03/07/2009	NEG	POS	POS	POS
IP4785/09 - saliva	04/07/2009	NEG	POS	POS	POS
IP4786/09 - saliva	05/07/2009	NEG	POS	NEG	IMP
IP4787/09 - saliva	06/07/2009	NEG	POS	POS	IMP

POS – positivo. NEG – negativo. NR – não realizado. IMP – impossibilitado devido à morte dos animais em até 3 dias da inoculação. IVC – inoculação viral em camundongos.

\* primers utilizados na RT-PCR. – \*\* primers utilizados na hnRT-PCR

### Inoculação viral em camundongos (IVC)

As suspensões de saliva foram inoculadas intracerebralmente em camundongos de acordo com a técnica descrita por Koprowski.<sup>16</sup> Devido ao pequeno tamanho, as amostras de biópsia da região da nuca não foram utilizadas nesse teste, sendo apenas utilizadas nos testes moleculares.

### RT-PCR E hnPCR

O RNA foi extraído de 300µL das amostras de saliva (n=18) e de 0,6g das amostras de biópsia (n=3) utilizando Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de biópsia foram cortadas em pequenos fragmentos com bisturi estéril. O vírus fixo CVS (Challenge Virus Standard) foi usado como controle positivo, e material extraído de cérebro de camundongos não infectados e água ultra-pura foram usados como controles negativos.

Foram utilizados os *primers* 21G, 304 e 504<sup>17</sup> direcionados a região correspondente ao gene N. Inicialmente, a RT-PCR foi realizada com os *primers* senso 21G e antisenso 304. Em seguida, os produtos de PCR foram utilizados para a realização da hemi-nested PCR (hnPCR) com os *primers* senso 504 e antisenso 304. Os *primers* senso GA3222-40 e antisenso GB4119-39<sup>18</sup> direcionados a região correspondente ao gene G foram utilizados para a realização da RT-PCR. As reações foram realizadas como descritas por

Macedo et al.<sup>11</sup> As sequências e posições dos primers utilizados estão descritas na Tabela 2. Assim, as amostras descritas na Tabela 1 foram testadas com três conjuntos de primers: 21G/304 e 304/504 (alvo=gene N) e GA3222-40/GB4119-39 (alvo=gene G) e foram produzidos fragmentos de 1478pb, 248pb e 915pb, respectivamente.

### Sequenciamento de DNA e análise filogenética

Os fragmentos amplificados foram purificados com GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences™) e sequenciados usando *primers* senso e antisenso com DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Biosciences™) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram determinadas em Analisador Genético - ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As sequências N e G foram alinhadas com sequências homólogas recuperadas do GenBank usando o método CLUSTALW e o software BioEdit.<sup>19</sup> Alinhamentos foram então usados para a elaboração de árvores filogenéticas usando o método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-joining*) com modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros e 1.000 bootstrap de repetições para suporte estatístico usando Mega 2.1.<sup>20</sup>

**Tabela 2.** Primers utilizados nas reações de RT-PCR e hnPCR

Primer	Sequência	Posição
21G <sup>17</sup>	5'-ATGTAACACCTCTACAATG -3'	55-73
304 <sup>17</sup>	5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT -3'	1514-1533
504 <sup>17</sup>	5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT -3'	1286-1317
GA3222-40 <sup>18</sup>	5'-CGCTGCATTTTRTCARAGT -3'	3221-3239
GB4119-39 <sup>18</sup>	5'-GGAGGGCACCATTTGGTMTTC3'	4116-4135

## RESULTADOS

Os resultados de IVC e RT-PCR podem ser visualizados na tabela 1. Das 18 amostras de saliva, nove apresentaram resultado positivo pelo IVC. As técnicas moleculares (RT-PCR e hnPCR) utilizadas simultaneamente apresentaram 94,4% de positividade (n= 17) demonstrando a presença do vírus e/ou RNA viral na saliva do paciente desde o momento da internação até o óbito.

Quando analisados separadamente os resultados de RT-PCR de cada conjunto de *primers* verificamos que o conjunto direcionado ao gene da glicoproteína foi o que detectou o RNA viral em maior número de amostras de saliva (94,11%), e o conjunto 21G/304 o menor (58,8%).

O conjunto de *primers* 21G/304 também não permitiu a detecção do RNA viral na amostra de folículo piloso IP4580/90 que apresentou resultado positivo quando testada pelos dois outros conjuntos. As amostras IP4388/90 e IP4493/90 apresentaram resultado positivo pelos três conjuntos de *primers*.

Dezoito amostras (85,7%) foram positivas pela técnica de hnPCR utilizando *primers* 504 e 304 e 19 (90,5%) pela técnica de RT-PCR utilizando *primers* GA3222-40 e GB4119-39. Os resultados obtidos pelos dois conjuntos de *primers* foram divergentes somente para três amostras. Quando considerados os resultados obtidos pelos três conjuntos, 20 (95,2%) foram positivas.

Destas 20 amostras, 8 também foram positivas pela IVC. O resultado das amostras de saliva restantes não pôde ser confirmado devido à morte dos camundongos nos primeiros três dias após a inoculação, possivelmente devido à toxicidade das amostras, uma vez que seringas com filtro esterilizante foram utilizadas para remover a contaminação bacteriana. Uma amostra de saliva que apresentou resultado

negativo pelas técnicas moleculares foi positiva pela IVC (Tabela 1).

A análise filogenética das sequências (dados não apresentados) revelaram que o paciente foi infectado com vírus compatível com linhagem de canídeo brasileiro (variante 2), confirmando a investigação epidemiológica que relata agressão por cão.

## DISCUSSÃO

A maioria dos casos de raiva continua a ocorrer devido à falta de biológicos a preços acessíveis ou disponibilidade de profilaxia apropriada.<sup>21</sup> A combinação de um rápido diagnóstico, vacinas aperfeiçoadas, descoberta de medicamentos e conhecimentos acadêmicos em mecanismos básicos de doença permitirá um avanço nas futuras tentativas de prevenção, de controle e, em última análise, o tratamento da raiva.<sup>5</sup>

O diagnóstico da raiva baseado em sintomas clínicos por si só é difícil e não confiável. Os casos suspeitos de raiva humana, portanto, exigem diagnóstico laboratorial preciso e rápido. O exame *postmortem* de decalques de sistema nervoso central utilizando a imunofluorescência direta (IFD) é a técnica ouro para o diagnóstico da raiva.<sup>22,2</sup> A imuno-histoquímica é um teste opcional,<sup>23</sup> e a inoculação viral em cultura de células (IVCC) e IVC<sup>2</sup> são testes confirmatórios para a IFD. Entretanto, a maioria das técnicas convencionais usadas para o diagnóstico *postmortem* da raiva não são adequadas para o diagnóstico *antemortem* devido ao risco associado à realização de biópsia cerebral em paciente.<sup>9,10</sup>

O diagnóstico laboratorial *antemortem* da raiva é baseado tipicamente na detecção de antígeno viral em biópsia de pele, RNA viral em

biópsia de pele ou saliva ou anticorpos no soro ou LCR.<sup>8-10</sup> A sensibilidade dessas técnicas apresenta grande variação de acordo com o estágio da doença, o nível de anticorpos, a natureza intermitente da excreção viral e treinamento da equipe técnica.<sup>2</sup>

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos são tão específicos quanto a IFD, podem ser realizados mais rapidamente do que IVC ou IVCC e apresentam elevada sensibilidade.<sup>24,25</sup> Além disso, ao contrário da IFD, esses testes podem também detectar RNA viral em fluidos utilizados no diagnóstico *antemortem* em humanos.<sup>12</sup>

Diversos protocolos vêm sendo descritos na literatura, apresentando, entre outras, variações quanto ao tipo de amostra analisada e ao gene alvo de amplificação.

O presente estudo descreve a conduta realizada no Instituto Pasteur de São Paulo em relação ao diagnóstico molecular realizado em amostras de pacientes suspeitos de raiva. Durante os anos de pesquisa no diagnóstico *antemortem* da raiva por RT-PCR, o grupo de pesquisadores do instituto vem tentando aprimorar as técnicas moleculares no intuito de fornecer resultados rápidos e sensíveis visando à tentativa de tratamento do paciente o mais rápido possível, assim como o acompanhamento da evolução do quadro.

Todos os protocolos descritos neste trabalho vêm sendo utilizados no Instituto Pasteur no diagnóstico *antemortem* de vários pacientes (dados não apresentados). Esses outros pacientes que foram diagnosticados positivos para raiva vieram a óbito poucos dias após o início dos testes e apenas uma ou duas amostras foram analisadas. O elevado número de amostras do paciente mencionado nesse estudo, coletadas durante dias consecutivos, nos levou a relatar esse caso em particular. Além disso, demonstrou a rotina laboratorial no

monitoramento do paciente durante o tratamento. Esse monitoramento é necessário para determinar uma possível eliminação viral que permitiria a modificação e posterior término do tratamento. Infelizmente, isso não ocorreu e o RNA viral foi detectado até o momento do óbito do paciente.

Embora o RNA do RABV possa ser detectado em vários fluidos biológicos e amostras, saliva e biópsia de pele são os espécimes mais amplamente estudados em pesquisas relacionadas aos testes diagnósticos *antemortem*.<sup>6,7,10,11</sup> Dados de um grande estudo de coorte<sup>13</sup> envolvendo 43 pacientes mostraram que RT-hnPCR de biópsia de pele (98,3%) e saliva (70,2%) apresentaram maior sensibilidade que RT-hnPCR de urina (9,5%). Em outros estudos, maior taxa de positividade foi alcançada com saliva em comparação ao LCR.<sup>26,27,6</sup> Os resultados obtidos em nosso laboratório utilizando RT-PCR e hnPCR de LCR no diagnóstico *antemortem* da raiva em vários pacientes acometidos pela doença (dados não apresentados) nos levam a não indicar a amostra de LCR como a mais adequada na tentativa de diagnóstico. Por outro lado, saliva e biópsia de pele da região da nuca apresentaram resultados bastante promissores desde o início de nossos estudos.<sup>11</sup> No presente trabalho, o diagnóstico *antemortem* por RT-PCR e hnPCR a partir de amostras de biópsia de pele e saliva apresentaram 100% e 94,4% de resultados positivos, estando de acordo com os autores que sugerem essas amostras como as mais indicadas para detecção de RNA viral.

Quanto à escolha dos *primers*, o gene N é o mais conservado e cuja proteína é expressa em maior quantidade nos lissavírus, sendo o mais comum alvo de amplificação.<sup>28</sup> Macedo et al.<sup>11</sup> desenvolveu um protocolo de RT-PCR para detectar um fragmento de 248pb do gene N. Este

método foi capaz de detectar o ácido nucleico viral em 70% das amostras de biópsia de pele obtidas antes e depois do óbito. Crepin et al.<sup>6</sup> e Nagaraj et al.,<sup>29</sup> utilizando RT-PCR e RTnPCR, respectivamente, com *primers* também direcionados ao gene N, relataram taxas de positividade de 30% e 37,5%, respectivamente, em amostras de saliva. O gene da polimerase (gene L) é outra região do genoma dos lissavírus que possui blocos bem conservados. Dacheux et al.,<sup>13</sup> utilizando RT-hnPCR e *primers* direcionados a essa região, reportaram índices de positividade de 98,3% e 70,2% em amostras de saliva e biópsia de pele, respectivamente.

*Primers* direcionados ao gene G e à região intergênica G-L foram desenhados e utilizados para o diagnóstico e identificação por multiplex RT-PCR dos RABV isolados de várias espécies hospedeiras no Brasil.<sup>30,31</sup> No presente estudo, no qual utilizamos *primers* direcionados ao gene N (21G/304 e 504/304) e G (GA3222-40 e GB4119-39), obtivemos positividade de 100% e 94,4% com amostras de biópsia de pele e saliva, respectivamente, quando os resultados são considerados em conjunto.

A confiabilidade dos resultados obtidos com amostras de saliva foi verificada por uma análise realizada em paralelo utilizando IVC, uma técnica simples que possui alta sensibilidade.<sup>4</sup> Infelizmente, 9 de 18 amostras causaram a morte dos camundongos nos três primeiros dias após a inoculação, possivelmente como resultado de toxicidade. Por isso, apenas 50% dos resultados para essas amostras pôde ser verificado utilizando esta técnica. Contudo, todos os resultados de

RT-PCR e hnPCR em amostras de biópsia de pele e saliva reportadas aqui foram confirmados por sequenciamento de DNA e análise filogenética.

Quando cada conjunto de *primers* foi analisado separadamente, observamos que o conjunto 21G/304 apresentou a menor sensibilidade (57,1%).

Em contraste, o conjunto 504/304 e GA3222-40/GB4119-39 proporcionou resultados positivos para 18 (85,7%) e 19 (90,5%) das amostras, respectivamente, sendo que duas amostras negativas por hnPCR utilizando *primers* 504 e 304 foram positivas por RT-PCR utilizando *primers* GA3222-40 e GB4119-39, enquanto uma negativa por este último protocolo foi positivo em hnPCR utilizando os iniciadores 504 e 304. Isso mostra que esses dois protocolos se complementam, aumentando a confiabilidade dos resultados no diagnóstico *antemortem*.

## CONCLUSÃO

Os nossos resultados sugerem que a probabilidade de detecção *antemortem* do RNA do RABV utilizando como amostras biópsia de pele da região da nuca e saliva é elevada e que a utilização de RT-PCR e hnPCR com conjuntos de *primers* direcionados a diferentes regiões do genoma do vírus da raiva pode ser mais seguro e mais eficiente do que a utilização de um único conjunto, além de ser mais rápido do que as técnicas convencionais, aumentando a confiabilidade dos testes diagnósticos. A sua utilização pode beneficiar a aplicação e monitoramento da utilização dos protocolos de tratamento antivirais.

## REFERÊNCIAS

1. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy. Ninth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, CA: Academic Press; 2012.
2. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies, First Report; 2005. (WHO Technical Report Series, 931).
3. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Controle, vigilância e profilaxia da raiva [monografia na internet]. Brasília; 2010 [acesso em 29 dez. 2012]; Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/prog\\_vig\\_raiva\\_dados\\_ate\\_out\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/prog_vig_raiva_dados_ate_out_2010.pdf)
4. Madhusudana SN, Sukumaran SM. Antemortem diagnosis and prevention of human rabies. *Ann of Ind Acad of Neurol.* 2008;11(1):3-12.
5. Franka R, Rupprecht CE. Treatment of rabies in the 21st century: curing the incurable? *Future microbiol.* 2011;6(10):1135-40.
6. Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J. clin microbiol.* 1998; 36(4):1117-21.
7. David D, Rupprecht CE, Smith JS, Stram Y. Antemortem detection and virus characterization of three human rabies fatalities in Israel between 1996-1997. *Isr. j. vet. med [periódico na internet].* 1999 [acesso em 29 dez. 2012];54(3). Disponível em: <http://www.isrvma.org/ImageToArticle/Files/Vol%2054%203.doc>
8. Rupprecht CE, Cathleen AH, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet.* 2002;2: 327-43.
9. Trimarchi CV, Smith JS. Diagnostic evaluation. In: Jackson AC, Wunner WH, editores. *Rabies.* New York: Academic Press;2002. p. 307-49.
10. Smith J, Mcelhinney L, Parson G. Case report: rapid ante-mortem diagnosis of a human case of rabies imported into UK from Philippines. *J. med. virol.* 2003;69:1550-3.
11. Macedo CI, Carnieli Jr. P, Brandão PE, Rosa EST, Oliveira RN, Castilho JG et al. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. *Braz. j. infect. dis.* 2006; 10(5):341-5.
12. Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Ante-and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. *Expert rev. mol. diagn.* 2010;10(2):207-18.
13. Dacheux L, Reynes JM, Buchy P, Sivuth O, Diop BM, Rousset D et al. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin. Infect. dis.* 2008;47(11):1410-7.
14. Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. med.* 2005;352:2508-14.
15. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo para tratamento da raiva humana no Brasil. *Epidemiol. Serv. saúde.* 2009;18(4):385-94.
16. Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Laboratory techniques in rabies.* 4.ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 80-7.
17. Orciari LA, Niezgodna M, Hanlon CA, Shaddock JH, Sanderlin DW, Yager PA et al. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. *Vaccine.* 2001; 14(19):4511-8.
18. Sato G, Itou T, Miura Y, Mikami T, Ito M, Kurane I et al. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of RABV isolated

- from several species in Brazil. J. vet. Med. sci. 2004;66(7):747-53.
19. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 1999;41:95-8.
  20. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IE, Nei M. MEGA 2: Molecular evolutionary genetic analysis software. Evolutionary Genetics Analysis Software, Bioinformatics. 2001;17(12):1244-5.
  21. Wilde H. Failures of post-exposure rabies prophylaxis. Vaccine. 2007;25(44):7605-9.
  22. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. Laboratory techniques in rabies. 4.ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 88-95.
  23. Lembo T, Niezgodna M, Velasco-Villa A, Cleaveland S, Ernest E, Rupprecht CE. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. Emerg. Infect. dis. 2006;12(2):310-3.
  24. Bordignon J, Brasil-Dos-Anjos G, Bueno CR, Salvatiera-Oporto J, Dávila AM, Grisard EC et al. Detection and characterization of RABV in southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. Arch. virol. 2005;150(4):695-708.
  25. Franka R, Svrcek S, Madar M, Kolesarova M, Ondrejckova A, Ondrejka R et al. Quantification of the effectiveness of laboratory diagnostic of rabies using classical and molecular-genetic methods. Vet. Med. 2004;49(7):259-67.
  26. Hemachudha T, Wacharapluesadee S. Antemortem diagnosis of human rabies. Clin. Infect. dis. 2004;39(7):1085-6.
  27. Saengseesom W, Mitmoonpitak C, Kasempimolporn S, Sitprijia V. Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva samples for ante-mortem diagnosis of rabies. Southeast Asian j. trop. med. public health. 2007;38(1):53-7.
  28. Delmas O, Holmes EC, Talbi C, Larrous F, Dacheux L, Bouchier C et al. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. PLoS ONE. 2008;3(4):e2057.
  29. Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. J. clin. virol. 2006;36(1):17-23.
  30. Carnieli P Jr, Fahl WO, Brandão PE, Oliveira R de N, Macedo CI, Durymanova E et al. Comparative analysis of rabies virus isolates from Brazilian canids and bats based on the G gene and G-L intergenic region. Arch. virol. 2010;155(6):941-8.
  31. Sato G, Tanabe H, Shoji Y, Takuya I, Ito FH, Sato T et al. Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. J. clin. virol. 2005;33(4):267-73.

**Correspondência/Correspondence to:**

Juliana Galera Castilho  
 Instituto Pasteur, Av. Paulista 393  
 CEP: 01311-000, São Paulo, SP – Brasil  
 Tel: 55 11 3145-3172.  
 E-mail: juliana.castilho@uol.com.br