

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Benedito Donizete Menozzi

**Caracterização antigênica e genotípica de isolados do
vírus rábico, de quirópteros da cidade de Botucatu –
SP e região**

Botucatu
2012

Benedito Donizete Menozzi

**Caracterização antigênica e genotípica de isolados do
vírus rábico, de quirópteros da cidade de Botucatu –
SP e região**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Helio Langoni

Botucatu

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Menziozi, Benedito Donizete.

Caracterização antigênica e genotípica de isolados do vírus rábico, de
quirópteros da cidade de Botucatu – SP e região / Benedito Donizete Menozzi. –
Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu

Orientador: Helio Langoni

Capes: 40101096

1. Doenças transmissíveis. 2. Hidrofobia. 3. Morcego – Botucatu (SP)

Palavras-chave: Caracterização antigênica; Caracterização genética; Morcegos;
Vírus da raiva.

Aos meus pais **Maria Helena e Benedito** (in memoriam) que tenho certeza estão olhando por mim onde estiverem. Às minhas irmãs **Inês, Cleide e Lenita** que me fazem dar valor a cada nova conquista.

A minha sogra **Hermelinda**, pelo apoio em todos esses anos.

As minhas cunhadas **Patrícia, Valéria e Karina**, meus cunhados e principalmente amigos **Pedro (Kiko), Flávio (Cake) e Wagner (Vavá)**, que se tornaram minha família.

As duas pessoas mais importantes da minha vida, minha esposa **Karen** e meu filho **Felipe**. Ela, que foi a base de meu amadurecimento como pai e companheiro. Quantas e quantas vezes nos víamos apenas nas madrugadas e você sempre me dando forças, me incentivando. Nossa vida que foi iluminada com a chegada de nossa obra prima **Felipe** em 2001, nosso maior presente. Muito obrigado. Amo muito vocês.

Ao Professor Titular **Helio Langoni** não só pela orientação, mas também pela oportunidade em fazer parte de sua equipe no Laboratório de Zoonoses. Por lutar para que eu permanecesse, por acreditar em mim, sempre. Pelo incentivo para nunca desistir, mesmo quando os desafios pareciam intransponíveis e principalmente, pelos ensinamentos de vida. Muito obrigado.

A **Deus**, pela oportunidade de vida, da chance de desfrutar de tantos momentos intensos. Por guiar meus caminhos, pela luz nas dificuldades e por de algum modo me dizer "você consegue!". Muito obrigado Senhor.

A todos os **funcionários** e docentes do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ, pela força e pelo incentivo para realização deste trabalho.

Aos atuais **residentes** e a todos aqueles que passaram pelo Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, que de alguma maneira me ajudaram neste projeto.

A todos os **pós-graduandos** do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, por todas as conversas descontraídas e outras nem tanto.

Ao **Rodrigo Costa da Silva** que me acompanha nesta caminhada desde minha chegada ao laboratório.

Aos **funcionários** da seção de Pós-Graduação e do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio e pela atenção nos momentos que precisei.

A pós-doutoranda **Virginia Bodelão Richini Pereira**, pela essencial ajuda e extrema atenção para realização deste trabalho.

Ao **Instituto Pasteur de São Paulo**, por ceder os laboratórios para que fossem realizadas as análises que tornaram possível este trabalho. Especialmente à **Dra. Ivonete Kotait**, **Dra. Maria Luiza Carrieri** e ao pesquisador e pós-graduando **Rafael de Oliveira Novaes**.

Quem não sente a ânsia de ser mais, não chegará a ser nada.

Miguel De Unamuno

RESUMO

Menozzi B D. Caracterização antigênica e genotípica de isolados do vírus rábico, de quirópteros da cidade de Botucatu-SP e região. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2012.

Os morcegos há algum tempo vem recebendo crescente importância em Saúde Pública, pois são considerados os principais reservatórios do vírus da raiva em grande parte do mundo inclusive no Brasil. Apesar dos morcegos manterem ciclos epidemiológicos da raiva há séculos, foi nas últimas décadas que a raiva em morcegos teve seu reconhecimento, por meio de pesquisas sobre o papel destes animais no ciclo epidemiológico da doença e também sobre suas variantes e suas implicações no desenvolvimento de novos reservatórios para o vírus da raiva, principalmente em regiões onde a doença em cães foi controlada. O estado de São Paulo, sob coordenação do Instituto Pasteur, realiza a vigilância epidemiológica para raiva por meio dos laboratórios credenciados para seu diagnóstico, no Laboratório do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu - SP está credenciado recebendo material para diagnóstico de diversos municípios da região. Entre os anos de 2003 e 2010 foram diagnosticadas como positivas pelas provas de IFD e Prova Biológica, 19 amostras de quirópteros não hematófagos. Estes isolados foram caracterizados antigenicamente pelo painel de anticorpos monoclonais cedido pelo CDC-OPAS (Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA- Organização Pan-americana de Saúde), revelando que sete destes isolados pertenciam a variante 3, que tem os morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* como reservatório, além de um morcego insetívoro do gênero *Myotis* que apresentou variante 4 característica do também morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis*, além de outros três perfis não compatíveis, NC-1, NC-2 e NC-3. Todos os isolados foram submetidos a RT-PCR e seus produtos tiveram o gene da nucleoproteína (N) viral parcialmente seqüenciado gerando assim, uma árvore filogenética que agrupou estes isolados em quatro clusters, designados como linhagem *Nyctinomops*, linhagem *Myotis*, linhagem *Desmodus rotundus* e em uma nova linhagem do vírus da raiva até então não caracterizada, que aparentemente tem os morcegos do gênero *Myotis* como reservatório. Esta linhagem apresentou identidade intra-específica média de 99,8% variando de 99,6 a 100% para nucleotídeos e 100% para aminoácidos.

Palavras chave: Vírus da raiva, morcegos, caracterização antigênica, caracterização genética.

ABSTRACT

Menozzi, B.D. Antigenic and genotypic characterization of rabies virus isolates from bats from Botucatu city and region. [Dissertation]. Botucatu: Faculty of Medicine, São Paulo State University, 2012.

For some time ago, bats are receiving an increased importance in Public Health because they are considered the main reservoirs of rabies virus around the world, including Brazil. Although bats remain the rabies epidemiological cycles for centuries, only in the last decades the rabies in bats had its recognition, throughout researches focused on the role of these animals in the epidemiological cycle of the disease and also on their variants and their implications in the development of new reservoirs for rabies virus, mainly in regions where the disease in dogs was controlled. The state of São Paulo, coordinated by the Institute Pasteur, performs epidemiological surveillance for rabies through registered laboratories for its diagnosis. The labs of Zoonosis Diagnostic Service, School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP - Botucatu - SP is registered for receiving material for diagnosis of some municipalities of the region. Between 2003 and 2010, 19 samples of non-hematophagous bats were diagnosed as positive by IFD and Biological Evidence. These isolates were antigenically characterized by the panel of monoclonal antibodies donated by PAHO-CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA Pan-American Health), revealing seven of these isolates belonged to variant 3, which has the vampire bat *Desmodus rotundus* as reservoir, as well as an insectivorous bat of the genus *Myotis* presenting variant 4, characteristic of the other insectivorous bat *Tadarida brasiliensis*, and other three profiles are not compatible, NC-1, NC-2 and NC-3. All isolates were assayed by RT-PCR and their products had the nucleoprotein gene (N) viral partially sequenced, generating a phylogenetic tree that grouped these isolates into four clusters, designated as lineages *Nyctinomops*, *Myotis*, *Desmodus rotundus*, and a new lineage of rabies virus not previously characterized, which apparently has the bats of the genus *Myotis* as reservoir. This lineage showed an average intraspecific identity of 99.8%, ranging from 99.6 to 100% for nucleotides and 100% amino acids.

Keywords: Rabies virus, bats, antigenic characterization, genotypic characterization.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ABLV	Australian bat lyssavirus
AcM	Anticorpo monoclonal
AgV	Variante antigênica
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
cDNA	DNA complementar
CN	Cérebro negativo, cérebro normal
CVS	Challenger Virus Standard
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxinucleosídeo-trifosfato
DUVV	Duvenhage virus
EBLV1	European bat lyssavirus 1
EBLV2	European bat lyssavirus 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Glicoproteína do vírus da raiva
GA	Geórgia
GTs	Genótipos
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
L	Proteína L do vírus da raiva
LBV	Lagos bat vírus
M	Proteína Matriz do vírus da raiva
MCL	Maximum Composite Likelihood
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MOKV	Mokola vírus
MS	Ministério da Saúde
N	Nucleoproteína do vírus da raiva
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
P	Fosfoproteína do vírus da raiva

PANAFTOSA Centro Panamericano de Febre Aftosa

pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PV	Pasteur Virus
RABV	Rabies Virus
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonucleose
RNP	Ribonucleoproteína
RT	Transcrição Reversa
SNC	Sistema nervoso central
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tampão Tris Borato
USA	Estados Unidos da América

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Visualização de impressão positiva de vírus rábico em microscopia de imunofluorescência. Botucatu – SP, 2012.....	39
Figura 2 – Camundongos de 21 dias de idade utilizados na inoculação intracerebral em caixa de prolipropileno com tampa de metal. Botucatu – SP, 2012.....	40
Figura 3 – Inoculação intracerebral em camundongos. Botucatu – SP, 2012.....	41
Figura 4 - Árvore de distância com algoritmo Neighbor-joining, modelo evolutivo MCL para o gene N de RABV (nucleotídeos 209 ao 709) de isolados do vírus rábico de SNC de quirópteros não hematófagos. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap. Botucatu-SP, 2012.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Variantes do vírus rábico e seus reservatórios.....	31
Quadro 2 - Padrões de reação das diferentes variantes antigênicas com os anticorpos monoclonais. Botucatu, 2012.....	42
Quadro 3 - Ciclos utilizados nas PCRs para o gene N do RABV em amostras de SNC de morcegos não hematófagos.....	44
Quadro 4 - Primers utilizados nas provas de RT-PCR e sequenciamento de DNA para os genes N das amostras de RABV isoladas de morcegos não hematófagos. Botucatu-SP, 2012.....	44
Quadro 5 - Nomenclatura, símbolos e abreviaturas dos 20 aminoácidos traduzidos a partir do código genético.....	54
Quadro 6 - Substituições de aminoácidos para a proteína N, específicas para a nova linhagem encontrada. Botucatu-SP, 2012.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de morcegos examinados de acordo com ano, gênero, espécie e local. Botucatu - SP, 2012.....	38
Tabela 2 - Resultados da tipificação antigênica de isolados do SNC de morcegos não hematófagos. Botucatu - SP, 2012.....	49
Tabela 3 - Resultados das RT-PCRs para o gene N de isolados do vírus rábico de morcegos não hematófagos. Botucatu - SP, 2012.....	50
Tabela 4 - Resultados de sequenciamento de DNA para o gene N para os isolados de vírus rábico de morcegos não hematófagos. Botucatu – SP, 2012.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
H ₂ O	Água
kDa	KiloDalton
L	Microlitro
M	Micromolar
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
pmol	Picomol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
X	Veze
rpm	rotações por minuto
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 AMOSTRA VIRAL DE REFERÊNCIA.....	37
3.2 ISOLADOS DE VÍRUS RÁBICO.....	37
3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	38
3.3.1 Diluição do conjugado.....	40
3.4 INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS.....	40
3.5 CARACTERIZAÇÃO VIRAL COM ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	41
3.6 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA AMPLIAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) VIRAL.....	43
3.6.1 Extração de RNA.....	43
3.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) Transcrição Reversa (RT)	43
3.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	45
3.7.1 Purificação dos produtos de PCR.....	45
3.7.2 Reação de seqüenciamento de DNA	45
3.7.3 Edição de Sequencias.....	46
3.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	46
3.9 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS	47
3.10 ANÁLISES DE MUDANÇAS E MARCADORES MOLECULARES NAS SEQUENCIAS DE AMINOÁCIDOS TRADUZIDAS A PARTIR DAS SEQUENCIAS DE DNA.....	47

4 RESULTADOS.....	48
4.1 TIPIFICAÇÃO ANTIGÊNICA COM PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS DIRIGIDOS À NUCLEOPROTEÍNA (N) VIRAL.....	48
4.2 RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) VIRAL.....	49
4.3 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	50
4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	51
4.5 ANÁLISES DE MUDANÇAS E MARCADORES MOLECULARES NAS SEQUENCIAS DE AMINOÁCIDOS TRADUZIDAS A PARTIR DAS SEQUENCIAS DE DNA.....	53
4.5.1 Gene N.....	54
5 DISCUSSÃO.....	56
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERÊNCIAS.....	63
8 APÊNDICE.....	70
8.1 SOLUÇÃO DILUENTE.....	70
9 ANEXOS.....	71
9.1 PARECER DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA).....	71
9.2. JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO DE TÍTULO.....	72

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa, de origem viral, que afeta o sistema nervoso central, com evolução aguda e fatal que acomete predominantemente os mamíferos. Apesar dos grandes avanços científicos e tecnológicos é, ainda, um grande desafio para a saúde pública. Embora seja considerada como uma das doenças infecciosas mais antigas foi apenas no século XIX que foram obtidos os conhecimentos mais valiosos sobre a doença. O pesquisador alemão Zinke descobriu e publicou em 1804 a respeito da infecciosidade da saliva e, Galtier em 1879, a contagiosidade do tecido nervoso. Pasteur, dando continuidade os estudos de Galtier, conseguiu enorme progresso, que alcançou seu ponto culminante com a primeira vacina aplicada em humano no ano de 1885¹.

Os estudos histopatológicos de Babes (1887) e Negri (1903) conduziram ao descobrimento das inclusões patognomônicas nas células ganglionares, denominadas, posteriormente, corpúsculos de Babes-Negri ou simplesmente, Negri. A cultura do vírus rábico foi inicialmente obtida em embriões de galinha e, posteriormente, em outras culturas celulares. Isso constituiu o ponto de partida para a preparação de novas vacinas para uso humano e animal, e de melhores procedimentos para purificação e concentração do vírus¹.

Apesar destes avanços, a raiva ainda representa um sério problema de saúde pública e também causa grandes prejuízos econômicos à pecuária. Sua distribuição é mundial, com cerca de quarenta a setenta mil mortes humanas ao ano, quase todas em países em desenvolvimento, principalmente nos continentes Asiático e Africano².

É causada pelo Vírus da Raiva (RABV), um RNA vírus pertencente ao gênero Lyssavirus, família Rhabdoviridae, da ordem Mononegavirales, nas quais todos os membros apresentam genoma de RNA não-segmentado, de sentido negativo e de fita simples³.

O RABV mede de 100 a 250 nm de comprimento e 75 de diâmetro, possuindo 11932 nucleotídeos (nt) que codificam as cinco proteínas estruturais: N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de matriz), G (glicoproteína) e L (RNA polimerase). Possui envoltório externo (envelope) formado por lipídeos e trímeros da glicoproteína viral (proteína G). Abaixo do envelope existe uma camada matriz formada pela proteína M, que une o envoltório viral à ribonucleoproteína (RNP). A RNP é formada pelo RNA viral, proteínas L, P e N, sendo que a matriz M em conjunto com a RNP forma o nucleocapsídeo viral⁴.

A proteína G forma as espículas que se projetam na superfície da partícula viral, sendo responsável por induzir a produção de anticorpos neutralizantes e pela adsorção às células do hospedeiro, conferindo a característica neurotrópica do vírus⁵. Ainda a proteína G, juntamente com a proteína M, forma o envelope viral, de natureza lipoprotéica. A função da proteína M é regular a replicação e manter a ligação entre o envelope e o nucleocapsídeo⁶. O nucleocapsídeo apresenta simetria helicoidal, formado pelo complexo RNA – proteína N, que protege o genoma viral de ribonucleases e contribui para que as sequências de aminoácidos da proteína N se mantenham conservadas⁵. Apesar da imunodominância exercida pela proteína G, a proteína N também é capaz de induzir a resposta imune celular, visto que apresenta importantes epítomos reconhecidos por linfócitos T⁷. O nucleocapsídeo, juntamente com as proteínas L e P, formam o complexo

ribonucleoproteína (RNP). A proteína L é responsável pelas atividades enzimáticas imprescindíveis à transcrição e replicação do genoma viral⁵. A proteína P atua com a N no processo de encapsidação e desempenha importante função no transporte axoplasmático⁸.

A proteína N é um polipeptídeo longo com 450 aminoácidos, peso molecular de 50.500 Da, fosforilada no resíduo de serina e situa-se no interior do cilindro helicoidal do nucleocapsídeo. Tem importância estrutural na capsidização do RNA genômico, além de estar envolvida nas etapas de transcrição e replicação, já que estas etapas não iniciam sem que uma quantidade suficiente de proteína N esteja unida ao RNA genômico⁵. A nucleoproteína é considerada uma região gênica muito conservada facilitando o desenho de iniciadores hábeis na amplificação de inúmeras variantes virais^{09,10}.

O gene N é um alvo adequado para a comparação de amostras por períodos de evolução relativamente longos, sendo que estudos baseados nos mesmos demonstraram a adaptabilidade da técnica de PCR tanto para diagnóstico, como para tipagens precisas pela determinação de sua seqüência de nucleotídeos. Comparações entre seqüências de genomas inteiros ou partes dele foram realizadas, visando estudar patogenicidades distintas, quer seja com o objetivo de estudos epidemiológicos, quer seja para estudos de produção de vacinas^{11, 12}.

O gênero *Lyssavírus* apresenta-se em sete genótipos que são agrupados em dois filogrupos, genética e imunopatologicamente distintos. O filogrupo 1 inclui o vírus da raiva (RABV, genótipo 1), o vírus Duvenhage (DUVV, genótipo 4), o European bat lyssavirus tipos 1 e 2 (EBLV-1, genótipo 5

e EBLV-2, genótipo 6) e o Australian bat lyssavirus (ABLV, genótipo 7 e o filogrupo II inclui o Lagos bat vírus (LBV, genótipo 2) e o vírus Mokola (MOKV, genótipo 3). Além destes, já se reconhece outros quatro vírus considerados prováveis genótipos de Lyssavirus relacionados ao vírus da raiva, todos eles isolados de morcegos. São eles: vírus Aravan e Khujand da Ásia Central e Irkut e West Caucasian bat virus da Europa Oriental, um quinto vírus chamado Shimoni vírus, isolado no Quênia, vem sendo proposto como um novo Lyssavirus¹³.

Em termos de similaridade de sequência de aminoácidos, a proteína N é a mais conservada entre os sete genótipos dos Lyssavírus, apesar de um grau relativamente alto de diversidade genética ser encontrada em algumas pequenas regiões do gene N nos diferentes genótipos. Por essa razão para a detecção do vírus da raiva por RT-PCR, tem sido mais utilizado o gene da nucleoproteína viral⁴.

Uma importante razão para a sua maior conservação de aminoácidos, principalmente em regiões específicas, são as funções chaves para a replicação viral exercidas por essas regiões, assim, as diferenças de aminoácidos na nucleoproteína fornecem epítomos específicos e únicos capazes de diferenciar os Lyssavírus em suas variantes pelos padrões de reação de anticorpos monoclonais (AcM) para estes epítomos⁴.

Pesquisas têm sugerido que Lyssavírus que apresentam menos que 80% de similaridade na sequência de nucleotídeos e até 92% ou 93,3% de similaridade na sequência de aminoácidos pertencem a diferentes genótipos¹⁴.

Atualmente, a caracterização molecular do gene N identifica sete genótipos (GTs), compreendendo os vírus da raiva clássico RABV (GT1) e os

vírus raiva relacionados Lagos bat vírus (GT2), Mokola vírus (GT3), Duvenhage vírus (GT4), European bat Lyssavirus EBL1 (GT5) e EBL2 (GT6), e o Australian bat Lyssavirus ABL (GT7)^{15,16,17}. Para complementar o conhecimento sobre variações antigênicas dentro da diversidade genética do vírus da raiva, estudos enfocaram o(s) gene(s) N e/ou G^{09,18,19}.

Os vírus da raiva (genótipo 1) tem uma prevalência praticamente mundial. Os chamados vírus raiva-relacionados (genótipos 2, 3, 4 e EBLs 1 e 2) têm ampla distribuição geográfica na África e na Europa⁵.

O genótipo 1 está presente em todos os continentes com exceção da Oceania. Alguns países das Américas (Uruguai, Barbados, Jamaica e Ilhas do Caribe), da Europa (Portugal, Espanha, Irlanda, Grã-Bretanha, Países Baixos e Bulgária) e da Ásia (Japão) encontram-se livres da doença. Entretanto, determinados países da Europa (França, Inglaterra) e da América do Norte (EUA e Canadá) enfrentam ainda problemas quanto ao ciclo silvestre da doença. Os dados sobre a morbidade e mortalidade constituem uma única informação, uma vez que a doença apresenta quase 100% de letalidade nas diferentes espécies animais²⁰.

O genótipo 1, é o mais amplamente distribuído no mundo e tem maior importância epidemiológica dada sua associação com um maior número de casos de encefalite por Lyssavirus em humanos em comparação com outros genótipos¹⁴. Estudos moleculares do vírus têm mostrado que existem vários reservatórios para este genótipo, nos quais linhagens virais adaptadas a diferentes reservatórios se mantêm na natureza em ciclos epidemiológicos independentes. Dentro de cada ciclo, os diferentes reservatórios exercem um papel fundamental e específico na manutenção de cada linhagem viral²¹.

Todos os mamíferos são sensíveis ao vírus rábico não apresentando diferenças de sensibilidade entre sexos, e a idade tem somente importância relativa à infecção. A fonte de infecção é sempre um animal infectado, que dissemina o vírus pela mordida do cão, arranhadura do gato e também pelos acidentes com morcegos, embora a contaminação de feridas cutâneas pela saliva também resulte na transmissão²². Os Lyssavírus são muito lábeis e não conseguem manter-se no ambiente. Vários mamíferos têm servido de reservatórios em diferentes partes do mundo, principalmente os da ordem Carnívora e Chiroptera. O vírus da raiva tem sido isolado da maioria das ordens de mamíferos⁸. Apesar dos cães ainda serem as principais fontes de infecção e disseminação da doença, a fauna nativa incluindo raposas, lobos e carnívoros em geral, morcegos hematófagos e não hematófagos, são quem fornecem a maior amplitude de fontes de infecção nos países onde os carnívoros domésticos são bem controlados²³.

O vírus da raiva não atravessa a pele íntegra. Porém, é possível a infecção a partir de mucosas íntegras. Nos caninos, o vírus pode estar presente na saliva por até cinco dias antes de serem manifestados os sinais clínicos. Todavia, não está suficientemente esclarecido até que ponto os animais aparentemente saudáveis, eliminam o vírus e, portanto, podem contribuir de forma importante para a cadeia epidemiológica dentro da população animal; sendo comprovado em morcegos hematófagos²⁴.

Após a introdução do vírus, a multiplicação viral inicial, ocorre nas células dos músculos estriados, no local de penetração. As junções neuromusculares constituem importante local para a entrada do vírus no sistema nervoso, a qual também pode ocorrer nas placas motoras e terminais.

Após a entrada do vírus no sistema nervoso, há invasão neuronal inicialmente na medula espinhal e a seguir no cérebro²⁴.

O vírus segue em migração centrípeta direcionada ao encéfalo, de onde após uma segunda fase de multiplicação ocorre a sua difusão em direção centrífuga para a periferia, pelas vias nervosas. A generalização do vírus se dá pelas células de Schwann, dos nervos periféricos. Após essa fase o vírus pode ser encontrado em todos os órgãos²².

A resposta imune, durante a fase centrípeta de infecção, é mínima e explica porque os anticorpos neutralizantes e a infiltração inflamatória geralmente estão ausentes por ocasião do estabelecimento dos sinais encefálicos. Os títulos de anticorpos atingem níveis substanciais apenas nos estágios terminais da doença. Após a entrada do vírus rábico no sistema nervoso central (SNC), geralmente na medula espinhal, ocorrem ondas ascendentes de infecção e disfunção neuronal²¹.

Esse meio de disseminação se dá num período de incubação extremamente variável conforme o local da mordida. Mordidas na cabeça resultam geralmente em período de incubação mais curto. A destruição dos neurônios espinhais resulta em paralisia, mas, quando o vírus invade o cérebro, a irritação dos centros superiores produz excitação e convulsões. A morte ocorre geralmente por paralisia respiratória²².

Em humanos o período de incubação dura de duas a oito semanas, podendo variar de dez dias até oito meses. A duração do período de incubação pode depender da carga viral inoculada, bem como da gravidade da laceração.

O período de incubação é maior quando a ferida provocada pela mordedura está mais distante do SNC. À medida que a gravidade da

enfermidade avança, há espasmos nos músculos da deglutição, fenômeno conhecido como hidrofobia. Após o aparecimento destes sintomas, a duração da doença costuma ser de dois a quatro dias²⁴.

A raiva silvestre assumiu maior importância devido aos hábitos sinantrópicos dos morcegos e de outros mamíferos, que alcançaram as áreas urbanas e de transição em consequência da maior oferta de alimentos e do impacto ambiental provocado pela ação humana em seu habitat²³.

Os sinais clínicos mais destacados nos animais selvagens são a perda do seu comportamento tímido e assustado diante da presença do ser humano. As raposas apresentam-se durante o dia em lugares habitados, brigam e mordem e os cães manifestam paralisia das extremidades posteriores. As partículas virais podem ser identificadas na saliva antes, durante ou após a manifestação dos sinais clínicos^{25,26}. Na maioria dos animais silvestres, o período de excreção do vírus é pouco conhecido.

O período de incubação da raiva em morcegos é extremamente variável, desde semanas a períodos prolongados, superior a um ano. Pelo fato destes animais apresentarem taxa metabólica reduzida e possuírem características de hipotermia, o período de incubação pode ser prolongado. Há, na verdade, uma ausência de dados devido às dificuldades de realização de pesquisas e de observação de animais doentes e sadios. Os principais sintomas em morcegos hematófagos são: atividade alimentar diurna, hiperexcitabilidade e agressividade, falta de coordenação dos movimentos, tremores musculares, paralisia e morte. O período experimental médio é de 17 dias⁸.

Nos morcegos não hematófagos ocorre geralmente, paralisia sem agressividade e excitabilidade, e os espécimes são encontrados em locais não

habituais. O período de incubação nestas espécies varia, na infecção experimental, de 2 a 25 semanas. Uma vez surgidos os sintomas, a morte ocorre em poucos dias²⁷.

Os morcegos constituem uma espécie importante, representando uma séria ameaça de disseminação da raiva no ambiente rural e urbano devido aos seus hábitos sociais e migratórios. Pertencem à ordem Chiroptera, palavra derivada do grego cheir (mão) e pteron (asa). É um dos grupos de mamíferos com maior diversidade no mundo, com dezoito famílias, 212 gêneros e 1120 espécies. Representa aproximadamente 22% das espécies conhecidas de mamíferos, que hoje totalizam 5416 espécies. A ordem Chiroptera é dividida em duas subordens, os Megachiroptera e os Microchiroptera²⁸.

Os Megachiroptera não ocorrem no Brasil e são representados por apenas uma família, Pteropodidae, com 143 espécies distribuídas em florestas tropicais do Velho Mundo, África, Índia, Sudeste da Ásia e Austrália. Os Microchiroptera compreendem 17 famílias e 930 espécies, não ocorrendo apenas nas regiões polares. No Brasil, são conhecidas nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies, sendo que 41 espécies já foram diagnosticadas com raiva no Brasil, abrangendo 25 gêneros e três famílias: Phyllostomidae (43,9%), Vespertilionidae (29,3%) e Molossidae (26,8%). As famílias brasileiras, com seus respectivos números de espécies são: Emballonuridae (15); Phyllostomidae (90); Mormoopidae (4); Noctilionidae (2); Furipteridae (1); Thyropteridae (4); Natalidae (1); Molossidae (26); Vespertilionidae (24). Habitam todo o território nacional, ocorrendo na Amazônia, no Cerrado, na Mata Atlântica, no úmido Pantanal, no árido Nordeste, nos Pampas Gaúchos e nas áreas urbanas^{29,30}.

Em áreas preservadas, seus abrigos são cavernas, tocas de pedras, e ocos de árvores, mas também árvores com troncos com coloração similar à sua, ou no meio das folhas (principalmente de palmeiras), árvores caídas, raízes na beira de rios e cupinzeiros. No Brasil, nas áreas urbanas, já foram encontrados morcegos em pontes, forros de prédios e de casas de alvenaria, tubulação fluvial, pedreira abandonada, junta de dilatação de prédios, toldo de construções, churrasqueiras em quintais e até em aparelhos de ar condicionado³⁰.

Apresentam grande diversidade quanto aos hábitos alimentares. Existem aqueles que são predominantemente frugívoros, que no Brasil pertencem exclusivamente à família Phyllostomidae, que ocasionalmente são considerados prejudiciais às árvores frutíferas, pois atacam os frutos dos pomares na medida em que as matas nativas foram destruídas. Os morcegos frugívoros assumem relevante importância biológica na dispersão de sementes. Alguns botânicos afirmam que os quirópteros são os dispersores mais importantes entre todos os mamíferos e sugerem que 25% das espécies de árvores da floresta de algumas regiões tropicais são dispersas por eles. Esse potencial de dispersão está associado com seu hábito de forrageio, sua mobilidade e com as grandes distâncias que percorrem em busca de alimentos³⁰.

Os insetívoros, como os da família Vespertilionidae, se alimentam da maioria dos insetos quando em vôo. Normalmente capturam esses insetos voando em nível mais baixo do que a copa das árvores, exceto os Molossidae que voam acima dessas copas. Existem relatos de morcegos que sobem a aproximadamente três mil metros de altura para alcançar concentrações de

mariposas. Essas espécies são importantes como controladoras de insetos, já que muitos deles são daninhos à lavoura ou podem transmitir doenças como a dengue. Os polívoros e nectarívoros retiram carboidratos do néctar e proteínas do pólen das plantas, alguns são importantes como polinizadores, desempenhando papel importante na polinização de pelo menos 500 espécies de plantas neotropicais, sendo que muitas dessas plantas são economicamente importantes para a humanidade como fonte alimentar³⁰.

As três espécies de morcegos hematófagos encontradas no Brasil pertencem à subfamília Desmodontinae, divididas em três gêneros: *Desmodus*, *Diaemus* e *Diphylla*. Somente o *D. rotundus* se alimenta exclusivamente do sangue de mamíferos e é conhecido como “morcego vampiro comum”. Os incisivos superiores são longos e cortantes, o que permite abrir uma ferida de forma indolor. Ainda possuem língua sulcada que permite ao sangue fluir por capilaridade para o interior da boca^{30,31}.

A associação da raiva com morcegos hematófagos foi feita inicialmente por Carini (1911), em um surto epizootico da doença em bovinos no Estado de Santa Catarina. O primeiro caso de raiva em morcegos hematófagos no Brasil foi relatado por Haupt e Rehaag, em 1925, quando encontraram corpúsculos de Negri confirmando a hipótese de Carini. Coube ainda a estes dois pesquisadores a primeira descrição, em 1916, no Brasil, da presença do vírus rábico em um morcego não hematófago da espécie *Artibeus lituratus*³².

A distribuição epidemiológica da raiva no Brasil é heterogênea. Cerca de 70% dos casos humanos foram registrados em alguns municípios da região Nordeste, onde muitas pessoas vivem em condições de extrema pobreza, em moradias vulneráveis, e áreas onde a população animal é pequena. Os

morcegos hematófagos se alimentam diariamente, e embora tenham preferência por sangue de bovinos, suínos e equinos, podem utilizar humanos, especialmente crianças, como fonte de alimento³³.

Além da transmissão da raiva humana por morcegos hematófagos representando grave problema de saúde pública, há também grande prejuízo econômico para a produção agropecuária, sejam diretos e indiretos, acometendo especialmente bovinos e equinos. Em 2001, os prejuízos causados pela raiva em herbívoros, no Brasil, foram estimados em US\$ 37,5 milhões, merecendo destaque em algumas regiões, tais como a confluência dos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás e de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, face às suas condições topográficas e disponibilidade de abrigos naturais e artificiais para os morcegos²³.

O ciclo urbano da enfermidade continua sendo muito importante, pois 83,2% do total de casos humanos eram transmitidos por cães. A partir de 2004, este perfil epidemiológico se alterou, com numerosos casos de raiva transmitidos por morcego hematófago, principalmente no surto dos municípios de Portel e Viseu no Estado do Maranhão³⁴. Desde o final da década passada já era possível perceber o aumento do número de focos de raiva, bem como sua abrangência geográfica, e o reconhecimento da espécie *D. rotundus* interferindo no ciclo aéreo provocando inúmeros casos de raiva em morcegos não hematófagos, e também no ciclo urbano ocasionando oito dos quatorze casos da doença ocorridos em cães e gatos³⁵.

Desde 1973, por meio do programa criado pelo Ministério da Saúde (MS), que determina como medida de controle da raiva, a vacinação em massa de cães e gatos no Brasil, com o objetivo de deter o ciclo de transmissão do vírus

conseguiu-se grande redução de casos caninos e, conseqüentemente, humanos³⁶. O Ministério da Saúde (MS) pelo Programa Nacional de Controle da Raiva, considerando que a raiva em animais domésticos se encontra sob controle, direcionou seus esforços para uma nova questão, a raiva no seu ciclo silvestre que, devido aos hábitos sinantrópicos desses animais, alcançaram as áreas urbanas em consequência da maior oferta de alimento, e pelo impacto ambiental provocado pela ação humana em seus habitats²³.

Ocorreu grande aumento da população de quirópteros nos centros urbanos com a falta de planejamento nas cidades, no que diz respeito principalmente à elaboração de projetos arquitetônicos e paisagísticos³⁷. Acompanhando esse aumento populacional de quirópteros, foram intensificadas ações de Vigilância Epidemiológica, que resultou no aumento de quirópteros positivos para raiva, alertando para a circulação viral mesmo em centros em que a doença era considerada sob controle³⁸.

Na Europa, a raiva silvestre é o maior problema, tendo como principal susceptível a *Vulpes vulpes*, (raposa-vermelha) que é endêmica em vários países. Os Estados Unidos, nos últimos trinta anos, apresentaram decréscimo uniforme de casos notificados de raiva em animais domésticos, ao passo que o número de ocorrência anual em animais silvestres aumentou. O reconhecimento dos morcegos insetívoros como reservatórios do vírus da raiva na América do Norte, ocorreu no Estado da Flórida em 1953. Após este fato, inúmeros casos de raiva humana foram descritos na América do Norte, sendo os morcegos responsáveis por, aproximadamente, 10% dos casos de raiva diagnosticados, principalmente em duas espécies de morcegos insetívoros: *Lasionycteris noctivagans* e o *Pipistrellus subflavus*²³. Bovinos, raramente são

fontes de infecção, embora a possibilidade de transmissão para os humanos possa ocorrer, se a boca de um animal raivoso for manipulada durante o tratamento ou exame. O vírus pode estar presente na saliva por períodos de até cinco dias antes que os sinais clínicos sejam evidentes²³.

No período de 2004 a 2005, conforme publicação da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS) e Panafosa/OPAS, os morcegos foram os principais transmissores da raiva humana na América Latina. No Brasil, foram registrados 22 casos, em 2004, e 42 em 2005²³. Ainda no Brasil, entre 1986 e 2010, ocorreram 765 casos de raiva humana, com 137 (18%) transmitidos por morcegos. Os dados do Ministério da Saúde (MS) apontam os morcegos, como a segunda espécie responsável na transmissão de casos humanos de raiva, lugar anteriormente ocupado pelos felinos domésticos. Infelizmente esses dados não especificam o hábito alimentar dos morcegos envolvidos na transmissão³⁹.

O ataque a pessoas e casos humanos de raiva transmitida por *Desmodus rotundus* tem aumentado, principalmente na região amazônica do Peru e Brasil. Alguns destes surtos são precedidos por mudanças ambientais ou adaptação a locais como, a remoção rápida de animais domésticos, exploração de ouro ou desmatamento, processos que podem alterar o ecossistema em que o *D. rotundus* vive⁴⁰.

A transmissão da raiva ocorre não apenas entre hospedeiros da mesma espécie, mas também, pode ser transmitida para outros, de espécie diferente, que não são tidos como reservatórios naturais da doença⁴⁰. Tal fato é denominado de spillover e resulta do contato interespecies podendo levar a determinação de uma nova variante do vírus^{41,42}.

O conceito de variantes do vírus da raiva e o estudo das suas diferenças e reservatórios específicos foi consolidado com o desenvolvimento da técnica de anticorpos monoclonais (AcM) para a nucleoproteína e glicoproteína virais, no final da década de 70. Diferentes painéis destes anticorpos permitem uma identificação e classificação rápida de isolados de Lyssavirus⁴³.

Pesquisa com vírus rábico isolados de várias espécies, pela técnica de anticorpos monoclonais com painel do CDC-OPAS (Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA-Organização Panamericana de Saúde) e pelo sequenciamento genético, revelou a existência de duas variantes que se tornaram predominantes, uma mantida por populações de cães, e a outra pelo morcego *D.rotundus*¹².

Desde então, com a utilização da caracterização antigênica para a classificação do RABV, muitos avanços foram obtidos na epidemiologia da raiva, tornando-se possível determinar a distribuição geográfica e reservatórios específicos de diferentes variantes do RABV⁴⁴.

Um painel de oito AcM dirigidos à nucleoproteína viral do RABV utilizado nas Américas, permite a classificação do RABV em 11 variantes antigênicas distintas e adaptadas a diferentes reservatórios⁴⁵, apresentadas no quadro 1.

Quadro 1. Variantes do vírus rábico e seus reservatórios.

HOSPEDEIRO	VARIANTE
CÃO/MANGUSTO	1
CÃO	2
Desmodus rotundus	3
Tadarida brasiliensis	4
Desmodus rotundus	5
Lasiurus cinereus	6
LOBO DO ARIZONA	7
GAMBÁ	8
Tadarida brasiliensis mexicana	9
GAMBÁ	10
Desmodus rotundus	11

No Brasil, circulam quatro variantes antigênicas (AgV) por AcM: AgV2 (cão), AgV3 (D. rotundus), AgV4 (Tadarida brasiliensis) e AgV6 (Lasiurus cinereus). Além destas, outra variante antigênica, AgV5, já foi identificada em morcegos, não sendo comumente encontrada no país⁴⁶. Estudos utilizando este painel demonstraram a existência de pelo menos outros quatro perfis antigênicos não compatíveis⁴⁴.

A variante AgV3, (D. rotundus) já foi observada em isolamentos procedentes de sete de 17 espécies de morcegos não-hematófagos positivos para raiva, o que demonstra a sua importância como reservatório natural do vírus rábico em nosso meio, confirmando que esta espécie desempenha importante papel tanto no ciclo silvestre como também no urbano da raiva⁴⁴.

Estudo realizado com 228 amostras de 17 países da América Latina e Caribe, pela técnica de anticorpos monoclonais, revelou que as duas variantes AgV2 e AgV3 eram amplamente distribuídas na região, e que todos os isolados

humanos pertenciam a uma dessas duas variantes, além de uma amostra de animal doméstico (gato) que apresentava a variante de *D. rotundus*⁴⁵.

Estudos com essa técnica foram realizados também com amostras do Brasil, Argentina e Paraguai no período de 1987 a 1995 e do período de 1992 a 2000, e confirmaram a variante canina e do morcego hematófago como predominantes: sendo a variante de *D. rotundus* detectada em bovinos, eqüinos, raposas, morcegos hematófagos e não hematófagos. A variante canina foi detectada em cães, um humano, um búfalo, um bovino e um lhama. Além disso, detectou-se também as variantes características de morcegos insetívoros, nas espécies *Tadarida brasiliensis*, *Lasiurus cinereus* e *Molossus molossus*^{47,48}.

As variantes, canina e de *D. rotundus* também se mostraram predominantes em estudos realizados com isolados do Peru, Colômbia e Venezuela^{49,50,51}. Em um surto de raiva humana, com 29 mortes, no Peru em 1990 as vítimas relataram história de mordidas de morcegos e a caracterização antigênica do isolado de uma das vítimas era idêntica à de *D. rotundus*⁵². Outro surto com nove mortes ocorreu em 1996, e dois isolados foram analisados, indicando variante de morcego hematófago⁵³.

Na Venezuela há duas variantes de *Desmodus rotundus* circulantes e, por meio de sequenciamento genético evidenciou-se que isolados de morcego vampiro procedentes de uma região específica da Venezuela são divididos em um grupo homólogo e outro distinto, mas perfeitamente relacionados com isolados de morcegos vampiros de outros países da América Latina⁴⁹.

No Chile, o morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* é reservatório do vírus em centros urbanos e fonte de infecção de casos esporádicos reportados

em animais domésticos e humanos. A análise de amostras isoladas entre 1977 e 1998 mostrou que nenhuma delas se relacionava com amostras de reservatórios terrestres⁵⁴. O primeiro caso humano registrado no Chile ocorreu em 1996 e a caracterização antigênica e genética indicou o morcego *Tadarida brasiliensis* como reservatório do vírus⁵⁵.

A principal fonte de infecção para humanos no México era representada pelos cães, entretanto nos últimos anos as principais fontes de infecção humana são o *Spilogale putorius* (skunk manchado), *Urocyon cinereoargenteus* (raposa cinzenta), a espécie de morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* e o morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Para animais de interesse econômico, as principais fontes de infecção são o skunk (44%), os cães e raposas (27%) e morcegos hematófagos (6%)⁵⁶.

As associações entre variantes virais e hospedeiros podem permanecer por décadas ou mais tempo em áreas geográficas distintas, em vista do equilíbrio ecológico estabelecido. As características topográficas e hidrográficas das regiões favorecem a criação de barreiras físicas que impedem a movimentação animal e promovem, regionalmente, a evolução viral em hospedeiros específicos¹⁸. No entanto, a migração destes animais para áreas livres tem potencial de gerar grandes surtos⁵⁷.

Entender a evolução dos vírus da raiva é de fundamental importância para se determinar as bases da variabilidade fenotípica e genotípica das populações virais. O surgimento de variantes de vírus em novos hospedeiros e a aptidão para modificações têm importância quando se pesquisa a utilização de vacinas. Sabendo-se que pequenas mutações, por vezes de um único

aminoácido, em determinadas regiões, alteram a patogenicidade e a virulência¹².

Atualmente, a epidemiologia da raiva obteve avanços com a caracterização molecular viral, tornando possível o conhecimento da distribuição geográfica das variantes e a identificação de espécies de reservatórios⁵⁸. A aplicação de métodos de análise genética revelou que apesar das diferenças antigênicas, os isolados do vírus rábico adaptados para diferentes espécies têm conservado alterações no gene, que podem ser utilizadas como marcadores epidemiológicos⁵⁹.

A variante de morcego hematófago foi detectada em 100% das amostras de bovinos, eqüinos, ovinos, suínos, caprinos e morcegos hematófagos e em 58,3% (35) de 60 amostras de morcego não hematófago, pertencentes a sete das 17 espécies nas quais o vírus foi isolado, indicando que o morcego não hematófago está se infectando a partir do hematófago⁴⁴.

Alguns autores observam 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 considerados o elo entre a raiva rural e a raiva urbana³⁵. Pesquisas demonstraram a variante de *Desmodus rotundus* entre 1989 e 2000, em 30,8% das amostras positivas de felinos (4), em 12,2% dos cães (12) e em 8,3% das amostras de humanos (3). O fato de se detectar a variante 3 em cães e gatos mostra que o papel deste morcego no ciclo da raiva não está limitado somente a raiva silvestre⁴⁴.

O sequenciamento genético de 28 isolados de vírus rábico no período de 1989 a 1993, em diferentes espécies, identificou 26 como cepas de origem canina. Porém, dois isolados de bovinos em 1991 e 1993 foram caracterizados

como cepa de morcego *Desmodus rotundus*. Este dado demonstra que naquele momento, já havia duas variantes virais circulantes, a variante canina predominante e a variante de morcegos hematófagos. Outros 26 isolados de equinos e bovinos foram analisados no período de 1996 a 2000 e foram identificados como de *Desmodus rotundus*. A variante circulante predominante no Estado de São Paulo passou a ser a de *Desmodus rotundus*, mostrando a alteração do perfil epidemiológico da raiva no Estado^{60,44}.

Estudos genéticos realizados em isolados de RABV de morcegos insetívoros brasileiros apontam a existência de três linhagens virais gênero-específica. Tais linhagens estariam relacionadas aos gêneros *Epitesicus*, *Nyctinomops* e *Molossus*⁴².

Assim sendo, a caracterização antigênica e genética são ferramentas fundamentais para determinar e também para que se possa entender a presença dos múltiplos ciclos endêmicos e potencial de transmissão inter-espécies. A co-existência de uma variada população de morcegos com humanos e animais domésticos nos centros urbanos torna imprescindível a compreensão da epidemiologia da raiva em áreas onde não se conhece a circulação viral.

2 OBJETIVOS

2.1 Caracterização antigênica e genética de isolados do vírus rábico de quirópteros, no município de Botucatu-SP e cidades da região, por meio de um painel de anticorpos monoclonais (AcMs).

2.2 Analisar a concordância entre a classificação antigênica com anticorpos monoclonais dirigidos para a nucleoproteína viral e a classificação obtida com base no seqüenciamento parcial do gene N.

2.3 Comparar os resultados obtidos com isolados de vírus rábico já conhecidos de outras regiões brasileiras.

2.4 Conhecer as variantes virais presentes e circulantes em morcegos recebidos para o diagnóstico de raiva em Botucatu e região.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu em Reunião da CEEA de 24/09/2009, com parecer número 762.

3.1 Amostra viral de referência

O vírus fixo da raiva, amostra CVS (Challenge Virus Standard) mantido em camundongos por inoculação intracerebral, foi utilizado como controle positivo para as reações de imunofluorescência direta e transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

3.2 Isolados de vírus rábico

Foram utilizados 19 isolados de vírus rábico a partir do sistema nervoso central (SNC), de primeira e segunda passagem em camundongos inoculados com material cerebral dos seguintes gêneros/espécies de morcegos não hematófagos: quatro *Artibeus lituratus*, quatro *Artibeus* spp; dois *Myotis nigricans*, quatro *Myotis* spp.; quatro *Molossus* spp. e um *Nyctinomops* spp., como atividade de Vigilância Epidemiológica para a raiva, realizada pelas Prefeituras Municipais.

Estes animais foram encontrados moribundos ou mortos em domicílios ou vias públicas, durante o período de 2003 a 2010, no município de Botucatu (14 espécimes) e de outras 4 cidades da região sendo: Bauru (1), São Manuel (1), Dois Córregos (1) e Piratininga (2), apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição de morcegos examinados de acordo com ano, gênero, espécie e local. Botucatu-SP, 2012.

Amostra	Ano	Gênero/Espécie	Cidade
233	2003	<i>Artibeus lituratus</i>	Botucatu
274	2004	<i>Molossus</i> spp.	Botucatu
180	2005	<i>Molossus</i> spp.	Botucatu
419	2005	<i>Artibeus</i> spp.	Botucatu
169	2006	<i>Molossus</i> spp.	Bauru
245	2006	<i>Artibeus lituratus</i>	Botucatu
291	2006	<i>Artibeus</i> spp.	Botucatu
320	2006	<i>Artibeus</i> spp.	Botucatu
394	2006	<i>Myotis</i> spp.	São Manuel
691	2006	<i>Myotis</i> spp.	Botucatu
096	2007	<i>Nyctinomops</i> spp.	Botucatu
206	2007	<i>Artibeus</i> spp.	Botucatu
105	2008	<i>Molossus</i> spp.	Dois Córregos
205	2008	<i>Myotis</i> spp.	Piratininga
211	2008	<i>Myotis</i> spp.	Piratininga
122	2009	<i>Artibeus lituratus</i>	Botucatu
204	2009	<i>Artibeus lituratus</i>	Botucatu
024	2010	<i>Myotis nigricans</i>	Botucatu
063	2010	<i>Myotis nigricans</i>	Botucatu

A classificação em gênero/espécie dos morcegos estudados foi realizada por meio de chaves taxonômicas^{61,62}.

3.3 Imunofluorescência direta (IFD)

A técnica de imunofluorescência direta com utilização de anticorpos fluorescentes (imunoglobulinas anti-rábicas marcadas com isotiocianato de fluoresceína = conjugado anti-rábico) baseia-se no exame microscópico de impressões de fragmentos de tecido nervoso, “tratados” com conjugado específico e submetidos à luz ultravioleta. O antígeno rábico, reagindo com o conjugado e iluminado com luz ultravioleta (comprimento de onda de 260 nanômetros), emite uma luz esverdeada fluorescente.

Foi realizada a técnica adaptada de Dean et al⁶³, onde impressões do material cerebral analisado foram feitas em lâminas de microscopia de 26 x 76 mm. A secagem das lâminas ocorreu em estufa à 37C e a fixação em acetona

gelada por quatro horas. Decorrida esta etapa, retirou-se as lâminas da acetona e novamente foram secas em estufa à 37C.

Concluída a etapa anterior, foram adicionados cerca de 25µL das soluções de CVS e CN, sobre cada impressão. Seguiu-se com uma incubação das lâminas em estufa a 37°C dentro de uma câmara úmida por 30 minutos. Transcorrido este tempo, procedeu-se uma primeira lavagem das lâminas em SST pH 8,5, e após, as mesmas permaneceram imersas nesta solução por 10 minutos, repetiu-se este procedimento e as lâminas foram levadas para secar em estufa à 37C. Ocorrida à secagem total das mesmas, sua montagem se deu com glicerina tamponada pH 8,5 e lamínulas de 22 x 22 mm.

A leitura do teste foi feita em microscópio de imunofluorescência com objetiva de 10x e ocular de 40 da marca (Carl Zeiss). As impressões positivas apareceram como partículas brilhantes de cor esverdeada, com diferentes formas, como ovaladas ou arredondadas, e de diferente tamanhos (figura 1).

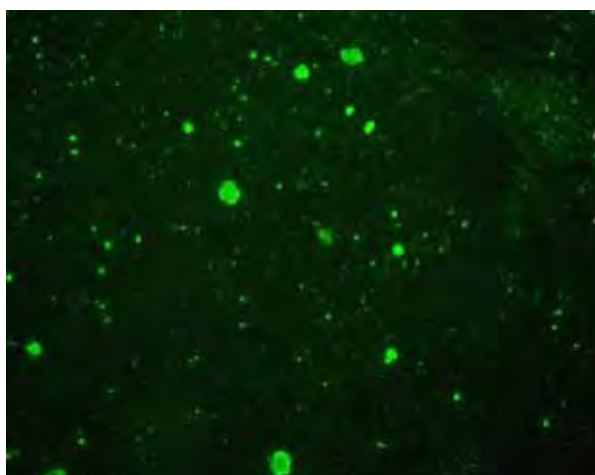


Figura 1: visualização de impressão positiva para o vírus rábico, em microscópio de imunofluorescência. Botucatu – SP, 2012.

3.3.1 Diluição do conjugado

O conjugado utilizado na IFD foi cedido pela Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo. O mesmo é dirigido para a detecção do nucleocapsídeo viral do vírus rábico. A sua diluição foi realizada em suspensão de cérebros de camundongos negativos (CN) para raiva, bem como em suspensão de cérebros de camundongos inoculados com o vírus CVS. A sua diluição é variável de acordo com o lote do conjugado produzido, sendo previamente titulado antes de sua utilização.

3.4 Inoculação intracerebral em camundongos

A técnica de inoculação intracerebral em camundongos foi realizada segundo protocolo descrito por Koprowski⁶⁴. A prova biológica consiste na técnica de inoculação intracerebral de suspensão do material a ser analisado em camundongos albinos suíços com 21 dias de idade (figura 2).



Figura 2: camundongos de 21 dias de idade utilizados na inoculação intracerebral, em caixa de polipropileno com tampa de metal. Botucatu – SP, 2012.

Para o preparo da suspensão foi coletado o material total do SNC dos morcegos, macerado em gral estéril e adicionado na proporção 1:5, uma solução diluente preparada com água filtrada em aparelho de osmose reversa estéril, soro eqüino e antibiótico. A suspensão foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi utilizado como inóculo⁶⁴ (figura 3).



Figura 3: inoculação intracerebral em camundongos. Botucatu – SP, 2012.

Foram inoculados 10 animais para cada inóculo preparado. Os animais foram acomodados em estante ventilada, em caixas de polipropileno com ficha de avaliação individual para anotação de alterações nos mesmos. Quando os animais mostraram sinais clínicos da doença, seus encéfalos foram coletados e submetidos ao teste de IFD, para confirmação do diagnóstico.

3.5 Caracterização viral com anticorpos monoclonais

A caracterização com anticorpos monoclonais (AcM) foi realizada segundo protocolo descrito por Diaz et al⁴⁵. O painel utilizado foi cedido pelo CDC (Centers of Disease Control and Prevention), Atlanta-USA, que consiste em uma bateria de 8 AcM (C1, C4, C9, C10, C12, C15, C18 E C19) que

definem 12 padrões antigênicos, apresentados no quadro 2. Estes AcM são antinucleoproteína específica para epítomos do nucleocapsídeo viral e é visualizada pela coloração fluorescente (Imunofluorescência Indireta). A verificação da presença ou não de fluorescência do isolado viral com cada um dos AcM permite a determinação de um perfil de reatividade, ou perfil antigênico, o que permite a comparação entre os vários isolados⁶⁵.

Quadro 2. Padrões de reação das diferentes variantes antigênicas com os anticorpos monoclonais.

Anticorpos monoclonais	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	AgV
CVS/ERA SAD/Past	+	+	+	+	+	+	+	+	Lab.
Perro/ mangosta	+	+	+	+	+	+	-	+	1
Perro	+	+	-	+	+	+	-	+	2
Vampiro	-	+	+	+	+	-	-	+	3
Tadarida brasiliensis	-	+	+	+	+	-	-	-	4
Vampiro	-	+	+	+	+	v	-	v	5
Lasiurus cinereus	v	+	+	+	+	-	-	-	6
Zorro de Arizona	+	+	+	-	+	+	-	+	7
Zorrillo centro/sur?	-	+	+	+	+	+	+	+	8
Tadarida Br. Mex.	+	+	+	+	+	-	-	-	9
Baja SC zorrillo	+	+	+	+	-	+	-	+	10
Vampiro	-	+	+	+	-	-	-	+	11

(+): reação positiva; (-): reação negativa; (v): variável

Foram submetidas a esta técnica os isolados obtidos de 8 *Artibeus* spp., 6 *Myotis* spp. 4 *Molossus* spp. e 1 *Nyctinomops* spp.

3.6 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para amplificação dos genes codificadores da nucleoproteína (N) viral.

A RT-PCR utilizando material procedente do SNC dos camundongos, foi realizada segundo protocolo padronizado no laboratório de biologia molecular do Instituto Pasteur – SP, e a PCR para amplificação parcial do gene N, com primers para nucleoproteína (N)^{26, 66}.

Como controles foram inseridos desde a fase de extração do RNA até a amplificação, suspensão de cérebros de camundongos inoculados com a amostra CVS (controle positivo) e água ultra-pura livre de DNase e RNase (controle negativo).

3.6.1 Extração de RNA

A extração de RNA total do SNC dos camundongos, controles positivo e negativo foi realizada com o método do TRIzol (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) – Transcrição Reversa (RT)

Para obtenção de cDNA, adicionou-se 3µL do RNA extraído de cada amostra de SNC a 1 µL primer senso (21G) e anti-senso (304) na concentração de 10µM, levando-se ao termociclador por 70°C por 5 minutos, seguidos de 5 minutos em banho de gelo. A seguir adicionou-se esta reação (primer + RNA) ao mix para a transcrição reversa contendo 4µL ImProm-II™5XReaction Buffer (Promega), 1µL de dNTPs 10mM, 2,5µL de MgCl₂ a

25mM, 1µL de RNAsout (Invitrogen™), 200U de ImProm-II Reverse transcriptase (Promega) e 5,5µL de água ultra-pura livre de DNase e RNase esterilizada para um volume final de 20µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

Após a obtenção do DNA complementar foi realizada a reação de PCR pela adição para cada amostra de 10µL de cada c-DNA ao mix de PCR contendo 10µL de 10X PCR Buffer (Invitrogen™), 16µL de dNTPs a 1,25 mM, 5µL de cada primer a 10 µM , 1,5mM MgCl₂, 50,5µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para um volume final de 102µL e levados ao termociclador e submetidos aos ciclos descritos de acordo com o quadro 3.

Quadro 3. Ciclos utilizados nas PCRs para o gene N do RABV em amostras de SNC de morcegos não hematófagos.

Ciclo	Temperatura	Tempo
1	94°C Denaturação	5 minutos
35	94°C Denaturação	45 segundos
35	55°C Anelamento	45 segundos
35	72°C Extensão	2 minutos
1	72°C Extensão	10 minutos

Os primers utilizados são apresentados no quadro 4.

Quadro 4. Primers utilizados nas provas de RT-PCR e sequenciamento de DNA para os genes N das amostras de RABV isoladas de morcegos não hematófagos. Botucatu-SP, 2012.

Primers	Sentido	Seqüência	Gene	Uso	Posição na amostra PV
21g	senso	5' ATGTAACACCTCTACAATG 3'	N	RT-PCR/Seq*	55-73
304	anti-senso	5'TTGACGAAGATCTTGCTCAT 3'	N	RT-PCR/Seq*	1514-1533
P784	anti-senso	5'CCTCAAAGTCTGTGGAAGA 3'	N	Sequenciamento	779-799

Seq*: Sequenciamento

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (0,1 M de Tris, 0,09 M de ácido bórico e 0,001 M de

EDTA), contendo brometo de etídeo na proporção de 7µL para cada 100ml de tampão. Foram considerados positivos os isolados que resultaram em fragmentos de 1478 pares de bases (pb) para o gene N.

3.7 Sequenciamento de DNA

Para a realização da técnica de seqüenciamento de DNA foram realizados os seguintes protocolos:

3.7.1 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), segundo instruções do fabricante diretamente a partir das reações de PCR. As reações que apresentaram bandas inespecíficas foram purificadas a partir do gel com o mesmo kit, segundo as instruções do fabricante. Após a purificação, as amostras de DNA foram quantificadas visualmente em gel de agarose a 2% com Low Mass DNA Ladder (Invitrogen™), segundo as instruções do fabricante.

3.7.2 Reação de seqüenciamento do DNA

A reação de seqüenciamento do DNA consistiu em 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 3,2 pmoles dos primers senso (21G) e antisenso (P784), em reações separadas, 5 a 20 ng de DNA e água livre de DNA q.s.p. para uma reação final de 10 µL, levando-se ao termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) para 35 ciclos de 96 °C/10 segundos, 50 °C/5 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 1°C/segundo entre cada temperatura.

A purificação da reação de seqüenciamento foi realizada por Sephadex™ G-50 fine (GE healthcare Bio-sciences), em placas com filtro Multiscreen HV com 96 orifícios. Após a purificação, as seqüências foram obtidas em analisador genético automático ABI-3130 (Applied Biosystems™).

3.7.3 Edição de seqüências

Para cada um dos nucleotídeos revelados nos eletroferogramas gerados para cada uma das reações de seqüenciamento foram atribuídos escores por meio do aplicativo Phred¹, sendo utilizadas as posições que apresentaram nucleotídeos com índice Phred maior que 20⁶⁷. Os nucleotídeos com índice Phred igual ou menor a 20 foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD), para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciadas. A seqüência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 5.0.9⁶⁸, sendo a mesma submetida ao BLASTn² para confirmação do seqüenciamento.

3.8 Análise Filogenética

Para a construção da árvore filogenética, as seqüências de DNA obtidas foram alinhadas pelo método do alinhamento múltiplo CLUSTAL/W utilizando-se o programa Bioedit⁶⁸, conferindo-se manualmente os alinhamentos para cada conjunto de seqüências alinhadas. Para a reconstrução filogenética das amostras de RABV, foi utilizado o método de distância com o algoritmo

¹ Phred Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 2011.

² BLAST Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 2011.

Neighbor-Joining e o modelo evolutivo MCL utilizando-se o software Mega 4.1 (© 1993 – 2008 Tamura, Dedley, Ney & Kumar) com 1000 repetições de bootstrap. Além disso, foram acrescentadas na análise do gene N, 83 seqüências homólogas recuperadas do GenBank.

3.9 Cálculo de distância genética de nucleotídeos e aminoácidos

As distâncias genéticas intra e inter-clusters em nucleotídeos e aminoácidos e os diversos erros padrões para os agrupamentos encontrados entre os diversos gêneros/espécies de morcegos não hematófagos para as seqüências do gene N foram calculadas com o programa Mega 5.05 (© 1993 – 2011 Tamura, Peterson, Stecher, Nei, and Kumar).

3.10 Análises de mudanças e marcadores moleculares nas seqüências de aminoácidos traduzidas a partir das seqüências de DNA.

Para o estudo das mudanças nos aminoácidos observadas entres as amostras analisadas, foi utilizado o software Bioedit v. 7.0.0⁶⁸, sendo que as análises das mudanças foram feitas em relação ao vírus fixo PV (GenBank accession number M13215).

4 RESULTADOS

4.1 Tipificação antigênica com painel de anticorpos monoclonais dirigidos à nucleoproteína viral

A caracterização antigênica obtida dos 19 isolados de RABV de morcegos apresentou cinco perfis antigênicos diferentes, mostrados na tabela 2. Estes perfis foram divididos em variante AgV-3 própria do morcego hematófago *D. rotundus* com 37% (7/19) das amostras, sendo quatro isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*, dois deles da espécie *A. lituratus* e um de morcego insetívoro do gênero *Molossus*, Também a variante AgV-4 própria do morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis*, aqui caracterizada em um morcego do gênero *Myotis* representando 5% (1/19) das amostras.

Três padrões de resultados não compatíveis quando comparados aos perfis estabelecidos pelo painel foram identificados, NC1(não compatível 1) que foi encontrado em 21% (4/19) das amostras e envolveram dois isolados de morcegos do gênero *Molossus*, um do gênero *Myotis* e um da espécie *A. lituratus*. O perfil NC2 (não compatível 2) foi identificado em 16% (3/19) das amostras, divididos em um isolado de morcego da espécie *A. lituratus*, um do gênero *Myotis* e outro da espécie *Myotis nigricans*, além do perfil NC3 (não compatível 3) identificado em 21% (4/19) das amostras e envolveram três gêneros de morcegos insetívoros, sendo um do gênero *Molossus*, um do gênero *Nyctinomops* e dois do gênero *Myotis* sendo um da espécie *Myotis nigricans*.

A distribuição dos perfis nos seus respectivos municípios, mostrou que a AgV-3 identificada em sete isolados são oriundos de um único município,

Botucatu, já a variante AgV-4 foi proveniente do município de Piratininga. O perfil NC1 dividiu-se em três municípios: Botucatu, Piratininga e Bauru, já o NC2 ficou restrito ao município de Botucatu e o NC3 distribuiu-se em três municípios Botucatu, São Manuel e Dois Córregos.

Tabela 2. Resultados da tipificação antigênica de isolados de SNC de morcegos não hematófagos. Botucatu-SP, 2012.

Amostra	Ano	Gênero/Espécie	Cidade	Perfil antigênico
233	2003	<i>A. lituratus</i>	Botucatu	AgV-3
274	2004	<i>Molossus</i> spp.	Botucatu	AgV-3
180	2005	<i>Molossus</i> spp.	Botucatu	NC1 - C4 C10 C12
419	2005	<i>Artibeus</i> spp.	Botucatu	AgV-3
169	2006	<i>Molossus</i> spp.	Bauru	NC1 - C4 C10 C12
245	2006	<i>A. lituratus</i>	Botucatu	AgV-3
291	2006	<i>Artibeus</i> spp.	Botucatu	AgV-3
320	2006	<i>Artibeus</i> spp.	Botucatu	AgV-3
394	2006	<i>Myotis</i> spp.	São Manuel	NC3 - C1 C9 C15
691	2006	<i>Myotis</i> spp.	Botucatu	NC2 - C9 C10 C12
096	2007	<i>Nyctinomops</i> spp.	Botucatu	NC3 - C10 C12
206	2007	<i>Artibeus</i> spp.	Botucatu	AgV-3
105	2008	<i>Molossus</i> spp.	Dois Córregos	NC3 - C9 C10
205	2008	<i>Myotis</i> spp.	Piratininga	NC1- C4 C10 C12
211	2008	<i>Myotis</i> spp.	Piratininga	AgV-4
122	2009	<i>A. lituratus</i>	Botucatu	NC1 - C4 C10 C12
204	2009	<i>A. lituratus</i>	Botucatu	NC2 - C9 C10 C12
024	2010	<i>Myotis nigricans</i>	Botucatu	NC2 - C9 C10 C12
063	2010	<i>Myotis nigricans</i>	Botucatu	NC3 - C4 C9 C12

NC: não compatível

4.2 RT-PCR para amplificação dos genes codificadores da nucleoproteína (N) viral.

Não foram detectadas contaminações para as reações de RT-PCR, uma vez que os controles negativos não apresentaram bandas resultantes da amplificação de DNA. Para o gene N os 19 isolados foram submetidos à técnica de RT-PCR, sendo que 18 foram positivos, como podem ser verificados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados das RT-PCRs para o gene N de isolados do vírus rábico de morcegos não hematófagos. Botucatu-SP, 2012.

Amostra	Ano	Gênero/espécie	PCR
233	2003	<i>A.litiratus</i>	+
274	2004	<i>Molossus</i> spp.	+
180	2005	<i>Molossus</i> spp.	+
419	2005	<i>Artibeus</i> spp.	+
169	2006	<i>Molossus</i> spp.	+
245	2006	<i>A litiratus</i>	+
291	2006	<i>Artibeus</i> spp.	+
320	2006	<i>Artibeus</i> spp.	+
394	2006	<i>Myotis</i> spp.	+
691	2006	<i>Myotis</i> spp.	+
096	2007	<i>Nyctinomops</i> spp.	+
206	2007	<i>Artibeus</i> spp.	+
105	2008	<i>Molossus</i> spp.	+
205	2008	<i>Myotis</i> spp.	+
211	2008	<i>Myotis</i> spp.	+
122	2009	<i>A litiratus</i>	+
204	2009	<i>A litiratus</i>	+
024	2010	<i>Myotis nigricans</i>	+
063	2010	<i>Myotis nigricans</i>	-

4.3 Reação de sequenciamento de DNA

Os isolados positivos à RT-PCR, após purificação e quantificação, com quantidade suficiente de DNA para a realização da reação foram sequenciados, e entre os 18 isolados positivos, 16 revelaram sequências viáveis após a aferição com o aplicativo Phred e edição manual, de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. Resultados do sequenciamento de DNA para o gene N para os isolados de vírus rábico de morcegos não-hematófagos. Botucatu – SP, 2012.

Amostra	Ano	Gênero/Espécie	Seqüência N
233	2003	<i>A.litiratus</i>	+
274	2004	<i>Molossus</i> spp.	+
180	2005	<i>Molossus</i> spp.	+
419	2005	<i>Artibeus</i> spp.	+
169	2006	<i>Molossus</i> spp.	+
245	2006	<i>A.litiratus</i>	+
291	2006	<i>Artibeus</i> spp.	+
320	2006	<i>Artibeus</i> spp.	+
394	2006	<i>Myotis</i> spp.	+
691	2006	<i>Myotis</i> spp.	+
096	2007	<i>Nyctinomops</i> spp.	-
206	2007	<i>Artibeus</i> spp.	+
105	2008	<i>Molossus</i> spp.	+
205	2008	<i>Myotis</i> spp.	-
211	2008	<i>Myotis</i> spp.	+
122	2009	<i>A.litiratus</i>	+
204	2009	<i>A.litiratus</i>	+
024	2010	<i>Myotis nigricans</i>	+
063	2010	<i>Myotis nigricans</i>	-

+: utilizada

A região analisada do gene N corresponde do nucleotídeo 209 ao nucleotídeo 709 (em relação ao vírus fixo PV accession number M13215), que corresponde do aminoácido 47 até o aminoácido 213 da nucleoproteína viral.

4.4 Análise filogenética

Além das 16 seqüências de DNA geradas, foram utilizadas 83 seqüências de vírus rábico retiradas do Genbank para a construção da árvore filogenética. A árvore gerada (figura 1) contemplou todas as 10 linhagens de vírus da raiva conhecidas atualmente no Brasil. Sete delas específicas de morcegos insetívoros, sendo as outras três as linhagens referentes aos morcegos hematófagos *D. rotundus*, aos canídeos e ao sagüi^{41,66}.

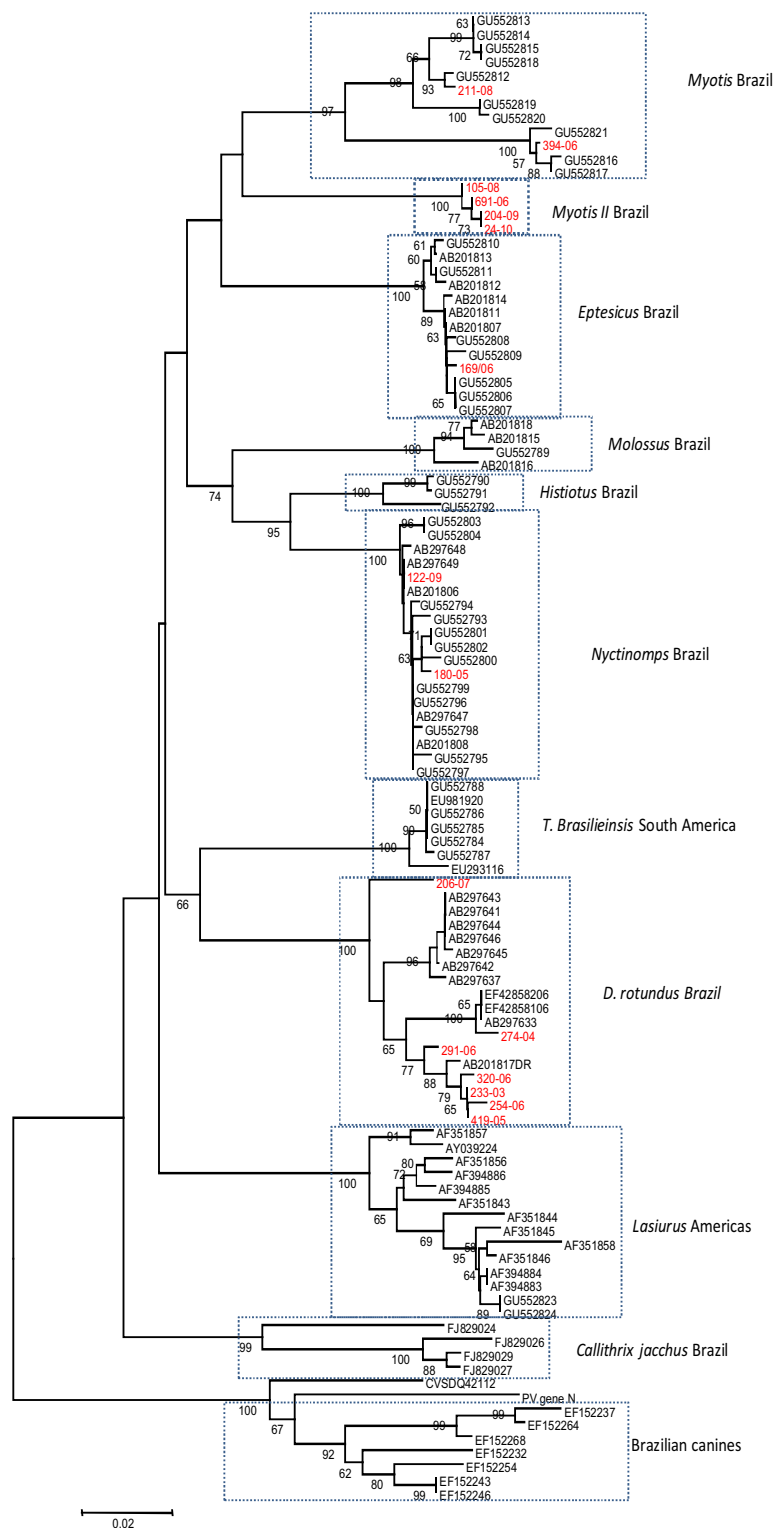


Figura 4 - Árvore de distância com algoritmo Neighbor-joining, modelo evolutivo MCL para o gene N de RABV (nucleotídeos 209 ao 709) de isolados do vírus rábico de SNC de quirópteros não hematófagos. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap. Botucatu-SP, 2012.

A caracterização genética dos 16 isolados mostrou o agrupamento dos isolados em cinco linhagens diferentes, a linhagem D rotundus com seis isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*, sendo dois da espécie *A. lituratus* e um morcego insetívoro do gênero *Molossus*. A linhagem *Nyctinomops* apresentou dois isolados, um morcego do gênero *Molossus* e outro da espécie *A. lituratus* e a linhagem *Eptesicus* com o isolado de um morcego do gênero *Molossus*, ainda dois isolados de morcegos insetívoros do gênero *Myotis* alinharam-se na linhagem *Myotis*.

Quatro isolados, sendo dois de morcegos do gênero *Myotis*, um do gênero *Molossus* e um da espécie *A. lituratus* formaram um cluster a parte, com valor de bootstrap de 100%, e provavelmente representam uma linhagem de RABV ainda não caracterizada, aqui representada como linhagem *Myotis II*, que aparentemente também tem os morcegos do gênero *Myotis* como reservatório. Esta suposta linhagem apresentou identidade intra-específica média de 99,8% variando de 99,6 a 100% para nucleotídeos e 100% para aminoácidos.

4.5 Análises de mudanças e marcadores moleculares nas sequências de aminoácidos traduzidas a partir das sequências de DNA

As metodologias empregadas para a análise das substituições nos aminoácidos para as proteínas putativas dos genes estudados foram apresentadas segundo Lodish et al⁶⁹, e os nomes e abreviaturas dos aminoácidos estão no quadro 5.

Quadro 5. Nomenclatura, símbolos e abreviatura dos 20 aminoácidos traduzidos a partir do código genético.

Nome	Símbolo	Abreviação
Glicina ou Glicocola	Gly,	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteina	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M

4.5.1 Gene N

Para a análise das principais mudanças ocorridas entre os aminoácidos foi utilizado o alinhamento utilizado para a construção da árvore filogenética, sendo que o vírus fixo PV serviu arbitrariamente de parâmetro para a análise das mudanças encontradas.

Devido ao tamanho insuficiente das sequências, os marcadores moleculares específicos para as linhagens Myotis, Nyctinomops e Eptesicus não puderam ser analisados. No entanto, nos fragmentos de cDNA estudados foram encontradas três mudanças de aminoácidos específicas para a provável nova linhagem, linhagem Myotis II de RABV encontrada neste estudo, mostradas no quadro 6.

Quadro 6. Substituições de aminoácidos para a proteína N, específicas para a nova linhagem encontrada. Botucatu-SP, 2012.

Posição	PV	Mudança	Classificação
79	Q	Q → N	Q: polar neutro N: polar neutro
84	T	T → I	T: polar neutro I: apolar
190	T	T → A	T: polar neutro A: apolar

5 DISCUSSÃO

Os 19 isolados de RABV de morcegos não hematófagos foram submetidos às técnicas de caracterização antigênica por painel de Anticorpos Monoclonais e ao seqüenciamento genético para nucleoproteína viral do RABV a fim de se conhecer e avaliar o papel desses animais na distribuição do vírus na região estudada, na tentativa de classificá-los antigênica e geneticamente para posterior correlação entre os resultados obtidos e assim tentar traçar um perfil epidemiológico.

A caracterização antigênica mostrou resultados interessantes, já que os gêneros/espécies de isolados de morcegos analisados, *Molossus*, *Artibeus*, *Nyctinomopos* e *Myotis*, já foram caracterizados genética e antigenicamente em estudos de regiões diferentes, o que proporcionou uma base importante para as análises deste trabalho.

Cinco perfis foram identificados, o perfil AgV-3 do morcego hematófago *D. rotundus* com sete isolados representou o maior grupo, com sete representantes, sendo seis morcegos do gênero *Artibeus* com dois da espécie *A. lituratus* e um do gênero *Molossus*, resultado que corrobora com achados de estudos no Brasil e Argentina^{23,28,46,47,72}. Algumas hipóteses vêm sendo vinculadas a respeito dos achados cada vez mais freqüentes desta variante com isolados do gênero *Artibeus*, tanto que alguns pesquisadores já denominam esta variante como sendo uma variante própria deste gênero^{66,71,73}.

Várias espécies de morcegos não hematófagos dos mais variados gêneros têm apresentado a variante do *D. rotundus*, o que poderia ser explicado pela possibilidade da transmissão entre espécies de diferentes

morcegos, idéia que se torna plausível uma vez que diversas famílias destes animais podem compartilhar um mesmo abrigo, ou ainda, em função da capacidade de vôo, percorrer grandes distâncias, compartilhando territórios, o que favorece a transmissão do RABV entre eles. Os morcegos *D. rotundus*, por exemplo, utilizam muitos tipos de abrigos e podem dividir este espaço com mais de 40 outras espécies de morcegos⁷¹, o que reforça a teoria da transmissão do vírus entre hospedeiros. Esta teoria preconiza que variantes e linhagens de RABV circulem ao longo de um determinado território, fato este que permite sua identificação, pois são adaptadas e mantidas pelas diferentes espécies animais distribuídas regionalmente.

Esta distribuição pode ser alterada se ocorrer a transmissão do vírus de um hospedeiro primário para um secundário (spillover), e se esta nova população infectada mantiver a infecção ao longo do tempo, a área de distribuição do vírus é alterada, podendo ser ampliada. Um exemplo fundamental de spillover é a transmissão da linhagem de RABV de quirópteros para carnívoros, fato ocorrido antes mesmo da descoberta das Américas, dando origem, assim às linhagens de RABV em animais terrestres¹¹. Esta afirmação parece ficar explícita quando confrontamos o resultado antigênico obtido no presente estudo com a caracterização genética dos isolados, que apresentou todas as amostras com variante 3 se alinhando à linhagem *D. rotundus*, que pode caracterizar este salto inter-espécies.

Também foi caracterizado antigenicamente um isolado de morcego insetívoro do gênero *Molossus* como AgV-4, variante característica do morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis*, que na análise genética se agrupou na

linhagem Myotis, linhagem esta conhecida de morcegos insetívoros brasileiros, resultado também já descrito em estudos anteriores⁶⁶.

Três perfis antigênicos foram classificados como não compatíveis quando analisados frente ao painel de AcM, totalizando 11 dos isolados analisados, resultado também verificado em outros estudos^{66,70,72} e foram divididos em NC-1, NC-2 e NC-3 de acordo com o número de repetições do mesmo perfil, tendo o NC-3 não apresentado nenhuma repetição de perfis.

O perfil NC-1 que foi formado por quatro isolados de morcegos dos gêneros Myotis, Molossus e da espécie *A. lituratus*, apresentou na análise genética duas linhagens diferentes, linhagem Nyctinomops e linhagem Eptesicus.

O perfil NC-2 identificado em três isolados de morcegos, sendo um do gênero Myotis, um da espécie *A. lituratus* e um da espécie Myotis nigricans, todos eles caracterizados com a linhagem Myotis II, linhagem esta identificada pela primeira vez em estudos genéticos, e o perfil NC-3 que apresentou um grupo de quatro isolados de morcegos, um do gênero Molossus, um do gênero Nyctinomops e dois do gênero Myotis, sendo um da espécie Myotis nigricans, e na caracterização genética foram classificados como linhagem Myotis e linhagem Myotis II. É importante ressaltar que mesmo havendo repetições de um perfil antigênico quando comparado com outros estudos de regiões distintas, o mesmo não se repete na caracterização genética, quando se faz a mesma comparação⁷².

Também pode-se afirmar que o painel de AcM demonstra baixa resolução ou não permite uma resolução tão alta quanto os estudos genéticos, o que pode ocasionar divergências como descrito anteriormente.

O resultado da caracterização genética agrupou os isolados estudados em cinco linhagens diferentes, sendo quatro destas já descritas na literatura⁶⁶, linhagem Nyctinomops, linhagem Myotis, linhagem Eptesicus e linhagem D. rotundus sendo importante frisar que a demonstração destes grupos se baseou apenas na topologia da árvore filogenética, pois devido ao tamanho do fragmento de DNA seqüenciado não foi possível observar a presença dos marcadores moleculares específicos para cada linhagem.

Estes resultados demonstram a circulação de quatro linhagens específicas, com ciclos epidemiológicos distintos e independentes, mantidos por prováveis reservatórios específicos já caracterizados na literatura. Um fato interessante quando observamos as espécies de morcegos infectados com as linhagens descritas neste trabalho, é que apenas a linhagem Myotis foi isolada em seu reservatório natural, o morcego insetívoro Myotis spp. A linhagem Eptesicus foi isolada de um morcego do gênero Molossus, o qual provavelmente possui sua própria linhagem, enquanto que a linhagem Nyctinomops foi isolada de um morcego do gênero Molossus e da espécie A. lituratus, que também já tem sua linhagem estabelecida e conhecida como variante 3 ou linhagem D. rotundus^{66,73,74}. O fato de, linhagens específicas serem encontradas em hospedeiros diferentes de seus reservatórios, pode ser explicado pelo evento spillover.

Outro achado importante é quanto ao morcego Molossus spp, caracterizado em quatro linhagens diferentes. Tal fato pode ocorrer, devido provavelmente às características ecológicas e comportamentais deste gênero, que pode torná-lo mais susceptível a infecção com linhagens específicas de outros quirópteros, fato observado em outras pesquisas^{14,73,74}.

Quatro isolados se agruparam em um cluster a parte de todas as outras linhagens brasileiras conhecidas, denominada no presente estudo de linhagem Myotis II, o que pode significar a identificação de uma linhagem de RABV ainda não descrita em estudos brasileiros. As divergências genéticas de nucleotídeos inter-cluster desta nova linhagem em comparação com os outros presentes na árvore filogenética, o valor de bootstrap do nó de origem deste grupo, a manutenção deste cluster na árvore filogenética feita a partir da seqüência de aminoácidos (dados não mostrados) e a existência de três substituições de aminoácidos fixadas nesta linhagem e não existentes nas outras estudadas são fortes indícios deste achado.

Estas quatro amostras de vírus foram isoladas em dois morcegos do gênero Myotis, sendo um *M. nigricans*, um morcego da espécie *Artibeus lituratus* e um morcego *Molossus* spp. Pelo exposto anteriormente, é mais provável que o reservatório desta linhagem seja o gênero Myotis, já que o *A. lituratus* e o gênero *Molossus* são reservatórios de linhagens específicas e também o aparente número elevado de morcegos do gênero *Molossus* infectados por diferentes linhagens virais.

Embora seja um grupo a parte, filogeneticamente esta linhagem parece ter um parentesco mais próximo com a linhagem Myotis já descrita em outro estudo⁶⁶.

Estudos norte americanos já comprovaram a existência de duas linhagens distintas, existentes na mesma região e mantidas pelas mesmas espécies dentro do gênero Myotis, o que demonstra que uma única espécie de reservatório pode possuir mais de uma linhagem viral adaptada a ele⁷⁵.

Enfatiza-se necessidade de novos estudos que contemple um número maior de amostras e que utilize o sequenciamento total da nucleoproteína do RABV, para que se possa comprovar este achado, permitindo melhor compreensão dos aspectos etio-epidemiológicos referentes à raiva em quirópteros, principalmente o comportamento viral naqueles não hematófagos.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

Houve concordância entre a caracterização antigênica com anticorpos monoclonais dirigidos para nucleoproteína viral e a classificação obtida com base no seqüenciamento parcial do gene N, em 37% (7/19) isolados de RABV analisados.

É necessária revisão quanto aos perfis utilizados no painel de anticorpos monoclonais, sendo importante um estudo para a inclusão de perfis que vem se repetindo em diversos estudos brasileiros.

De acordo com os isolados de RABV analisados já pelo menos quatro linhagens circulantes na região estudada.

Foram identificados cinco perfis antigênicos nos isolados de quirópteros dos cinco municípios analisados.

Os resultados mostram a necessidade de se aprofundar os estudos dos isolados caracterizados como linhagem Myotis II, para conclusão final quanto a seu perfil genético.

7 REFERÊNCIAS

- 1 Baer AC. The History of Rabies. In: Jackson AC, Wunner HW. Rabies 2nd edition. San Diego: Academic Press; 2007. p.11-12.
- 2 Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva. Brasília. Editora do Ministério da Saúde; 2008.
- 3 INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2005. p.630-634.
- 4 Wunner HW. Rabies Virus. In: Jackson AC, Wunner HW. Rabies 2nd edition. San Diego: Academic Press; 2007. p.23-68.
- 5 Tordo N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin, FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. p.28-51.
- 6 Sokol F, Stanek D, Koprowski H. Structural Proteins of Rabies Virus. Journal of Virology. 1971; vol 7: 241-249.
- 7 Ertl HCJ, Dietzschold B, Gore M, Otvos LJR, Larson JK, Wunner WH, Koprowski H. Induction of Rabies Virus-Specific T-Helper Cells by Synthetic Peptides That Carry Dominant T-Helper Cell Epitopes of the Viral Ribonucleoprotein. Journal of Virology. 1989; 63(11): 2885-2892.
- 8 Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. The Lancet Infectious Diseases, 2002; vol 2: 327-343.
- 9 Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. Virology. 1995; vol. 209: 526-537.
- 10 Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Garoff C, Bourhy H. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 1998; 36(4): 1117-1121.
- 11 Badrane H, Tordo N. Host switching in Lyssavirus history from Chiroptera to the Carnivora orders. Journal of Virology. 2001; 75(17): 8096-8104.
- 12 Ito M, Arai YT, Ito UT, Sakai T, Ito FH, Takasaki T, Kurane I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of reservoir, dogs and vampire bats. Virology. 2001; vol. 284: 214-222.

- 13 Badrane H, Bahloul CK, Perrin P, Tordo N. Evidence of two Lissavirus phylogroups with pathogenicity and immunogenicity. *J. Virol.* 2001; 75(7): 3268-3276.
- 14 Oliveira RN. Vírus da raiva em morcegos insetívoro: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína [mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
- 15 Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology.* 1993; vol. 194:70-81.
- 16 Amengual B, Whitby JE, King A, Serra Cobo J, Bourhy H. Evolution of European bat lyssaviruses. *Journal of General Virology.* 1997; vol. 78: 2319-2328.
- 17 Gould AR, Hyatt AD, Lunt R, Kattenbelt JA, Hengstberger S, Blacksell SD. Characterization of a novel Lyssavirus isolated from Pteropid bats K in Australia. *Virus Res.* 1998; v. 54:165-187.
- 18 Bourhy H, Kissi B, Audry L, Smreczak M, Sadkowska-Todys M, Kulonen K, Tordo N, Zmudzinski JF, Holmes EC. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology.* v. 80: 2545-2557.
- 19 Nadin-Davis SA, Huang W, Armstrong J, Casey GA, Bahloul C, Tordo N, Wandeler AI. Antigenic and genetic divergence of rabies virus from bat species indigenous to Canada. *Virus Research.* 2001; 74(1-2): 139-156.
- 20 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão sobre Raiva dos Herbívoros. Brasília. 2005. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 de julho de 2011.
- 21 Velasco-Villa A, Gómez-Sierra M, Hernandez-Rodriguez G, Juárez-Islas V, Meléndez-Felix A, Vargas-Pino F, Velásquez-Momroy O, Flisser A. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002; v.40: 951-958.
- 22 Corrêa WM & Corrêa CNM. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos.* 2ª ed. São Paulo: MEDSI; 1992. p.609-628.
- 23 Kotait E, Carrieri ML, Carnieli Jr P, Castilho JG, Oliveira RN, Macedo CI, Scheffer KC, Achkar SM. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Boletim Epidemiológico Paulista.* 2007; 4(40): 2-8.
- 24 Acha PN & Szyfres B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales.* 3ª ed. Organización Panamericana de la Salud; 2003. p.351-383.
- 25 Hanlon CA, Orciari LA. Rabies virus. *Encyclopedia of Life Sciences.* 2001. p. 1-8. Disponível em: <http://www.els.net> . Acesso em 11 jul. 2010.

- 26 Orciari LA, Niezgodna M, Hanlon CA, Shaddock JH, Sandelin DW, Yager PA, Rupprecht CE. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. *Vaccine*. 2001; v19: 4511-4518.
- 27 Constantine DG. Transmission of pathogenic microorganisms by vampire bats. In: Greenhal AM, Schmidt U. *The natural history of vampire bats*. Florida: CRC Press; 1988. p.167-189.
- 28 Sodré MM, Gama AR, Almeida MF. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2010; 52(2): 75-81.
- 29 Uieda W, Harmani NMS, Silva MMS. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 1995; v.5:393-397.
- 30 Reis NR. Sobre os Morcegos Brasileiros. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, De Lima IP. *Morcegos do Brasil*. Londrina: CAPES; 2007. p.17-25.
- 31 Mayen F. Haematophagus bats in Brazil, their role in rabies transmission impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. *J. Vet. Med.* 2003; 50: 469-472.
- 32 Silva LHQ, Cunha EMS, Pedro WA, Cardoso TC, Souza MCC, Ferrari CIC. Isolamento do vírus rábico em *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae) no Estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*. 1999; 33 (6): 626-628.
- 33 Travassos Rosa ES, Kotait I, Barbosa TFS, Carrieri ML, Brandão PE, Pinheiro AS, Begot AL, Wada MY, Oliveira RC, Grisard EC, Ferreira M, Lima RJS, Montebello L, Medeiros DBA, Sousa RCM, Bensabath G, Carmo EH, Vasconcelos PFC. Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. *Emer. Infect. Dis.* 2006; v8: 1197-1202.
- 34 Schneider MC, Belotto A, Adé MP, Hendrickx S, Leanes LF, Rodrigues MJF, Medina G, Correa E. Current status of human rabies transmitted by dogs in Latin America. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007; 23(9): 2049-2063.
- 35 Carrieri ML, Favoretto SRL, Carnieli Jr. P, Queiroz LH, Souza MCAM, Panachão MRI, Takaoka NY, Harmami NMS, Kotait I. *Desmodus rotundus* como transmissor da raiva canina e felina, no Estado de São Paulo, 1998-2000. *Seminário Internacional de Raiva*. 2000; 1ª ed, São Paulo. Resumos. p. 42-43.
- 36 Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo H, Correa C. Overview of rabies in the Americas. *Virus Res.* 2005; 111(1): 5-12.
- 37 Langoni H, Lima K, Menozzi BD, Silva RC. Rabies in the big fruit – eating bat *Artibeus lituratus* from Botucatu, southeastern Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 2005; 11(1): 84-87.

- 38 Kotait I, Carrieri ML, Takaoka NY. Manejo de quirópteros em áreas urbanas. Manual Técnico do Instituto Pasteur. Instituto Pasteur. São Paulo, 2003.
- 39 Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Raiva: Situação da doença no Brasil. Brasília. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/programa_vigilancia_raiva_dados_parciais_11.pdf>. Acesso em 13/07/2011.
- 40 Niezgodna M, Hanlon CA, Rupprecht CE. Animal rabies. In: Jackson AC, Wunner WH. Rabies. San Diego: Academic Press; 2002. p.163-218.
- 41 Carnieli Jr P, Brandão PE, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI, Machado LM, Rangel N, Carvalho RC, Carvalho VA, Montebello L, Wada M, Kotait I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. *Virus Research*, 2006; 120(1-2): 113-120.
- 42 Kobaiashi Y, Okuda H, Nakamura K, Sato G, Itou T, Carvalho AAB, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. Genetic analysis of phosphoprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 2007; 69(11):1145-1154.
- 43 Cunha EMS. Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos. Avaliação da patogenicidade e proteção cruzada em camundongos [Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2006.
- 44 Favoretto SR, Carrieri MI, Cunha EMS, Aguiar AC, Silva LHQ, Sodré MM, Souza MCAM, Kotait I. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2002; 44(2): 91-95.
- 45 Diaz A, Rodriguez A, Smith JS. Antigenic Analysis of Rabies-virus Isolates from Latin America and the Caribbean. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health*. 1994; 41(15): 153-160.
- 46 Albas A, Souza EAN, Lourenço RA, Favoretto SR, Sodré MM. Perfil antigênico do vírus da raiva isolado de diferentes espécies de morcegos não hematófagos da Região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009; v. 42: 15-17.
- 47 Delpietro HA, Gury-Dohmen F, Larghi OP, Mena-Segura CA, Abramo L. Monoclonal Antibody Characterization of Rabies Virus Strains Isolated in the River Plate Basin. *J. Vet. Med. B*. 1997; v44: 477-483.
- 48 Gury-Dohmen F & Mena Segura CA. Tipificación antigênica de cepas de vírus rábico, I. Z. L. Pasteur, 1992-2000. In XI Reunion International sobre avances em la investigation y control de la rabia em las Américas, Lima, Peru, 2000.

- 49 De Mattos CA, Mattos CC, Smith JS, Miller ET, Papo S, Utrera A, Osburn BI. Genetic characterization of rabies field from Venezuela. *American Society for Microbiology*. 1996; 34(6): 1553-1558.
- 50 Lopes RL. Tipificación antigénica del virus rábico em el Peru. In IX International meeting on research advances and rabies control in the Américas. México, 1998.
- 51 Villalobos R, Rocha A, Guaqueta A. Variantes antigénicas del virus rábico en Colombia. In XI Reunion International sobre avances em la investigation y control de la rabia em las Américas, Lima, Peru, 2000.
- 52 Lopez RA, Miranda PP, Tejada VE, Fishbein DB. Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle. *The Lancet*. 1992; v 339: 408-412.
- 53 Warner CK, Zaki SR, Shien WJ, Whitfield SG, Smith JS, Orciari LA, Shaddock JH, Niezgoda M, Wright CW, Goldsmith CS, Sanderlin DW, Yager PA. Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in Peru. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 1999; 60(3): 502-507.
- 54 De Mattos CA, Favi M, Yung V, Pavletic C, De Mattos CC. Bat rabies in urban centers in Chile. *Journal of Wildlife Diseases*. 2000; 36(2): 231-240.
- 55 Favi M, De Mattos CA, Yung U, Chala E, Lopez LR, De Mattos CC. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(1): 79-82.
- 56 Velasco-Villa A, Gomez-Sierra M, Hernandez-Rodriguez G, Juarez-Islas V, Melendez-Felix A, Vargas-Pino F, Velazquez-Monroy O, Flisser A. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(3): 951-958.
- 57 Sterner RT, Smith GC. Modelling wildlife rabies: transmission, economics and conservation. *Biological Conservation*. 2006; v131:163-179.
- 58 Carnieli Jr P, Fahl W O, Castilho JG, Oliveira RN, Macedo CI, Durymanova E, Jorge RSP, Morato RG, Spíndola RO, Machado LM, Úngar de Sá JE, Carrieli ML, Kotait I. Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Research*. 2008; 131(1): 33-46.
- 59 Schaefer R, Batista HBR, Franco AC, Rijsewijk FM, Roehe PM. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Veterinary Microbiology*. 2005; v107: 161-170.
- 60 Martorelli LFA, Almeida MF, Aguiar EAC, Durigon EL. 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 América. Canadá, 2001.

- 61 Vissoto LD, Taddei VA. A chave para determinação de quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto, São Paulo. Boletim de Ciências. 1973; v1: 1-72.
- 62 Gregorin R, Taddei VA. Chave artificial para determinação de molossídeos brasileiros (Mammalia: Chiroptera). Mastozool. Neotrop. 2002; 9(1):13-32.
- 63 Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. p. 88-95.
- 64 Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. p. 80-87.
- 65 Mattos CA, Mattos CC, Rupprecht CE. Rhabdoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 4thed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2001. 1245-1278.
- 66 Oliveira RN, Souza SP, Lobo RSV, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli Jr. P, Fahl WO, Achkar SM, Scheffer KC, Kotait I, Carrieri ML, Brandão PE. Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. Virology. 2010; v 405: 352-360.
- 67 Ewing B, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. Ll. Error Probabilities. Genome Research. 1998; v 8:186-194.
- 68 Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series. 1999; v 41: 95-98.
- 69 Lodish H, Berk A, Matsudaria P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP. Biologia Celular e Molecular. In: Mecanismos básicos da genética molecular. 5th ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 119.
- 70 Chaves LB. Produção de anticorpos monoclonais para caracterização de variantes antigênicas brasileiras de vírus da raiva [doutorado] São Paulo: Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT; 2010.
- 71 Fahl WO. Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G [mestrado] São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
- 72 Queiroz LH, Favoretto SR, Cunha EMS, Campos ACA, Lopez MC, Carvalho C, Iamamoto K, Araújo DB, Venditi LLR, Ribeiro ES, Pedro WA, Durigon EL. Rabies in southeast Brazil: a change in the epidemiological pattern. Arch Virol. 2012; v 157: 93-105.

73 Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, Cunha EM, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruse in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 2005; 67(7): 647-652.

74 Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha EM, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Archives of Virology.* 2007; 153 (11): 1995-2004.

75 Streicker DG, Turmelle AS, Vonhof MJ, Kuzmin IV, McCracken GF, Rupprecht CE. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. *Science* 2010; 329 (5992): 676-679.

8 APÊNDICE

8.1 Solução diluente

97 ml água filtrada em aparelho de osmose reversa estéril

2 ml soro eqüino inativado

1 ml lincomicina 300mg

9 ANEXO

9.1 Parecer de aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

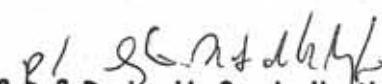


Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 762 sobre o projeto de pesquisa "Caracterização genotípica de amostras de vírus rábico, isolados de quirópteros de Botucatu-SP e região", que será conduzido por Benedito Donizete Menozzi, orientado pelo Prof. Titular Hélio Langoni, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "camundongos", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a sanidade dos mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 24/09/2009.


Profª Drª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

9.2. Justificativa de Alteração de Título



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "**Caracterização genotípica de amostras de vírus rábico isolados de quirópteros da cidade de Botucatu – SP e região**", aprovado pelo CEP em 24/09/2009, teve seu título alterado para "**Caracterização antigênica e genotípica de isolados do vírus rábico, de quirópteros da cidade de Botucatu – SP e região**".

sem nenhuma alteração no seu conteúdo

metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, __31__/_01___/2012_____

Nome/Assinatura do(a) aluno(a) Benedito Donizete Menozzi

Nome/Assinatura do(a) orientador (a) Helio Langoni

Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais

✓ **Preencher formulário em 2 vias e protocolar no respectivo CEP**

Arquivado em 01/01/2012 às 14:00:00