ANDREA ISABEL ESTÉVEZ GARCIA

Perfil patogênico de um isolado do vírus da raiva procedente do morcego insetívoro *Lasiurus ega* e do vírus fixo Challenge Virus Standard (CVS) no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) e camundongo (*Mus musculus*)

São Paulo

2009

ANDREA ISABEL ESTÉVEZ GARCIA

Perfil patogênico de um isolado do vírus da raiva procedente do morcego insetívoro *Lasiurus*
ega e do vírus fixo Challenge Virus Standard (CVS) no modelo hamster (*Mesocricetus*
auratus) e camundongo (*Mus musculus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Epidemiologia Experimental
Aplicada às Zoonoses da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2198
FMVZ

Estévez Garcia, Andrea Isabel

Perfil patogênico de um isolado do vírus da raiva procedente do morcego insetívoro *Lasiurus ega* e do vírus fixo Challenge Virus Standard (CVS) no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) e camundongo (*Mus musculus*) / Andrea Isabel Estévez Garcia . – 2009.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fumio Honma Ito.

1. Raiva. 2. Morcegos. 3. Patogenicidade. 4. Hamster. 5. Caracterização genética. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da transmissibilidade e patogenia do vírus da raiva isolada de um morcego insetívoro (*Molossus spp*) em hamsters (*Mesocricetus auratus*)", protocolado sob o nº1404/2008, utilizando 200 (duzentos) hamsters e 1500 (um mil e quinhentos) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fumio Honma Ito, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 18 de junho de 2008.

We certify that the Research "Transmissibility and pathogenesis of a rabies virus isolate from insectivorous bat (*Molossus spp*) in hamsters (*Mesocricetus auratus*)", protocol number 1392/2008, utilizing 200 (two hundred) hamsters and 1500 (one thousand, five hundred) mice, under the responsibility Prof. Dr. Fumio Honma Ito, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/18/08.

São Paulo, 19 de junho de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ESTÉVEZ GARCÍA, Andrea Isabel

Título: Perfil patogênico de um isolado do vírus da raiva procedente do morcego insetívoro *Lasiurus ega* e do vírus fixo Challenge Virus Standard (CVS) no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) e camundongo (*Mus musculus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais Pedro Antonio Estévez e Elizabeth García,
aos meus irmãos María Cristina ,Alejandro e Marta Cecília

AGRADECIMENTOS

À CNPq pela bolsa concedida

Ao Prof. Dr. Fumio Honma Ito, pela orientação, ensino, compreensão e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, pelo apoio, estímulo e ajuda constante

Aos pesquisadores Go Sato, Itou Takuya e especialmente a Nobuyuki Mochizuki por ter colaborado nos estudos genéticos do isolado e fornecer sempre uma resposta amável para as minhas perguntas.

A Rosana Cleide Paick Utiana, pela presteza na colaboração com os experimentos e com tudo o que eu precisei no laboratório de Zoonoses Virais do VPS

A Carolina Torres Alejo, Ana María Acevedo, Sheila Oliveira de Souza, Sibelle Pinheiros, Enio Mori, Karen Ferrari, pela amizade, apoio e colaboração.

A Cristian Villegas, basicamente... por tudo!.

A Marta Velázquez e família, Lenin Villamizar, Magda García Leal, Iara Silveira, Carlos Almeida Scacchetti e Euro Couto pela amizade

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

RESUMO

ESTÉVEZ GARCIA, A. I. **Perfil patogênico de um isolado do vírus da raiva procedente do morcego insetívoro *Lassius ega* e do vírus fixo Challenge Virus Standard (CVS) no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) e camundongo (*Mus musculus*).** [Pathogenic profile of a rabies virus isolate from insectivorous bat *Lassius ega* and fixed virus Challenge Virus Standard (CVS) in hamster model (*Mesocricetus auratus*) and mouse (*Mus musculus*)]. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O isolamento do vírus da raiva (genótipo 1) a partir de morcegos não hematófagos está se tornando cada vez mais freqüente nas grandes cidades do Brasil. Este trabalho foi delineado para investigar a patogenicidade de um isolado do vírus da raiva, do morcego insetívoro *Lassius ega*, procedente do município de Presidente Prudente –SP, em comparação ao vírus fixo da raiva, amostra CVS/32 (Challenge Vírus Standard). Os vírus foram reativados por meio de inoculação intracerebral em camundongos e os experimentos de patogenicidade foram realizados em camundongos e hamsters, desafiando-os pelas vias intramuscular (IM), intradérmica (ID), intranasal (IN) e abrasão superficial da pele (AP). A presença do vírus nos cérebros de animais que haviam manifestado sinais compatíveis à raiva, foi confirmada mediante a prova de imunofluorescência direta. Foram considerados para a avaliação da patogenicidade o quadro clínico, proporção de mortos, e a duração dos períodos de incubação (PI) e clínicos (PC) em dias. Em hamsters, o isolado de *L. ega* exibiu um quadro furioso, com proporção total de mortos de 2.60%; assim discriminada: 2.08% IM (PI: 11 dias; PC: 6 dias) e 8.33% IN (PI: 10.66 ± 1.15 e PC: 7.33 ± 1.54). A presença do vírus no SNC foi detectada apenas em animais inoculados por essas vias. Por outro lado, o vírus CVS produziu um quadro paralítico com mortalidade total de 39.84%, com a seguinte distribuição: 62.50% IM (PI 7.50 ± 2.33 ; PC: 5.13 ± 1.89) 78.12% ID (PI 9.13 ± 2.23 ; PC 3.88 ± 2.23) 18.75% IN (PI 12.00 ± 2.77 ; PC 7.14 ± 2.54). Em camundongos, o isolado do *L. ega* manifestou sinais de agressividade e a raiva foi confirmada em animais inoculados IM e IN. A proporção de mortos observados em camundongos foi de 50.00% (PI 16.80 ± 2.20 ; PC 1.4 ± 0.54) e 30% (PI 14 ± 4.35 ; PC: 2.66 ± 0.57) respectivamente e o vírus CVS produziu mortalidade de 45.00% (PI: 6.30 ± 0.67 ; PC: 1.5 ± 0.70), 70% (PI: 7.14 ± 1.34 ; PC 2.28 ± 1.25) e 30% (PI:10.00; PC:1) pelas vias mencionadas acima, com quadro clínico de paralisia. O isolado de

L. ega mostrou diferenças na proporção de mortos e quadro clínico furioso quando comparado com o CVS nos dois modelos animais. Os resultados sugerem que o contato com os morcegos insetívoros infectados pelo vírus da raiva representa um risco de transmissão da doença, por meio de ferimentos superficiais da pele provocadas pelas mordeduras ou ainda pela via respiratória, supostamente por meio de aerossóis. Pelo sequenciamento completo da proteína G viral do isolado do *L. ega*, foram observadas substituições na sequência de aminoácidos nos sítios antigênicos AI, AII, assim como no domínio de fusão dependente de baixo pH. Os resultados obtidos, sugerem que as diferenças no comportamento biológico podem estar associadas às substituições encontradas na sequência de aminoácidos da proteína G.

Palavras-chave: Raiva. Morcegos. Patogenicidade. Hamster. Caracterização genética.

ABSTRACT

ESTÉVEZ GARCIA, A. I. **Pathogenic profile of a rabies virus isolate from insectivorous bat *Lassius ega* and fixed virus Challenge Virus Standard (CVS) in hamster model (*Mesocricetus auratus*) and mouse (*Mus musculus*).** [Perfil patogênico de um isolado do vírus da raiva procedente do morcego insetívoro *Lassius ega* e do vírus fixo Challenge Virus Standard (CVS) no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) e camundongo (*Mus musculus*)]. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The isolation of rabies virus (genotype 1) from the non-hematophagous bats is becoming frequent in heavy urbanized areas in Brazil. This work intended to investigate the pathogenicity of a Brazilian rabies virus isolate from the insectivorous bat *Lassius ega*, from PresidentePrudente-SP, comparing with the CVS/32 (Challenge Virus Standard) fixed rabies virus strain. The viruses were reactivated through intracerebral inoculation into mice and the pathogenicity experiments were made in hamsters and mice, challenged by intramuscular (IM), intradermal (ID) and intranasal (IN) routes and by superficial abrasion of skin. The presence of virus in the brain of animals manifesting the signs compatible with rabies was confirmed by the direct immunofluorescence test. For the evaluation of the pathogenicity, the clinical manifestations, incubation (IP) and clinical (CP) periods in days and the mortality were considered. In hamsters, the isolate of *L. ega* exhibited a furious form of rabies with total mortality rate of 2.60%, with following distribution: 2.08% IM (IP: 11 days; CP: 6 days) and 8.33% IN (IP: 10.66 ± 1.15 and PC: 7.33 ± 1.54). The presence of rabies virus in the CNS was detected only in animals inoculated through IM and IN routes. The CVS strain has provoked paralytic disease with a total mortality rate of 39.84% as the follow: 62.50% IM (IP 7.50 ± 2.33 ; CP: 5.13 ± 1.89), 78.12% ID (IP 9.13 ± 2.23 ; CP 3.88 ± 2.23) and 18.75% IN (IP 12.00 ± 2.77 ; CP 7.14 ± 2.54). In mice, the isolate of *L. ega* manifested signs of aggressiveness and rabies was confirmed in animals that were inoculated intramuscularly and intranasally. The total mortality rate observed in mice was 20%, by the IM route was 50% (IP 16.80 ± 2.20 ; CP 1.4 ± 0.54) and 30% by the intranasal route (IP 14.00 ± 4.35 ; CP: 2.66 ± 0.57) respectively. The CVS strain showed a total mortality rate of 45.00% and by the IM route, 100% (PI: 6.30 ± 0.67 ; CP: 1.5 ± 0.70), by the ID route, 70% (IP: 7.14 ± 1.34 ; CP 2.28 ± 1.25) and by IN, 30% (IP: 10, 00; C: 1.00) showing signs of paralysis. Compared to the CVS strain, the isolate of *L. ega* showed difference in mortality rate and signs of aggressiveness were found both in hamster and mouse model. The results suggest that

the contact with the insectivorous bats infected with rabies virus would represent a risk of disease transmission, by means of superficial wounds of the skin inflicted by bites or by inhalation of aerosols. By the complete sequencing of the viral G protein of the isolate of *L. ega*, sequencings of amino acids substitutions were observed at antigenic sites AI, AII, as well as the in domain of fusion dependent on low pH. According to the results, differences in the biological behavior may be associated to the substitutions found in the amino acids sequence of the G protein.

Keywords: Rabies. Bats. Pathogenicity. Hamster. Genetic characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Raiva paralítica em hamster inoculados com o vírus fixo CVS.....	38
Figura 2 - Período de incubação em dias do vírus fixo da raiva CVS no modelo hamster conforme as vias de inoculação empregadas.....	44
Figura 3 - Período clínico em dias do vírus fixo da raiva CVS no modelo hamster conforme as vias de inoculação empregadas.....	44
Figura 4 - Alinhamento das sequencias de aminoácidos da nucleoproteína do isolado de <i>L. ega</i> com amostras padrão CVS, BRPFxNA(isolado de raposa), PVNCDS (Pasteur virus).....	46
Figura 5 - Alinhamento das sequencias de aminoácidos da glicoproteína do isolado de <i>L. ega</i> com amostras padrão CVS, BRPFxNA (isolado de raposa), PVNCDS (Pasteur virus).....	47
Figura 6 - Dendrograma da relação filogenética estabelecida entre a amostra do vírus da raiva isolada do morcego <i>L. ega</i> e o vírus fixo CVS/32 com outros isolados de diferentes espécies animais das Américas e outros Lyssavirus, com base na sequencia de 1482 nucleotídeos da nucleoproteína – São Paulo – 2009.....	52
Figura 7 - Dendrograma da relação filogenética estabelecida entre a amostra do vírus da raiva isolada do morcego <i>L. ega</i> e o vírus fixo CVS/32 com outros isolados de diferentes espécies animais das Américas e outros Lyssavirus, com base na sequencia de 1487 nucleotídeos da glicoproteína – São Paulo – 2009.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Substituição na sequencia aminoácidos no sitio antigênico AIII da nucleoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> –São Paulo – 2009.....	48
Quadro 2 -	Substituição na sequencia aminoácidos no sitio antigênico AIV da nucleoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> –São Paulo – 2009.....	48
Quadro 3 -	Substituição na sequencia aminoácidos no sitio antigênico AI da glicoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> –São Paulo – 2009.....	48
Quadro 4 -	Substituições na sequencia de aminoácidos no sitio Antigênico AII (aminoácidos 34 – 42 e 198 – 200), glicoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> –São Paulo – 2009.....	48
Quadro 5 -	Substituições na sequencia de aminoácidos correspondentes ao domínio de fusão dependente de baixo pH da glicoproteína (aminoácidos 102 – 179), do isolado do vírus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> –São Paulo – 2009.....	49
Quadro 6 -	Substituição no residuo 242, envolvido na patogenicidade. Sequencia de aminoácidos da glicoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> –São Paulo – 2009.....	49
Quadro 7 -	Substituição no Sitio Antigênico AIII da glicoproteína G do isolado do vírus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> –São Paulo – 2009.....	49
Quadro 8 -	Substituições no domínio transmembrana da glicoproteína (aminoácidos 440 – 461); isolado do virus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> -São Paulo – 2009.....	49
Quadro 9 -	Substituições na sequencia de aminoácidos da glicoproteína, mudanças detectadas em áreas localizadas fora dos sitios antigênicos descritos pela literatura. Isolado do vírus da raiva procedente do morcego <i>L. ega</i> – São Paulo – 2009.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação de primers empregados para a RT-PCR e o sequenciamento dos genes da nucleoproteína e glicoproteína do isolado de um morcego insetívoro <i>L. ega</i> e o vírus fixo CVS – São Paulo – 2009.....	33
Tabela 2 -	Relação das sequencias do GenBank pertencentes a glicoproteína e nucleoproteína do vírus da raiva empregadas para comparar a sequencia de aminoácidos do isolado <i>L. ega</i> – São Paulo – 2009.....	34
Tabela 3 -	Relação das sequencias de vírus da raiva disponíveis no Gen Bank que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética, quanto ao gene da glicoproteína e nucleoproteína – São Paulo – 2009.....	35
Tabela 4 -	Relação de sequencias de Lyssavirus disponíveis no GenBank que foram utilizadas como outgroup nas árvores filogenéticas da glicoproteína e a nucleoproteína –São Paulo – 2009.....	36
Tabela 5 -	Títulos virais empregados e data de realização dos experimentos de patogenicidade do isolado <i>L. ega</i> , no modelo hamster e camundongo, empregando as vias de inoculação: intramuscular, intradérmica, intranasal e ferimento superficial da pele - São Paulo – 2009.....	39
Tabela 6 -	Títulos virais empregados e data de realização dos experimentos de patogenicidade do CVS/32, no modelo hamster e camundongo, empregando as vias de inoculação: intramuscular, intradérmica, intranasal e ferimento superficial da pele - São Paulo – 2009.....	39
Tabela 7 -	Titulos virais e mortalidade do isolado do virus da raiva obtido a partir do morcego insetívoro <i>L. ega</i> no modelo hamster conforme as vias de inoculação - São Paulo – 2009.....	40
Tabela 8 -	Períodos de incubação e períodos clínicos do isolado do morcego insetívoro <i>L. ega</i> no modelo hamster conforme as vias de inoculação– São Paulo – 2009.....	40
Tabela 9-	Titulos virais e mortalidade do isolado do virus da raiva obtido do morcego insetívoro <i>L. ega</i> no modelo camundongo conforme as vias de inoculação – São Paulo – 2009.....	41
Tabela 10 -	Períodos de incubação, períodos clínicos do isolado do morcego insetívoro <i>L. ega</i> ; modelo camundongo discriminados segundo via de inoculação - São Paulo – 2009.....	41
Tabela 11-	Titulo viral e mortalidade do virus fixo da raiva amostra CVS no modelo hamster conforme as diferentes vias de inoculação -São Paulo –2009-.....	42
Tabela 12-	Periodo de incubação e período clinico do vírus da raiva amostra CVS no modelo hamster conofirme as diferentes vias de inoculação –São Paulo- 2009-.....	42
Tabela 13-	Titulos virais e mortalidade do vírus fixo da raiva amostra CVS, no modelo camundongo conforme as diferentes vias de inoculação –São Paulo- 2009.....	43
Tabela 14-	Períodos de incubação e clinico do vírus fixo da raiva amostra CVS no modelo camundongo conforme as diferentes vias de inoculação-São Paulo- 2009.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CVS	Challenge Virus Standard
DL₅₀ IC	Dose Letal 50% Intracerebral
µL	Microlitro
<i>L. ega</i>	<i>Lassius ega</i>
RABV	Rabies virus
EBLV1	European Bat Lyssavirus 1
EBLV2	European Bat Lyssavirus 2
DUV	Duvanhage Virus
MOKV	Mokola Virus
ABL	Australian Bat Lyssavirus
OMS	Organização Mundial da Saúde
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
RNA	Ribonucleic Acid
EUA	Estados Unidos da America
SHBRV	Silver haired bat rabies vírus
PV	Pasteur Virus
nt	Nucleotídeos
KDa	Kilodaltons
IM	Intramuscular
ID	Intradermico
IN	Intranasal
LP	Lesão superficial da pele
SNC	Sistema Nervoso Central

Observação Em função do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
<	Menor do que
p	Valor p
μL	microlitro
μM	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	MATERIAL.....	27
3.1.1	Vírus da raiva.....	27
3.1.2	Animais.....	28
3.1.3	Diluyente.....	28
3.1.4	Conjugado imunofluorescente.....	29
3.2	MÉTODOS.....	29
3.2.1	Técnica de imunofluorescência direta.....	29
3.2.2	Inoculação intracerebral em camundongo (IC).....	29
3.2.3	Técnica de inoculação em hamsters.....	30
3.2.4	Determinação da DL ₅₀ pelo Método de Reed-Müench.....	30
3.2.5	Determinação dos períodos de incubação e clínicos em camundongos.....	31
3.2.6	Análise estatística.....	31
3.2.7	Caracterização genética.....	32
3.2.8	Análise genética e filogenética.....	34
4	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	38
5	RESULTADOS	39
5.1	COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS ISOLADOS.....	39
5.1.1	Quadro clínico.....	39
5.1.2	Estimação do título viral (DL ₅₀).....	40
5.1.3	Estimação dos períodos de incubação, períodos clínicos, mortalidade e verificação da patogenicidade.....	40
5.2	ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DA NUCLEOPROTEÍNA E GLICOPROTEÍNA.....	46
5.2.1	Substituições na sequência de aminoácidos da nucleoproteína.....	49
5.2.2	Substituições na sequência de aminoácidos da glicoproteína.....	49
5.3	ÁRVORES FILOGENÉTICAS BASEADAS NA GLICOPROTEÍNA E NUCLEOPROTEÍNA.....	52
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE	73

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma antroponose de origem viral caracterizada por uma encefalomielite aguda fatal nos animais e no ser humano (ACHA; SZYFRES, 2003).

O vírus da raiva pertence à família *Rhabdoviridae*, um constituinte da ordem *Mononegavirales*, caracterizado por um genoma não segmentado de senso negativo. A família está dividida em seis gêneros e mais de 100 rhabdovírus não classificados, isolados de diferentes partes do mundo. Nesta família, os membros do gênero *Lyssavirus* são os mais importantes sob o ponto de vista da saúde pública e por causa de perdas econômicas. Os vírus dos gêneros *Vesiculovirus* e *Ephemerovirus* são de particular interesse na área de saúde animal, enquanto que os representantes do gênero *Novirhabdovirus* circulam entre os peixes e outros animais aquáticos e os vírus dos gêneros *Nucleorhabdovirus* e *Cytorhabdovirus* são parasitas de plantas (TORDO et al., 2004).

O gênero *Vesiculovirus* inclui os vírus causadores de estomatite vesicular (VSV) e outros vírus antígenicamente relacionados. Por sua vez, o gênero *Lyssavirus* inclui os vírus da raiva e outros relacionados à raiva e ainda alguns vírus que possuem uma relação distante com o vírus da raiva (KING, 1998).

Mais recentemente, com base na classificação genética dos nucleotídeos virais, o gênero *Lyssavirus* é constituído por sete genótipos, a saber: vírus da raiva-RABV (genótipo 1), *Lagos bat virus*-LBV (genótipo 2), *Mokola virus*-MOKV (genótipo 3), *Duvenhage virus*-DUVV (genótipo 4), *European bat lyssavirus 1*-EBLV-1 (genótipo 5), *European bat lyssavirus 2*-EBLV-2 (genótipo 6) e o *Australian bat lyssavirus*-ABLV (genótipo 7) (ARAI et al., 2003).

O genótipo 1 corresponde ao vírus clássico da raiva e é o mais amplamente distribuído no mundo, acometendo animais domésticos e silvestres. Os isolados recentes são denominados “vírus de rua” e existem, nos laboratórios, os chamados “vírus fixos”, como a amostra Challenge Virus Standard-CVS. O vírus CVS é a amostra fixa adaptada ao cérebro de camundongos e foi isolada pela primeira vez em 1882, de uma vaca, na França (HEATON et al., 1997) e é uma amostra altamente neurotópica e neurovirulenta (THOULOZE et al., 1997). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) consideram como sendo raiva a doença causada somente pelos vírus do genótipo 1.

Todos os vírus até hoje isolados do Continente Americano e do Caribe pertencem ao genótipo 1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

O vírus da raiva apresenta forma cilíndrica, com uma extremidade arredondada e outra mais plana de 80 nm de diâmetro e 180 nm de comprimento. O genoma do vírus tem um comprimento aproximado de 11.932 nucleotídeos (nt). Estruturalmente apresenta duas porções: o ribonucleocapsídeo e o envelope. O ribonucleocapsídeo possui RNA e três proteínas: Nucleoproteína N, intimamente associada ao RNA viral; a proteína L, que é uma RNA polimerase-RNA dependente, responsável pela transcrição e replicação do RNA viral, e a proteína P, que é uma fosfoproteína e age como co-fator da RNA polimerase. Por sua parte o envelope está constituído por duas proteínas: a glicoproteína G e a proteína Matrix (M ou M2) (TORDO et al., 1986; TORDO, 1996; WUNNER, 2007).

A proteína M está envolvida no processo de montagem e brotamento viral, também tem funções regulatórias da transcrição e replicação. Adicionalmente a proteína age como o principal fator indutor de apoptose dos neurônios. (SHIMIZU et al., 2007).

A proteína N, principal proteína do nucleocapsídeo, é constituída por 1.424 nt (450 aminoácidos) e tem um peso molecular de, aproximadamente, 57.000 daltons, sendo o principal componente viral. Apesar de apresentar algumas pequenas regiões com alto grau de diversidade genética, essa proteína é, ainda, a mais conservada, apresentando alta similaridade na sequência de aminoácidos. Por essa razão, a detecção do vírus da raiva por técnicas moleculares, como RT-PCR, tem sido direcionado para essa região (WUNNER, 2007).

Têm sido descritos dois sítios antigênicos, cada um deles conformado por sua vez, por três epítomos lineares ou sítios de reconhecimento de anticorpos, que já estão mapeados. O sítio antigênico I compreende a posição 358 – 367, e o sítio antigênico III, dividido em duas regiões independentes entre as posições 359 – 366 e 375 – 386. Mediante o emprego de anticorpos monoclonais nos corpúsculos de inclusão virais, tem sido identificado o epítotope II, (353 – 373) o qual aparentemente se superpõe ao sítio IV (TORDO, 1996; WUNNER, 2007)

A glicoproteína G, com 1.675 nt de comprimento, possui um peso molecular de 65 – 67 KDa, é a única proteína exposta a qual está inserida no envelope viral lipídico. Esta glicoproteína é considerada como sendo o principal determinante patogênico, tendo um papel importante no brotamento e transporte viral através dos axônios durante a infecção, a apoptose e evasão da resposta imunitária do hospedeiro. É um dos componentes mais imunogênicos do vírus, utilizado na elaboração das vacinas disponíveis comercialmente na atualidade (ROSS; FAVI; VASQUEZ, 2008). As substituições pontuais no aminoácido Serina₃₃₃ desta glicoproteína permitem reverter a virulência de amostras de vírus laboratoriais

altamente atenuadas (TAKAYAMA et al., 2006). Foram identificados oito sítios antigênicos no domínio externo da glicoproteína G (I – VI e G1). Os sítios I, III e VI e “a” envolvem os aminoácidos nas posições 231, 330 – 338, 264 e 342 – 343 respectivamente. O sítio II é descontínuo, localizado nas posições 34 – 42 e 198 – 200 ligadas por pontes de dissulfeto (TORDO, 1996)

No passado, acreditava-se que o vírus da raiva era único e antigenicamente distinto de outros membros da família *Rhabdoviridae*, quando então foi isolado o *Lagos bat virus*. Este vírus foi isolado de um morcego frugívoro *Eidolon helvum*, na Nigéria, em 1956. Em 1974 foi isolado de um outro morcego insetívoro *Micropteropus pusillus*, na República da África Central (ARAI et al., 2003). Mais tarde, novas amostras foram isoladas de outras espécies de morcegos no Senegal e África do Sul, e até o presente momento foram notificados 15 isolamentos, incluindo oito casos em morcegos frugívoros e um em gato, no entanto, não tem sido confirmada a ocorrência deste vírus em humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

O Mokola virus foi isolado de musaranhos (*Crocidura spp*), roedores, gatos e de um cão na África e de sete gatos apresentando doença semelhante à raiva em KwaZulu-Natal e nas províncias do Cabo Leste da África do Sul. Acredita-se que o vírus tenha causado doença semelhante à raiva em duas pessoas na Nigéria, em 1969 e 1971, logo após a sua descoberta em musaranhos em 1968, no entanto, nenhum caso humano tem sido reconhecido desde então (FAMILUSI et al., 1972; NEL et al., 2000). Até o presente, o *Mokola virus* não foi isolado de nenhum morcego e é o mais geneticamente distante do vírus clássico da raiva (genótipo 1), e as vacinas modernas contra o vírus da raiva não protegeriam contra a infecção com o *Mokola virus*. Há também citação na literatura de que o *Mokola virus* teria sido responsabilizado na morte de alguns humanos com encefalomielite, principalmente na região ao Sul do deserto do Sahara (LE MERCIER; JACOB; TORDO, 1997).

O *Duvenhage* vírus originalmente foi isolado em 1970, de um humano que havia sido mordido por um morcego insetívoro não identificado, em Transvaal, 150 Km a Noroeste de Joanesburgo, África do Sul (TIGNOR et al., 1977). Em 1981, o vírus foi isolado provavelmente de um morcego insetívoro *Miniopterus schreibersi* que havia sido capturado à luz do dia por um gato, na cidade de Makhado, província de Limpopo, África do Sul, e em 1986, o vírus foi recuperado de um morcego insetívoro *Nycteris thebaica*, no Zimbábue (SCHNEIDER; BARNARD; SCHNEIDER, 1985; ARAI et al., 2003). Os vírus isolados no Continente Africano, os genótipos 2-4, foram denominados de “vírus aparentados ou relacionados à raiva”, por Shope et al., (1970) e na época incluíam os vírus da raiva-RABV,

Mokola vírus-MOKV e *Lagos bat vírus*-LBV, em seguida foi acrescentado à lista o Duvenhage vírus (BRASS, 1994).

O EBLV-1 foi isolado do morcego insetívoro *Eptesicus serotinus* na Alemanha em 1968, na Polônia em 1985, na Dinamarca, Holanda e Espanha, em 1987, e na França em 1989. Alguns isolados de EBLV-1 foram obtidos de morcegos na Ucrânia e de um humano relacionado com morcego, na Rússia, em 1985 (ARAI et al., 2003). Em 1985, um menino de 11 anos de idade de Belgorod, Rússia, foi mordido no lábio inferior por um morcego não identificado e veio a óbito com sinais de raiva. O isolado foi denominado de *Yuli virus* e classificado como *European bat Lyssavirus* tipo 1 (genótipo 5) (JACKSON, 2002a).

O EBLV-2 (genótipo 6) foi isolado de um humano na Finlândia em 1985, e de morcegos na Holanda, na Suíça, e no Reino Unido. O EBLV-2 é encontrado principalmente no morcego do gênero *Myotis* (*Myotis dasycneme* e *M. daubentonii*) (FOOKS et. al, 2003).

Em 1996, foi encontrado na Austrália um vírus com alta semelhança genética e antigênica com o vírus da raiva, o qual foi denominado como *Australian bat lyssavirus* (KUZMIN; RUPPRECHT, 2007). O ABLV foi isolado, até o presente, de cinco espécies de morcegos, popularmente conhecidos como raposas voadoras (*Pteroptídeos*), de uma espécie de morcego insetívoro e de dois humanos (ARAI et al., 2003). O ABLV é encontrado na forma de duas variantes, isoladas respectivamente de raposas voadoras (*Pteropus alecto*) e de morcegos insetívoros *Saccolaimus flaviventris*, ambas denominadas de genótipo 7 (LUNT, 2006). Estes lyssavirus de morcegos parecem estar distribuídos desde o *New South Wales*, *Queensland*, *Victoria* e *Northern Territory*, registrados partir de 1995 (KUZMIN; RUPPRECHT, 2007).

Quatro isolados recentes de lyssavirus de morcegos da Ásia Central (Aravan vírus-ARAV, isolado do morcego *Myotis blythi* no Quirguistão) (ARAI et al., 2003), Khujand vírus-KHUV, isolado do morcego *Myotis mystacinus* no norte do Tadjiquistão, Irkut vírus-IRKV, isolado do morcego *Murina leucogaster* no Leste siberiano (KUZMIN et al., 2003) e o *West Caucasian bat vírus*-WCBV, isolado do morcego *Miniopterus schreibersi*, da região do Cáucaso (BOTVINKIN et al., 2003) foram sugeridos para constituírem novos genótipos 8-11. Os genótipos 2-4 possuem uma ampla distribuição na África, enquanto que os genótipos 5 e 6 são encontrados na região Leste da Europa (HEATON et al., 1997).

De maneira semelhante aos vírus da raiva (RABV, genótipo 1), os Mokola vírus (genótipo 3), Duvenhage vírus (genótipo 4), *European bat lyssavirus* 1 (genótipo 5), *European bat lyssavirus* 2 (genotipo 6) e o *Australian bat lyssavirus* (genótipo 7) foram associados com casos fatais de encefalites humanas (JACKSON, 2007b).

Dentro de cada genótipo existem sublinhagens correspondendo às variantes circulando em regiões geográficas específicas e/ou em hospedeiros animais. Os genótipos são, por sua vez, divididos em dois filogrupos: o filogrupo I que agrupa os genótipos 1, 4, 5, 6 e 7, e o filogrupo II, constituído pelos genótipos 2 e 3. Os vírus de cada filogrupo diferem em suas propriedades biológicas como patogenicidade, indução de apoptose, reconhecimento do receptor celular e imunogenicidade. Esta classificação em filogrupo deverá evoluir no futuro, com novas pesquisas envolvendo os lyssavirus de morcegos (BADRANE et al., 2001).

Os quirópteros são importantes reservatórios para seis dos sete genótipos até hoje descritos e somente para o genótipo 3 (MOKV), ainda não se conhece o reservatório envolvido. Para nove dos sete e outros quatro prováveis novos genótipos 8-11, os morcegos são reservatórios exclusivos, enquanto que, para a raiva (genótipo 1), além de morcegos, há também a participação de carnívoros terrestres. Por outro lado, os genótipos 2-11 possuem uma distribuição geográfica e número de hospedeiros envolvidos mais limitados que o genótipo 1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Na América Latina e no Caribe onde circulam apenas os vírus do genótipo 1, o ciclo epidemiológico da raiva envolve morcegos, sendo o *Desmodus rotundus* o principal transmissor para outras espécies animais, fato este mencionado pela primeira vez por Carini (1911), no Estado de Santa Catarina. Desde então, as epidemias de raiva transmitidas por morcegos hematófagos acometendo herbívoros domésticos e humanos estão fartamente documentadas na literatura (ACHA; SZYFRES, 2003).

Nos episódios de Santa Catarina, Haupt e Rehaag (1925) relataram a ocorrência da raiva em morcego *Phyllostoma superciliatum* (atualmente classificado como *Artibeus lituratus*) que não é de hábito hematófago, porém, os pesquisadores da época duvidaram do relato destes dois pesquisadores, argumentando que poderia ter ocorrido erro na sua identificação. Anos mais tarde, Pawan (1948) atribuía ao morcego frugívoro *Artibeus planirostrum trinitalis* a transmissão da raiva aos humanos e animais da ilha de Trinidad, no Caribe Espanhol.

O primeiro relato de raiva em morcego não hematófago nos EUA, confirmado laboratorialmente, aconteceu na Flórida, em 1953, no qual um menino de 7 anos foi envolvido num incidente com um morcego insetívoro. A partir de então, as autoridades de saúde pública fizeram levantamento em todo o território americano e apenas no Alaska e Havaí não encontraram morcegos infectados pelo vírus da raiva (BRASS, 1994). Na atualidade, os casos de raiva humana vêm sendo descritos na América do Norte, tendo como principal fonte de infecção os morcegos insetívoros, particularmente os *Lasionycteris noctivagans* e *Pipistrellus*

subflavus (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). Embora a maior parte dos animais silvestres diagnosticados positivos para raiva sejam de outras espécies de mamíferos terrestres como os *skunks* (*Mephitis mephitis*), *raccoons* (*Procyon lotor*) e raposas (*Vulpes vulpes*), quase todos os óbitos humanos por raiva são associados aos morcegos insetívoros. (BRASS, 1994; MESSENGER et al., 2003).

No Chile foi registrado um caso de raiva humana transmitida por morcego insetívoro, da espécie *Tadarida brasiliensis*, importante reservatório da raiva no território chileno, devido a sua ampla abrangência geográfica naquele país (FAVI, 2002).

Na Colômbia, as análises filogenéticas sugerem a ocorrência de transmissão de variantes provenientes de morcegos insetívoros *Molossus molossus* e *Eptesicus brasiliensis* para humanos e cães domésticos (PAEZ et al., 2003).

Nas Américas, as espécies de morcegos *Desmodus rotundus*, *Tadarida brasiliensis*, *Eptesicus fuscus*, *Lasiurus spp* (*L. borealis*, *L. cinereus*), *Lasionycteris noctivagans* (*silver-haired bat*), *Pipistrellus subflavus* e *Myotis sp* (*M. lucifugus*; *M. yumanensis*, *M. californicus*; *M. evotis*) têm sido identificadas como reservatórios do vírus da raiva de diferentes variantes. Estas variantes do vírus da raiva estão segregadas em grupos filogenéticos que representam as características dos morcegos hospedeiros, isto é, migratórios versus não migratórios, gregários versus não gregários, insetívoros versus hematófagos, etc. (BRASS, 1994). O fenômeno de *spillover* envolvendo estas variantes é observado frequentemente, embora a ocorrência da raiva em seres humanos na América do Norte seja baixa, 24 dos 32 casos humanos diagnosticados entre 1990 e 2000 foram causados por variantes de morcegos insetívoros, notadamente os morcegos “*silver haired bats*” (*L. noctivagans*) e os *P. subflavus* (BRASS, 1994; CHILDS, 2002).

Em relação aos morcegos no Brasil, são encontrados 64 gêneros e 167 espécies dentre as mais de 1.100 conhecidas no mundo, sendo apenas três de hábito alimentar hematófago e os restantes sendo insetívoros, frugívoros, nectarívoros, piscívoros e carnívoros (REIS et al., 2007). Eles estão distribuídos em todo o território nacional e possuem uma alta diversidade, principalmente no Sudeste, considerada a região cuja quiropteroфаuna é a mais estudada. A grande maioria dos casos de raiva ocorreu em espécies insetívoras, que são as predominantes em nosso meio (UIEDA et al., 1996; KOTAIT, 2005). Dentre as espécies insetívoras do Estado de São Paulo, com diagnóstico laboratorial positivo para raiva, podem ser citadas: *Myotis nigricans*, *Myotis sp.*, *Eptesicus sp.*, *Lasiurus ega*, *Lasiurus cinereus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Tadarida brasiliensis*, *Histiotus velatus*, *Molossus rufus*, *Eumops sp.* (UIEDA et al., 1996; SCHEFFER et al., 2007).

A distribuição do morcego insetívoro *Lasiurus ega* (Gervais, 1856) é ampla, incluindo os mais variados *habitats* no Brasil, ocorrendo em todos os biomas. Embora não comprovado, o comportamento migratório tem sido sugerido para a América do Sul. Esta espécie tem sido encontrada com relativa frequência em abrigos naturais e artificiais, inclusive de ambientes urbanizados (REIS et al., 2007).

Em alguns estados brasileiros, nos últimos anos, foram diagnosticados casos humanos transmitidos por morcegos hematófagos, e no Estado de São Paulo, há relatos de variantes do vírus da raiva de morcegos hematófagos causando raiva em caninos e felinos. O uso de anticorpos monoclonais e técnicas genéticas de sequenciamento permitiram esclarecer que a variante envolvida é a variante 3, relacionada ao morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Esta variante tem sido encontrada em morcegos não hematófagos dos gêneros *Artibeus*, *Myotis*, *Molossus*, *Nyctinomys*, *Lasiurus* e *Histiotus*, que poderia ser interpretada como ocorrência de spillover da variante de *D. rotundus* para morcegos não hematofagos. (FAVORETTO et al., 2001).

Merece destaque o fato de que a maioria dos casos humanos de raiva transmitida por morcegos insetívoros nos EUA não possui histórico de exposição a estes animais. Casos de raiva nos quais foram identificadas variantes próprias de morcegos, sem evidências de mordeduras, também foram relatados em diversos países da Europa e do continente americano. (KOTAIT et al., 2007). A maioria das pessoas não reconhece o risco de adquirir a doença mediante a mordedura de morcegos não hematófagos, pois, os ferimentos causados são minúsculos e devido ao hábito característico destes animais, podem originar circunstâncias de exposição incomuns (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

Os casos de raiva humana que envolvem os morcegos não hematófagos são pouco documentados e têm como denominador comum a incerteza sobre como aconteceu a exposição, relatos de casos semelhantes têm sido registrados nos Estados, Unidos, Canadá e Chile. O termo “*cryptogenic rabies*” foi utilizado na literatura científica para se referir às situações onde não está clara a maneira de exposição nem o mecanismo de transmissão do vírus (SMITH et al., 1967; GIBBONS, 2002; MESSENGER et al., 2002; MESSENGER et al., 2003).

Nos Estados Unidos, na década de 1990, aconteceram em média três casos anuais de raiva humana, 24 de 32 óbitos são atribuíveis às variantes próprias de quirópteros insetívoros, e do total de casos, em apenas dois foi possível estabelecer a ocorrência de mordeduras (DESPOND et al., 2002).

A raiva em quirópteros tem sido registrada em todo o território dos Estados Unidos; para o ano 1999 e estes contribuíram com 14% do total dos casos de raiva animal. Somente 4% dos morcegos encaminhados para diagnóstico laboratorial, foram positivos para IFD. É possível que estes dados estejam refletindo um viés na amostragem, que abrangeu apenas animais doentes e a prevalência da doença na realidade esteja perto do 1%. (GIBBONS, 2002).

No Canadá, três de quatro casos de raiva humana ocorridos desde 1970, envolvem morcegos insetívoros das espécies *Lasionycteris noctivagans* e *Pipistrelus subflavus* como transmissores, o último caso foi registrado no ano 2001. O paciente era um menino de 9 anos, cujo diagnóstico foi realizado 7 dias após o começo dos sinais clínicos. (DESPOND et al., 2002).

Gibbons, em 2002, fez uma revisão dos 24 casos humanos acontecidos nos Estados Unidos, quando examinados os prontuários, foram encontrados nove pacientes que tiveram contato direto com morcegos, porém, outros cinco relataram a presença de quirópteros no local de residência sem exposição direta. Na maioria dos casos estava envolvido o morcego insetívoro *Lasionycteris noctivagans*, conhecido como “silver-haired bat”.

Neste mesmo trabalho, Gibbons, considerou as seguintes hipóteses para esclarecer o mecanismo de transmissão da doença nesses casos examinados: 1) as variantes podem ter patogenias diferentes, nesse caso seria possível a transmissão a partir de lesões epidérmicas superficiais ou ainda através de aerossóis. 2) a intervenção de um segundo hospedeiro que adquire a raiva de morcego e depois transmite para o ser humano 3) as mordeduras de morcegos não são reconhecidas ou são minimizadas como via potencial de infecção.

A primeira teoria está baseada em evidência experimental que aponta a existência de variantes do vírus da raiva com alta afinidade para se replicar em células de origem epidérmica; este pode ser o caso da variante associada ao “silver-haired bat” ou variante SHBRV. Quando comparada a patogenicidade deste vírus com um isolado de coioote no modelo camundongo, precisou uma dose 10 vezes maior para produzir doença pelas vias intramuscular, intradérmica e intranasal (MORIMOTO et al., 1996).

A inalação do vírus da raiva na forma de aerossóis representa uma via potencial de exposição sem envolver a mordedura, no entanto, com exceção de determinados laboratoristas que manipularam o vírus da raiva, a transmissão por aerossóis em condições naturais são raras. No ano de 1972 aconteceu um surto de raiva em carnívoros silvestres, presumivelmente, por via aerógena. Os animais estavam sendo usados em pesquisas com isolamentos de vírus procedentes de quirópteros, na colônia não havia morcegos e aconteceu

a transmissão entre animais sem mordedura ou qualquer outro tipo de contato entre eles, os animais encontravam-se colocados individualmente em gaiolas separadas. De 197 animais não vacinados, 64 vieram a óbito num período de 8 meses e outros 5 adquiriram anticorpos num nível superior ou igual a 1:50, sem vacinação prévia. Uma explicação possível é a exposição por aerossóis gerados durante os procedimentos de limpeza, devido ao fato de ter utilizado um jato de água de alta pressão para remover a urina e as fezes das gaiolas. (WINKLER; BAKER; HOPKINS, 1972).

A literatura registra o uso de outros modelos para o estudo do mecanismo de transmissão aerógena, utilizando o modelo camundongo (*Mus musculus*). Johnson, Phillpots e Fook (2006) estudaram a possibilidade do vírus da raiva-RABV e do EBLV-2 serem transmitidos por via aerógena. Os camundongos foram desafiados pela introdução do vírus fixo CVS diretamente nas passagens nasais e duas horas após sua administração o RNA viral foi detectado na língua, pulmão e estômago. Todos os animais desafiados pela via intranasal desenvolveram a doença sete dias pós-infecção. Dois camundongos, no total de cinco desafiados intranasalmente com a amostra EBLV-2 desenvolveram a raiva entre 16 e 19 dias pós-infecção. Os autores desenvolveram um dispositivo para desafiar os animais por meio de aerossóis. Utilizando este dispositivo, os camundongos desafiados com RABV foram altamente suscetíveis à inalação, o que não foi verificado com o EBLV-2. Johnson, Phillpots e Fook (2006) concluíram que os lyssavirus e o RABV podem ser transmitidos pela via aerógena, sendo a transmissão dose-dependente.

A segunda teoria da intervenção de uma espécie intermediária na transmissão morcego – humano é pouco provável. A informação achada é especulativa e sugere que o *spillover* entre morcegos e carnívoros é muito rara de acontecer (GIBBONS; 2002). Apenas tem sido registrada duas vezes, a primeira envolvendo o achado da variante própria do “Big Brown bat” em coite (BAER; SMITH, 1991).

Os casos bem documentados de raiva não atribuíveis às mordeduras são escassos na literatura médica, principalmente no que se refere à transmissão aerógena do vírus. Gibbons (2002), sugere que dado o conhecimento atual da patogenia do vírus da raiva, é muito provável que estes casos tenham acontecido por mordedura dos morcegos, mas como as lesões são praticamente imperceptíveis, esta via de entrada é desconsiderada ou simplesmente esquecida pelo paciente. O risco de adquirir raiva, associado com mordedura de animais terrestres já é conhecido, no entanto, existe uma falta de informação entre os profissionais da saúde e o público em geral com respeito ao risco associado ao contato com morcegos não hematófagos (HUOT et al., 2008).

2 OBJETIVOS

No Brasil, nos últimos anos, o diagnóstico da raiva em morcegos não-hematófagos está se tornando cada vez mais frequente (BRASIL, [2009]). Pelos fatos expostos anteriormente, este trabalho teve como objetivos:

- Estudar o comportamento biológico de um isolado do vírus da raiva procedente do morcego insetívoro *Lasiurus ega*, utilizando como referencia o vírus fixo Challenge Vírus Standard – CVS, no modelo camundongo e hamster. O estudo do comportamento biológico abrangeu a observação do quadro clínico, estimação do título viral (DL_{50}), estimação do período de incubação, estimação do período clínico e estimação da mortalidade.
- Verificar a patogenicidade utilizando as seguintes vias de exposição: Intramuscular, intradérmica, intranasal e ferimento superficial na pele.
- Caracterizar os vírus mediante o sequenciamento da nucleoproteína, estudar a sua relação filogenética com outros isolados de morcegos das Américas. Verificar a relação existente entre as substituições de aa do gene da glicoproteína com a patogenicidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa proposta neste trabalho foram empregados os seguintes materiais e métodos:

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vírus da raiva

Foram selecionados dois vírus da raiva: um vírus fixo de laboratório e um isolado de campo procedente de morcego insetívoro.

- Vírus fixo CVS/32: Foi utilizado o vírus procedente do Ex-Centro Panamericano de Zoonoses, Argentina, mantido congelado à temperatura de -20° C, com sucessivas passagens em camundongos por via intracerebral. Após reativação do vírus com passagens intracerebrais em camundongos, foi empregado quando atingiu um título viral $\geq 10^{5,0}$ DL₅₀/0,03 mL IC em camundongos.

- Isolado do vírus da raiva obtido do morcego insetívoro *Lasiurus ega**: Este isolado previamente diagnosticado positivo para raiva pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (IC) e mantido congelado à -20° C foi inoculado, após o preparo da suspensão cerebral a 1:5 (p/v), em camundongos por via intracerebral, com a finalidade de reativação. Após cinco passagens sucessivas em camundongos, por via intracerebral, o isolado apresentou um título viral de $10^{4,0 \pm 0,53}$ DL₅₀.

*Gentilmente cedido pelo Dr. Avelino Albas, Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Sorocabana. Presidente Prudente, SP, Brasil.

3.1.2 Animais

Foram empregados dois modelos animais para a observação do comportamento biológico dos vírus estudados: camundongos e hamsters.

- Camundongos (*Mus musculus*): Linhagem CH3 - Rockefeller, procedente do biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP. Após o nascimento e desmame, os animais foram separados conforme o sexo e os animais com peso entre 14-17 gramas foram mantidos em caixas de polipropileno, em número de 10, com ração e água fornecidos “*ad libitum*”. Estes animais foram empregados para a titulação de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos e do vírus fixo CVS, e nas operações de reativação das amostras. Para a obtenção de reagentes empregados para a técnica de imunofluorescência direta aplicada à raiva, as suspensões do vírus CVS foram preparadas a partir do cérebro de camundongos previamente inoculados com o vírus CVS e sacrificados na fase agônica da doença.

- Hamsters (*Mesocricetus auratus*): Sem linhagem definida, criados no mesmo Departamento, adultos jovens, com peso situado entre 100-110 gramas, distribuídos em grupos de 8 - 10 animais cada, separados em machos e fêmeas. Estes animais foram inoculados com as amostras do vírus da raiva conforme as diferentes vias de inoculação.

3.1.3 Diluente

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS, 0,01 mol/L, pH 7,4), conforme descrito por Webster e Casey (1996), utilizado para a prova de imunofluorescência.

Diluente de vírus, contendo soro de coelho inativado, esterilizado com filtro Millipore de 142 mm de diâmetro, membrana tipo HA e porosidade de 0,45µm, acrescentado de Penicilina (1000 UI/mL) e estreptomicina (2 mg/mL), conforme Koprowski (1996).

3.1.4 Conjugado imunofluorescente

O conjugado utilizado foi providenciado pelo Instituto Pasteur de São Paulo, produzido com a imunoglobulina IgG anti-rábica de coelho, marcada com o isotiocianato de fluoresceína. O conjugado foi titulado antes de sua utilização, para determinar a diluição ótima de trabalho.

3.2 MÉTODOS

No desenvolvimento do presente trabalho foram empregados os seguintes métodos:

3.2.1 Técnica de imunofluorescência direta

A técnica empregada foi executada conforme a descrição de Goldwasser e Kissling (1958), com ligeira modificação descrita por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996). As impressões por pressão de fragmentos de tecidos obtidas em lâminas de microscopia, tamanho 26 x 76 mm e de borda esmerilhada, foram fixadas com acetona a -20° C por 2 horas e submetidas ao conjugado anti-rábico, por 30 minutos à temperatura de 37°C, por 30 minutos. Após três lavagens sucessivas com solução salina tamponada com fosfatos (pH 7,4) e secadas à temperatura ambiente, e montagem com lamínulas e com glicerina tamponada pH 8,4, foram observadas com microscópio de imunofluorescência, marca Olympus modelo BX 60F5, dotada de lâmpada de halogênio. As lâminas foram consideradas positivas quando era observada a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmática com coloração característica, de diferentes tamanhos e algumas vezes lembrando a presença de “areia antigênica”.

3.2.2 Técnica de inoculação intracerebral em camundongos (IC)

Foi empregada a técnica descrita por Koprowski (1996), utilizando seringa de 1,0 mL, do tipo tuberculina, dotada de agulha 27G, na dose de 0,03 mL. Os animais inoculados foram observados por um período de 30 dias, à procura de sinais característicos da raiva. Ao final do

experimento, os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia, e necropsiados em seguida para a colheita de materiais.

3.2.3 Técnica de inoculação em hamsters

As amostras do vírus da raiva foram inoculadas em hamsters com o emprego de seringas de tuberculina de 1,0 mL com agulha 7,5 G, utilizando uma carga viral de $10^{2,0}$ até $10^{6,0}$ DL₅₀ IC / 50 µL pelas diferentes vias de inoculação: intramuscular no quadríceps femural, via intradérmica, na região metatarsiana; via intranasal, com instilação da suspensão viral diretamente nas fossas nasais e por ferimento superficial na pele, com o uso de lâmina de bisturi, com deposição de 0,05 mL da suspensão viral sobre uma pequena porção de algodão e o mesmo foi colocado sobre a região lesionada e fixado com esparadrapo.

Os animais foram observados por um período de 30 – 45 dias, à procura de sinais da raiva. Todos os animais sobreviventes ao final do experimento foram sacrificados e necropsiados em seguida para a colheita de materiais.

3.2.4 Determinação da DL₅₀ pelo Método de Reed-Müench

A partir de cérebros infectados com o vírus da raiva, obtidos de camundongos previamente inoculados, foram preparadas suspensões a 20% e em seguida, suspensões seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} . Foram inoculados 10 camundongos para cada diluição. Os camundongos inoculados foram observados por 21 dias à procura de sinais de raiva. Todos os camundongos mortos a partir do quinto dia pós-inoculação e manifestando sinais nervosos característicos da raiva nesta espécie foram considerados positivos. Impressões obtidas de cérebros desses animais foram submetidas à prova de imunofluorescência para comprovação da infecção pelo vírus da raiva. Informações sobre o número de mortos e sobreviventes foram registradas em fichas e os títulos de vírus foram calculados de acordo como o método descrito por Reed e Munch (1938) e expressos em logDLIC₅₀ (Dose letal 50% por 0,03 mL, via IC em camundongos).

Para as estimativas do título viral foram calculados os intervalos de confiança empregando-se a seguinte fórmula:

$$SE(DLIC_{50}) = 1,96 \sqrt{0,79hR/n} \text{ sendo:}$$

h = intervalo comum entre as doses

R = variação interquartil, $DLIC_{75} - DLIC_{25}$

n = número de indivíduos submetidos para cada diluição.

Com adoção de $\alpha = 0,05$ e $Z = 1,96$, a fórmula para o cálculo do intervalo de confiança da $DLIC_{50} = DLIC_{50} \pm SE(DLIC_{50})$, conforme Pizzi (1950).

3.2.5 Determinação dos períodos de incubação e clínicos em camundongos

A observação diária dos animais inoculados foi realizada durante 30 dias pós-inoculação à procura de sinais indicativos de raiva: xifose e eriçamento da pelagem, ataxia, paralisia da faringe, hipersalivação, aerofobia, fotofobia, hiperestesia, agressividade, canibalismo, hemiparesia (membros posteriores), paralisia total, paralisia dos músculos respiratórios, desidratação, salivação, fasciculações musculares, tremores e prostração.

Qualquer mortalidade apresentada antes de 120 horas pós-inoculação não foi atribuída ao vírus de raiva. O período de incubação foi determinado como o tempo transcorrido entre a inoculação e manifestação do primeiro sinal clínico de doença. O período clínico foi considerado como o tempo transcorrido entre a manifestação do primeiro sinal de doença até o óbito.

A patogenicidade dos vírus foi verificada quando a inoculação pelas diferentes vias testadas produziu doença com os sinais previamente descritos.

3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados a través do teste Kruskal-Wallis com auxílio do programa Minitab versão 15 (2006 Minitab Inc. Lead Technologies, Inc), adotando-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Para o análise foram contemplados os seguintes fatores: isolado empregado e via de exposição empregada versus períodos de incubação, períodos clínicos e mortalidade.

3.2.7 Caracterização genética

O isolado obtido do morcego *Lasiurus ega* e o vírus fixo CVS/32 foram submetidos à extração de RNA a partir de suspensão viral a 10%, empregando o kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Germany), onde o RNA foi adsorvido em uma matriz de sílica e posteriormente eluído com tampão específico. O material amplificado foi enviado ao *Veterinary Research Center, Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, do College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa, Japão*. Basicamente, os procedimentos para a realização da prova de RT-PCR e sequenciamento foram os seguintes: um microlitro de cada RNA (0,2 – 0,4 µg) foi adicionado a 25 µl do mix 2x SUPERScript One-Step RT-PCR (Invitrogen, CA, USA), 2µL do primer anti-senso (10 µM), 1,8 µL de MgSO₄ (50 µM), 1 µl do mix RT-PCR/Platinum Taq (Invitrogen) e 17,2 µL de água DEPEC, para uma reação final de 50 µL e submetidos a uma etapa inicial de transcrição reversa de 50°C por 60 min., seguidos de 40 ciclos de PCR a 94°C por 30 seg., 54°C por 20 seg., e 68°C por 2 minutos, no termociclador PTC-0200 DNA Engine (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) (SATO et al., 2009; SATO et al., 2004). Os produtos amplificados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, o cDNA obtido foi purificado com o Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany). As sequências foram determinadas em sequenciador automático (ABI Prism 3100, Applied Biosystems, Foster city, CA, U.S.A), empregando o kit de sequenciamento PRISM Dyedexy Terminator Cycle sequencing Ver 2.0 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) e o kit Big Dye Terminator Cycle sequencing. Para a reação de RT-PCR e sequenciamento foram empregados os primers descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Relação de primers empregados para a RT-PCR e o sequenciamento dos genes da nucleoproteína e glicoproteína de um isolado da raiva procedente do morcego insetívoro *L. ega* e o vírus fixo CVS – São Paulo – 2009

(Continua)

ALVO	Primer	Sequencia de Nucleotídeos (5'-3')	Posição	Senso	Uso
Nucleoproteína	Jw12	ATGTAACACCYCTACAATTG	55-73	+	RT-PCR
	P1(SAS?)	CTACAATGGATGCCGACAAGA	66-86	+	Seq.
	Nes-s	ATGGATGCCGACAAGATTGT	71-90	+	Seq.
	ICF-N2	GGAAYTGGGCTCTRACAGGRGG	323-346	+	Seq.
	CHIDN-R1	GCCCAATTCCCTTCTACATC	362-342	-	Seq.
	d-365	TGGGGTGATCTTCTCCTTT	385-365	-	Seq.
	Nes-c	GCWATCAGGATTCCATAGCT	460-341	-	Seq.
	BRADN-C4	TCAGTACGCTTGATCTCCAC	414-395	-	Seq.
	BRABN-S7	TTATGAGGAYTGCTCAGGG	765-784	+	Seq.
	BRABN-S3	GGACTGGTGTCATTTACAGG	782-801	+	Seq.
	BRADN-S3	CTCACCGCAAGAGAAGCAAT	821-840	+	Seq.
	CHIDN-S2	TGTTCAATCTCATTCACTTTGT	990-1012	+	Seq.
	P2	CCCATATAACATCCAACAAAGTG	1029-1007	-	Seq.
	BRBRV-NS1	ACATGTGCCCCDCATGAGATGTC	1077-1099	+	Seq.
	BRABN-S4	TGTCTGTTCTAGGGGGCTAT	1083-1102	+	Seq.
	Psense1	CGAATCATGATGAATGGAGG	1292-1311	+	Seq.
	BRBRV-PA1	CCTGATYGCACTBGGGTT	1549-1522	-	Seq.
	N8	AGTTTCTTCAGCCATCTC	1585-1568	-	RT-PCR/ Seq.

Tabela 1 – Relação de primers empregados para a RT-PCR e o sequenciamento dos genes da nucleoproteína e glicoproteína de um isolado da raiva procedente do morcego insetívoro *L. ega* e o vírus fixo CVS – São Paulo – 2009 (Conclusão)

ALVO	Primer	Sequencia de Nucleotídeos (5'-3')	Posição	Senso	Uso
Glicoproteína	BRBRV-MS2667	GAAGTCAARGTGTGYAGTCCAAACGGCTA	2667-2695	+	RT-PCR
	Msense1	CTAGAAGGGGAGGARTTGAATA	2886-2908	+	Seq.
	BRBRV-MS2967	GTGAGTGCRAGRCAATGYCATAT	2967-2989	+	Seq.
	RVG62-81	TGGTATCGTGTAGACGGGGA	3398-3379	-	Seq.
	Ga3222-40	CGCTGCATTTTTRTCARAGT	3221-3239	+	Seq.
	RBRV-GS3426	GAYATACATCAYCTCAGCTGTCC	3442-3464	+	Seq.
	Ga3222-40-1	GGGATACATCTCTGCCATA	3518-3536	+	Seq.
	Gb4119-39	GGAGGGCACCATTGGTMTCT	4135-4116	+	Seq.
	GS3994	CGGTTTTGTGGATGAAAGRGGC	3995-4016	+	Seq.
	GS3994-1	GACTTGGAACGAGATCATCC	4373-4392	+	Seq.
	HmG5-1273	TTCAAGGAMGGKGATGARGC	4592-4612	+	Seq.
	HmG5-1302	TGTTGAAGTTCACCTYCCMGATGT'	4619-42	+	Seq.
	GSI-3	GGGAAAGTYATATCTTCTSTGGGA	4836-4857	+	Seq.
	RVLα-5	CCCASGAAGATATRACTTTCCC	4836-4857	-	Seq.
	DG1549	AGGTCATATCTTCATGGGA	4840-4858	+	Seq.
	Gs4846	TATCTTCATGGGAGTTGTACAA	4846-4867	+	Seq.

*seq = sequenciamento

3.2.8 Análise genética e filogenética

As sequências completas de nucleotídeos dos genes da nucleoproteína (89-1482 nt) e glicoproteína (1-1487 nt) foram determinadas empregando ATGC (ver.5.0). Para a análise de substituições da sequência de interesse pertencente ao isolado de *L. ega* foi comparado com o vírus fixo CVS e outras procedentes do GenBank as quais estão relacionadas na tabela 2.

Tabela 2 – Relação das sequencias do GenBank pertencentes a glicoproteína e nucleoproteína do vírus da raiva empregadas para comparar a sequencia de aminoácidos do isolado *L. ega* – São Paulo - 2009

Identificação do vírus	Número de acesso do Genebank	Procedência	Especie animal de origem
BR-Pfx-NA	AB362483	Paraíba, Brasil	<i>Dusicyon spp</i>
PV-N-CDS	M13215	Pasteur vírus, vírus fixo	---

...Informação não disponível

Com o objetivo de verificar o que isolado de *L. ega* pertence ao Genótipo 1 e a sua relação filogenética com outros isolados de vírus da raiva, foram elaborados dendrogramas da glicoproteína e nucleoproteína. Para a construção deles foram pesquisadas no GenBank 12 y 36 sequencias respectivamente pertencentes a morcegos de distintos hábitos alimentares das Américas, canídeos domésticos e silvestres, assim como bovinos. As sequencias usadas estão relacionadas na tabela 3. As sequencias empregadas como outgroup estão referenciadas na tabela 4. Para o alinhamento e edição das sequencias foi empregado o programa Clustal W (versão 1.83), os dendrogramas foram obtidos finalmente usando o método de Neighbor-joining mediante o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis -MEGA (versão 4.1), modelo evolutivo Kimura -2- parâmetros e bootstrap com 1000 replicações como descrito por Kobayashi et al. (2007).

Tabela 3 - Relação das sequências de vírus raiva disponíveis no GenBank que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética, quanto ao gene da glicoproteína e nucleoproteína –São Paulo - 2009

	Número de Acesso GenBank	País de origem	Hospedeiro	Sequência estudada
1	AB110664	Brasil	<i>Desmodus rotundus</i>	Gene G
2	RVU52946	Estados Unidos	<i>Lasyniocteris noctivagans</i>	Gene G
3	AB383162	Brasil	Morcego insetívoro	Gene G
4	AB383165	Brasil	Morcego insetívoro	Gene G
5	AB383166	Brasil	Morcego insetívoro	Gene G
6	AB383168	Brasil	<i>Eptesicus furinalis</i>	Gene G
7	AB383169	Brasil	<i>Eptesicus furinalis</i>	Gene G
8	AB110663	Brasil	Bovino	Gene G
9	AB110658	Brasil	Cão	Gene G
10	AB110659	Brasil	Cão	Gene G
11	AB1106561	Brasil	Gato	Gene G
12	AF394885	Estados Unidos	<i>Lassius borealis</i>	Gene N
13	AF394886	Estados Unidos	<i>Lassius borealis</i>	Gene N
14	AF394883	Estados Unidos	<i>Lassius cinereus</i>	Gene N
15	AF070450	Chile	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Gene N
16	AF394876	Estados Unidos	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Gene N
17	AF070450	Brasil	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Gene N
18	AB201806	Brasil	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Gene N
19	AB201807	Brasil	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Gene N
20	AB201808	Brasil	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Gene N
21	AB201811	Brasil	<i>Eptesicus furinalis</i>	Gene N
22	AB201812	Brasil	<i>Eptesicus furinalis</i>	Gene N
23	AB201813	Brasil	<i>Eptesicus furinalis</i>	Gene N
24	AB201815	Brasil	<i>Molossus molossus</i>	Gene N
25	AB201816	Brasil	<i>Molossus molossus</i>	Gene N
26	AB201817	Brasil	<i>Molossus rufus</i>	Gene N
27	AB297650	Brasil	Morcego insetívoro	Gene N
28	AB297651	Brasil	Morcego insetívoro	Gene N
29	AB297652	Brasil	Morcego insetívoro	Gene N
30	AB297653	Brasil	Morcego insetívoro	Gene N
31	AB297654	Brasil	Morcego insetívoro	Gene N
32	AB297655	Brasil	Morcego insetívoro	Gene N
33	AB201802	Brasil	<i>Artibeus lituratus</i>	Gene N
34	AB117969	Brasil	<i>Artibeus lituratus</i>	Gene N
35	AB117970	Brasil	<i>Artibeus lituratus</i>	Gene N
36	AB201803	Brasil	<i>Desmodus rotundus</i>	Gene N
37	AB201804	Brasil	<i>Desmodus rotundus</i>	Gene N
38	AB201805	Brasil	<i>Desmodus rotundus</i>	Gene N
39	AB083799	Brasil	<i>Desmodus rotundus</i>	Gene N
40	AB083803	Brasil	Bovino	Gene N
41	AB083805	Brasil	Bovino	Gene N
42	AB083809	Brasil	Bovino	Gene N
43	AB083793	Brasil	Gato	Gene N
44	AB083792	Brasil	Cão	Gene N
45	AB083796	Brasil	Cão	Gene N
46	AB083797	Brasil	Cão	Gene N
47	AB362483 (BRPfx1)	Brasil	<i>Dusicyon spp</i>	Gene N, G

Tabela 4 - Relação de sequências de Lyssavirus disponíveis no GenBank que foram utilizadas como outgroup nas árvores filogenéticas da glicoproteína e a nucleoproteína –São Paulo - 2009

Número de Acesso GenBank	País de origem	Nome do vírus	Genótipo
EF547459	Sudafrica	Lagos Bat virus	2
NC_006429	Sudafrica	Mokola virus	3
AY863407	Reino Unido	European Bat Lyssavirus 2	6
AY573965	Australia	Australian Bat Lyssavirus	7
EF614259	Quirquístão	Aravan virus	8
EF614261	Tadjiquistão	Khujand vírus	9
EF614260	Siberia	Irkut vírus	10

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.

O vírus fixo da raiva CVS/32 e o isolado procedente do morcego insetívoro *Lasiurus ega*, previamente identificado pela prova de imunofluorescência direta e replicado no cérebro de camundongo, armazenados à temperatura de -20°C, foram inoculados por via intracerebral em camundongos, para a reativação, até a 5ª passagem. Após a reativação, os vírus foram inoculados em hamsters e camundongos por via IM, ID, IN e por LP. Os inóculos foram titulados por via intracerebral em paralelo utilizando camundongos, imediatamente após o término da inoculação. Os experimentos de inoculação em hamsters, utilizando o isolado do *L. ega* foram realizadas em dias diferentes, com doses de vírus variando de $10^{2,36}$ a $10^{4,0}$ DL50/0,05mL, em quatro vias de inoculação. Por sua vez, para o desafio dos hamsters, utilizando o vírus CVS, foram utilizadas doses $10^{3,7}$, $10^{4,7}$ e $10^{5,7}$ DL50/0,05mL, inoculando 10 animais para cada diluição, nas quatro via testadas.

No modelo camundongo, a verificação de patogenicidade do isolado do *L. ega* e do vírus CVS foi realizada apenas uma vez, após a reativação dos vírus, considerando as quatro vias de inoculação. Após de esta fase foi realizado o seqüenciamento dos genes da nucleoproteína e glicoproteína, para observação de possíveis substituições e a confecção dos dendrogramas como já foi descrito na seção materiais e métodos.

5 RESULTADOS

Seguindo a ordem dos objetivos de pesquisa formulados, foram obtidos os seguintes resultados

5.1 COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS VÍRUS

5.1.1 Quadro clínico

Foram observados dois quadros clínicos ao longo dos experimentos de patogenicidade: nos dois modelos animais trabalhados: um quadro furioso com *L. ega* e um parálítico com o CVS. Os sinais clínicos observados foram: cifose, eriçamento da pelagem, ataxia, agressividade ou paralisia ascendente. Os dois quadros finalizavam com paralisia total, coma e morte. Ver figura 1.

Figura 1- Raiva parálítica em hamster inoculado com o vírus fixo CVS

Dois hamsters inoculados com *L. ega* pela via intramuscular, apresentaram paralisia dos membros posteriores no 16º. dia post-inoculação, com o quadro persistindo por 24 horas e posteriormente os sinais desapareceram sem deixar seqüelas nos animais. Estes hamsters não chegaram ao óbito

5.1.2 Estimação do título viral (DL₅₀)

Os títulos virais estimados no modelo hamster e camundongo para os vírus estudados aparecem nas tabelas 5 e 6

Tabela 5 - Títulos virais empregados e data de realização dos experimentos de patogenicidade do isolado *L. ega*, no modelo hamster e camundongo, empregando as vias de inoculação: intramuscular, intradérmica, intranasal e ferimento superficial da pele - São Paulo – 2009

Título viral Log ₁₀ DL50/0,03 ml ± (i.c 95%)	Título viral empregado Log ₁₀ DL50/0,05 ml ± (i.c 95%)	Data de realização
1,84 ± 0,58	2,361 ± 0,585	28/07/2008
2,09 ± 0,61	2,611 ± 0,610	29/08/2008
3,31 ± 0,48	3,831 ± 0,480	24/09/2008
3,35 ± 0,56	3,871 ± 0,560	24/10/2008
3,5 ± 0,53	4,021 ± 0,53	02/03/2009

*Título viral empregado para o desafio em camundongos realizado no dia 24/10/2008

Tabela 6 - Títulos virais empregados e data de realização dos experimentos de patogenicidade do CVS/32, no modelo hamster e camundongo, empregando as vias de inoculação: intramuscular, intradérmica, intranasal e ferimento superficial da pele - São Paulo - 2009

Título viral Log ₁₀ DL50/0,03 ml ± (i.c 95%)	Título viral empregado Log ₁₀ DL50/0,05 ml ± (i.c 95%)	Data de realização
	5,7 ± 0,525	
5,48 ± 0,525	4,7 ± 0,525*	08/05/2009
	3,7 ± 0,525	

*Título viral empregado para o desafio em camundongos realizado no dia 08/05/2009

5.1.3 Estimação dos períodos de incubação, períodos clínicos, mortalidade e verificação de patogenicidade

Nas tabelas 7 a 14 é apresentada a informação referente aos vírus estudados nos modelos animais empregados. A patogenicidade foi verificada mediante a observação de doença nos animais inoculados pelas vias de exposição testadas.

Tabela 7 – Títulos virais e mortalidade do isolado do vírus da raiva obtido a partir do morcego insetívoro *L. ega* no modelo hamster conforme as vias de inoculação - São Paulo - 2009

Dose de vírus DL50/0,05 mL ± (I.C 95%)*	Intramuscular			Intradérmica			Intranasal			Ferimento superficial na pele		
	Óbitos	N total inoculados	Mortalidade(%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)
2,361 ± 0,585	0	10	0,00	0	10	0,00	0	10	0,00	0	10	0,00
2,611 ± 0,610	0	10	0,00	0	10	0,00	0	10	0,00	0	10	0,00
3,831 ± 0,480	0	10	0,00	0	10	0,00	3	10	30,00	0	10	0,00
3,871 ± 0,560	1	10	10,00	0	10	0,00	0	10	0,00	0	10	0,00
4,021 ± 0,53	0	8	0,00	0	8	0,00	1	8	12,50	0	8	0,00
Mortalidade TOTAL	1	48	2,08	0	48	0,00	4	48	8,33	0	48	0,00

I

C* = Intervalo de confiança, com $\alpha=0,05$. **Mortalidade total no hamster com o isolado de *L. ega*: 2,60%**

Tabela 8 –Períodos de incubação e períodos clínicos do isolado do morcego insetívoro *L. ega* no modelo hamster conforme as vias de inoculação -São Paulo- 2009

Via de administração	Intramuscular	Intradérmica	Intranasal	Ferimento superficial da pele
Período de incubação	11,00*	Não houve transmissão	10,66 ± 1,15	Não houve transmissão
Período clínico (dias ± dp)	6,00*	Não houve transmissão	7,33 ± 1,54	Não houve transmissão

*o desvio padrão não foi calculado, apenas um animal adoeceu pela via intramuscular

Tabela 9 - Títulos virais e mortalidade do isolado do vírus da raiva obtido do morcego insetívoro *L. ega* no modelo camundongo conforme as vias de inoculação - São Paulo - 2009

Dose de vírus DL50/0,05 mL ± (I.C 95%)	Intramuscular			Intradérmica			Intranasal			Ferimento superficial na pele		
	Óbitos	N total	Mortalidade(%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)
3,871 ± 0,560	5	10	50,00	0	10	0,00	3	10	30,00	0	10	0,00

IC* = Intervalo de confiança, com $\alpha=0,05$. Média $\pm$ erro padrão. **Mortalidade total no modelo camundongo com o isolado *L. ega*: 20,00%**

Tabela 10 –Períodos de incubação, períodos clínicos do isolado do morcego insetívoro *L. ega*; modelo camundongo discriminados segundo via de inoculação -São Paulo - 2009

Via de administração	Intramuscular	Intradérmica	Intranasal	Ferimento superficial da pele
Periodo de incubação	16,80 ± 2,20	Não houve transmissão	14 ± 4,35	Não houve transmissão
Periodo clínico (dias ± dp)*	1,4 ± 0,54	Não houve transmissão	2,66 ± 0,57	Não houve transmissão

Tabela 11 – Titulo viral e mortalidade do vírus fixo da raiva amostra CVS no modelo hamster conforme as diferentes vias de inoculação – São Paulo – 2009

LOG ₁₀ DL _{50/0,05} mL ± (I.C 95%)	Intramuscular			Intradérmica			Intranasal			Ferimento superficial na pele		
	Óbitos	N total	Mortalidade(%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)	Obitos	N total	Mortalidade (%)	Obitos	N total	Mortalidade (%)
6,00 ± 0,525	8	8	100,00	8	8	100,00	3	8	37,5	0	8	0
5,7 ± 0,525	8	8	100,00	8	8	100,00	1	8	12,5	0	8	0
4,7 ± 0,525	3	8	37,5	5	8	62,5	1	8	12,5	0	8	0
3,7 ± 0,525	1	8	12,5	4	8	50,0	1	8	12,5	0	8	0
Mortalidade TOTAL	20	32	62,5	25	32	78,12	6	32	18,75	0	32	0

IC* = Intervalo de confiança, com $\alpha=0,05$. Média ± erro padrão

Mortalidade total com o vírus fixo CVS no modelo hamster: 39,84%

Tabela 12- Período de incubação e período clínico do vírus fixo da raiva amostra CVS no modelo hamster conforme as diferentes vias de inoculação -São Paulo - 2009

Via de administração	Intramuscular	Intradérmica	Intranasal	Ferimento superficial da pele
Periodo de incubação	7,50 ± 2,33	9,13 ± 2,23	12,00 ± 2,77	Não houve transmissão
Periodo clínico (días ± dp)*	5,13 ± 1,89	3,88 ± 2,23	7,14 ± 2,54	Não houve transmissão

Tabela 13 – Títulos virais e mortalidade do vírus fixo da raiva amostra CVS, no modelo camundongo conforme as diferentes vias de inoculação -São Paulo - 2009

Dose de vírus DL50/0,05 mL ± (I.C 95%)	Intramuscular			Intradérmica			Intranasal			Ferimento superficial na pele		
	Óbitos	N total	Mortalidade(%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)	Óbitos	N total	Mortalidade (%)
6,00 ± 0,525	10	10	100,00	7	10	70,00	1	10	10,00	0	10	0

IC* = Intervalo de confiança, com $\alpha=0,05$. Média $\pm$ erro padrão. **Mortalidade total com o vírus CVS no modelo camundongo. 45,00%**

Tabela 14- Períodos de incubação e clínico do vírus fixo da raiva amostra CVS, no modelo camundongo conforme as diferentes vias de inoculação. São Paulo, 2009

Via de administração	Intramuscular	Intradérmica	Intranasal	Ferimento superficial da pele
Período de incubação (días $\pm$ dp)	6,30 $\pm$ 0,67	7,14 $\pm$ 1,34	10,00*	Não houve transmissão
Período clínico (días $\pm$ dp)	1,5 $\pm$ 0,70	2,28 $\pm$ 1,25	1*	Não houve transmissão

*Não foi calculado o desvio padrão devido a que somente adoeceu um animal experimental

Com o vírus CVS, a via intranasal apresentou os períodos de incubação e clínico mais prolongados (Valor $p < 0,05$ no teste de Kruskal-Wallis) (Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Período de incubação em dias do vírus fixo da raiva CVS no modelo hamster conforme as vias de inoculação empregadas

Figura 3 – Período clínico em dias do vírus fixo da raiva CVS no modelo hamster conforme as vias de inoculação empregadas

A mortalidade produzida por este isolado foi menor quando comparada com o CVS e também mostrou um período de incubação mais prolongado.

No modelo camundongo, o período de incubação foi mais curto, independentemente dos vírus empregados para o desafio, apresentando uma percentagem maior de animais mortos, quando comparados ao modelo hamster.

5.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA GLICOPROTEÍNA

Para a análise foram comparadas as sequências de aminoácidos correspondentes à glicoproteína G e nucleoproteína, do isolado obtido a partir do morcego insetívoro *L. ega* e com o vírus fixo de laboratório CVS/32. A observação foi focalizada nas regiões descritas pela literatura como sítios antigênicos chave. As substituições são indicadas nas figuras 4 e 5.

Figura 4 - Alinhamento das sequencias de aminoácidos da nucleoproteína do isolado *L. ega* com amostras padrão CVS, BRPFxNa (isolado de raposa) e PVNCDS (Virus Pasteur). Em destaque substituições nos sítios antigênicos

5.2.1 Substituições na sequência de aminoácidos da nucleoproteína

As substituições nas sequências de aminoácidos da nucleoproteína são apresentadas nos quadros 1 e 2:

Posição/vírus	Aminoácidos no Vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no Isolado do <i>L. ega</i>
332	Arginina	Treonina

Quadro 1- Substituição na sequência aminoácidos no sítio antigênico AIII da nucleoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega* –São Paulo - 2009

Posição/vírus	Aminoácidos no Vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no Isolado do <i>L. ega</i>
378	Aspartato	Glutamato

Quadro 2- Substituição na sequência de aminoácidos no sítio antigênico AIV da nucleoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega* –São Paulo - 2009

5.2.2 Substituições na sequência de aminoácidos da glicoproteína

As substituições nas sequências de aminoácidos da glicoproteína são apresentadas nos quadros 3 a 9:

Posição/vírus	Aminoácidos no vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no isolado do <i>L. ega</i>
231	Leucina	Prolina

Quadro 3- Substituição na sequência aminoácidos no sítio antigênico AI da glicoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega*. –São Paulo – 2009

Posição/vírus	Aminoácidos no vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no isolado do <i>L. ega</i>
37	Asparagina	Serina
40	Glutamato	Glicina
199	Arginina	Lisina

Quadro 4- Substituições na sequência de aminoácidos no Sítio Antigênico AII (aminoácidos 34 – 42 e 198 – 200), glicoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega* –São Paulo - 2009

Posição\vírus	Aminoácidos no vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no isolado do <i>L. ega</i>
110	Glutamina	Aspartato
113	Histidina	Glutamina
126	Arginina	Lisina
133	Isoleucina	Valina
156	Glicina	Serina
160	Serina	Leucina

Quadro 5- Substituições na sequência de aminoácidos correspondentes ao domínio de fusão dependente de baixo pH da glicoproteína (aminoácidos 102 – 179), do isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega* –São Paulo – 2009 -

Posição\vírus	Aminoácidos no vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no isolado do <i>L. ega</i>
242	Alanina	Serina

Quadro 6- Substituição no resíduo 242, envolvido na patogenicidade. Sequência de aminoácidos da glicoproteína do isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega* –São Paulo - 2009

Posição\vírus	Aminoácidos no vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no isolado do <i>L. ega</i>
333	Arginina	Lisina

Quadro 7- Substituição no Sítio Antigenico AIII da glicoproteína G do isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega* –São Paulo - 2009

Posição\vírus	Aminoácidos no vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no isolado do <i>L. ega</i>
441	Asparagina	Leucina
444	Leucina	Metionina
448	Valina	Alanina
450	Treonina	Alanina
453	Metionina	Isoleucina
455	Isoleucina	Alanina
456	Fenilalanina	Isoleucina
457	Fenilalanina	Valina
458	Serina	Leucina
459	Metionina	Isoleucina
460	Treonina	Isoleucina

Quadro 8- Substituições no domínio transmembrana da glicoproteína (aminoácidos 440 – 461); isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega* -São Paulo - 2009

Posição/vírus	Aminoácidos no vírus fixo CVS/32	Aminoácidos no isolado do <i>L. ega</i>
390	Glutamina	Glutamina
394	Valina	Isoleucina
397	Valina	Metionina
409	Aspartato	Glutamato
417	Valina	Valina
425	Tirosina	Histidina
426	Asparagina	Lisina
428	Isoleucina	Valina
430	Glicina	Glicina
437	Asparagina	Serina
464	Glicina	Arginina
465	Alanina	Valina
466	Histidina	Lisina
467	Arginina	Lisina
468	Treonina	Serina
469	Glutamina	Glicina
471	Isoleucina	Treonina
472	Arginina	Glutamina
473	Histidina	Arginina
474	Asparagina	Glicina
475	Leucina	Histidina
476	Glicina	Arginina
477	Glicina	Glutamato
478	Treonina	Serina
479	Glicina	Arginina
480	Glutamato	Lisina
481	Valina	Metionina
482	Treonina	Serina
483	Alanina	Valina
484	Treonina	Alanina
485	Serina	Prolina
487	Serina	Asparagina
488	Arginina	Glicina
490	Valina	Isoleucina
491	Valina	Isoleucina
492	Prolina	Serina
496	Leucina	Serina
497	Histidina	Tirosina
500	Glicina	Glutamina
501	Glicina	Serina
502	Glutamina	Glutamato
503	Isoleucina	Treonina
504	Arginina	Glicina

Quadro 9- Substituições na sequência de aminoácidos da glicoproteína, mudanças detectadas em áreas localizadas fora dos sítios antigênicos descritos pela literatura isolado do vírus da raiva procedente do morcego *L. ega* – São Paulo - 2009

5.3 ÁRVORES FILOGENÉTICAS BASEADAS NA GLICOPROTEÍNA E NUCLEOPROTEÍNA

As duas árvores mostraram uma segregação entre os isolados correspondentes a quirópteros e carnívoros. O isolado de *L. ega* está posicionado dentro do grupo dos quirópteros com proximidade ao clado de morcegos insetívoros, resultado concordante, quando analisados os dois genes (Figuras 6 e 7).

Figura 6- Dendrograma da relação filogenética estabelecida entre a amostra do vírus da raiva isolado do morcego *L. ega* e o vírus fixo CVS/32 com outros isolados de diferentes espécies animais das Américas e outros Lyssavirus, com base na sequência de 1482 nucleotídeos da nucleoproteína – São Paulo - 2009

Figura 7- Dendrograma da relação filogenética estabelecida entre a amostra do vírus da raiva isolado do morcego *L. ega* e o vírus fixo CVS/32 com outros isolados de diferentes espécies animais das Américas e outros Lyssavirus, com base na sequência de 1487 nucleotídeos da glicoproteína – São Paulo - 2009

6 DISCUSSÃO

Durante a observação do desenvolvimento da doença foi possível identificar dois quadros clínicos diferentes no modelo hamster e camundongo, conforme os vírus empregados. Com o isolado do morcego *L. ega*, foi observado um quadro furioso, em sucessivas inoculações. Este resultado contrasta com o registrado por Constantine (2009, p. 14), que afirma que a raiva acontece mais na forma paralítica em morcegos. No entanto, outros autores relatam que nos quirópteros podem acontecer os dois quadros clínicos e a apresentação de um ou outro depende das propriedades intrínsecas das variantes virais (HANLON; NIEZGODA; RUPPRECHT, 2007).

Dentro dos fatores envolvidos na patogenia da doença têm sido considerados: a localização das lesões no SNC, variante viral, via de exposição e dose (SMART; CHARLTON, 1992; HAMIR; MOSER; RUPPRECHT, 1996). Na infecção experimental, com um isolado procedente do morcego *Molossus molossus*, usando o modelo hamster, Silva et al. (2008, p. 184) mostraram que a paralisia estava associada com degeneração Walleriana cerebelar, no ventrículo lateral e no núcleo da base, acompanhada com apresentação de manguitos perivasculares no córtex frontal, parietal e occipital.

Neste trabalho o vírus isolado do *L. ega* foi capaz de produzir a raiva em hamsters e camundongos, pelas vias intranasal e intramuscular. Para Jackson (2007b, p. 351), estas propriedades, referidas como neuroinvasividade e neurovirulencia, respectivamente, podem ser avaliadas por meio de desafio utilizando as vias periféricas. Os resultados deste experimento concordam com os descritos por outros autores sobre a capacidade do vírus em realizar transporte transneuronal a partir da inoculação intramuscular, ocular, nasal e intradérmica, numa variedade de espécies animais empregadas como modelo experimental (LAFAY et al., 1991; SMART; CHARLTON, 1992). Os resultados aqui apresentados sugerem a ocorrência de diferenças na neurovirulencia e neuroinvasividade do isolado de *L. ega* quando comparado com o CVS, diferenças que poderiam estar relacionadas com os mecanismos virais para invadir a célula, assim como os mecanismos de transporte transneuronal. (SMART; CHARLTON, 1992). Neste processo estão envolvidos receptores de membrana celular e os antígenos de superfície viral, um deles é a glicoproteína G (TORDO, 1996). E no processo de adesão viral à membrana celular, podem estar influenciando outras

condições que dependem do microambiente do local de inoculação, que são difíceis de determinar e imitar *in vitro* (TSIANG; CECCALDI; LYCKE, 1988).

No presente experimento, com a utilização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, no modelo hamster e no camundongo, não foi possível detectar diferença nos períodos de incubação e clínicos em relação aos dois vírus estudados. No entanto, na literatura, tem sido registradas diferenças de velocidade do transporte transneuronal entre o vírus fixo CVS e os vírus de rua. O vírus fixo atinge mais rapidamente o SNC (CHARLTON, 1988).

Na raiva experimental, o local de inoculação é importante para o desenvolvimento da doença. Em cobaias o vírus fixo não causa doença quando inoculado nos membros posteriores, mas sim quando inoculado na pele do pescoço (DEAN et al., 1963). No cão a inoculação intraplantar com o vírus ERA apresenta um período de incubação mais prolongado quando comparado com a via intramuscular na região massetéica ou glútea (ABELSETH, 1967).

No presente estudo, em hamsters, foi observado que doses de vírus situadas entre $10^{2,36} - 4,00$ DL₅₀ do isolado do *L. ega*, teve a capacidade de produzir doença apenas pelas vias intramuscular e intranasal, apresentando períodos de incubação de 11 dias e $10,66 \pm 1,15$ dias respectivamente. Estes resultados são semelhantes às observações de Silva et al. (2008 p. 183), que estudaram um isolado de *M. molossus* no modelo hamster, empregando para o desafio DL₅₀ / 0,03 mL pelas vias intramuscular (masseter), intrapalmar e intraplantar. Os períodos de incubação oscilaram entre 10 – 22 dias. Por outro lado, Baer e Smith (1991, p. 341), sugeriram que o modelo animal empregado pode influenciar os períodos de incubação, fato observado com um isolado de *Tadarida brasiliensis*, que exibiu um período de incubação extremamente curto em camundongos, e no hospedeiro natural pode ser de até 181 dias.

Constantine e Woodall¹ (1966 apud KUZMIN; RUPPRECHT, 2007, p. 274) sugeriram que os isolados do vírus da raiva procedentes de morcegos insetívoros podem apresentar diferenças na neuroinvasividade. A suspeita foi baseada na observação de doença após infecção experimental com um isolado de *T. brasiliensis* em carnívoros, o desenlace foi fatal na maioria dos casos quando foram empregadas vias periféricas para o desafio e os isolados procedentes do morcego *Eptesicus fuscus* não causaram doença em cães, gatos, raposas nem em texugos, empregando as mesmas vias.

¹ CONSTANTINE, D. G.; WOODALL D. F. Transmission experiments with bat rabies isolates: reactions of certain carnivore, opossum, rodents and bats of rabies virus of red bat origin when exposed by bite or by intramuscular inoculation. *American Journal of Veterinary Research*, v. 27, p. 24-32, 1966

No presente estudo a via intranasal causou doença em 8,33% dos animais desafiados, número inferior quando comparado com as observações mencionadas na literatura. Segundo Smart e Charlton (1992, p. 3), o desafio de texugos (*Mephitis mephitis*) com o vírus CVS causou doença na totalidade de indivíduos desafiados, com um período de incubação de 6 – 7 dias.

No presente trabalho os resultados obtidos com o desafio pela via intranasal corroboram que o sistema respiratório em determinadas circunstâncias, pode constituir-se em porta de entrada para o vírus mediante aerossóis, porém é muito menos freqüente do que a transmissão pelas mordeduras. A primeira somente foi relatada em ambientes como cavernas e em condições de laboratório (CONSTANTINE, 1962). A presença do vírus na mucosa nasal de morcegos naturalmente infectados foi registrada mediante o emprego de técnicas de anticorpos fluorescentes com a detecção de antígeno viral nas células epiteliais da mucosa e células da submucosa nasal (CONSTANTINE, 1972).

Na análise da sequência de aminoácidos da glicoproteína do isolado de *L. ega* foram encontradas substituições nos sítios Antígeno AI (aminoácido Prolina na posição 231), AII (aminoácido Serina na posição 37, Glicina na 40 e Lisina na 199), várias substituições no domínio de fusão dependente de baixo pH da glicoproteína (102 – 179), Serina no resíduo 242. Estes sítios antigênicos foram descritos na literatura como de influencia na patogenicidade do vírus da raiva (TORDO, 1996).

O sítio antigênico II (34 – 42 e 198 – 200), está envolvido com o reconhecimento dos receptores nas terminações nervosas e os mutantes que possuem substituições nessas regiões são 10 a 300 vezes menos patogênicos do que o CVS, quando empregada a via intramuscular em camundongos adultos (PREHAUD et al., 1988).

As substituições localizadas no segmento compreendido entre os aminoácidos 102 – 179 podem também ter influencia na patogenicidade viral. Este domínio codifica para a porção específica da glicoproteína que permite a adesão entre o vírus e a célula (WUNNER, 2007).

Pelo menos três aminoácidos presentes nas posições 242, 255 e 268 da glicoproteína G, foram identificados como necessários para a patogenicidade da amostra Nishigahara do vírus da raiva. Mediante o uso de mutantes foi comprovado que a substituição com maior relevância na patogenicidade foi àquela observada na posição 268, embora uma combinação das três substituições é necessária para causar reversão total da virulência (TAKAYAMA et al., 2006). A reversão da virulência pode ser observada através da pouca ou nenhuma

capacidade de invadir fibras nervosas resultando em taxas reduzidas de disseminação ao cérebro e de invasão celular em condições *in vitro* (CHARLTON, 1988).

As substituições de aminoácidos arginina e lisina no domínio antigênico III (posição 333) por glutamina, isoleucina, glicina, metionina ou serina, induzem a perda da capacidade para reconhecer os receptores celulares, diminuindo a virulência inclusive quando realizada a inoculação por via intracerebral em camundongos adultos. Estes achados têm sido registrados unicamente em amostras fixas de laboratório (DIETZSCHOLD et al., 1983; TORDO, 1996).

A glicoproteína tem um papel essencial na patogenia por interagir com receptores celulares e possibilita o transporte transneuronal e o consequente disseminação viral através do sistema nervoso (LENTZ et al., 1982; PREHAUD et al., 1988; THOULOZE et al., 1998). Contrastando esta evidência, podem acontecer substituições na posição 333 sem causar efeito na patogenicidade viral, sugerindo que mais de um loci podem estar envolvidos na expressão desta característica (MORIMOTO; SHOJI; INOUE, 2005; MITA et al., 2008). Por outro lado, substituições nas posições Lisina₁₉₄ e Glutamina₃₃₃ em amostras recombinantes do vírus da raiva possuem patogenicidade incrementada (FABER et al., 2005).

Na sequência de aminoácidos do isolado *L. ega* foram também encontradas substituições entre as posições 390 – 504, cujo impacto na patogênica ainda não tem sido estabelecido. É possível que estas substituições em conjunto tenham alguma relação com a resposta observada no modelo animal. Entretanto, Sato et al. (2009) observaram em isolados de morcegos não hematófagos do Brasil, substituições de Histidina, Asparagina e Glutamina na posição das Arginina₃₃₃ e Lisina₃₃₃. Além disso, foram observadas substituições em todos os sítios antigênicos analisados AI, AII, VI e “a”. Os isolados conservaram a patogenicidade quando empregados via intracerebral em camundongos adultos.

Quando comparadas as sequências de aminoácidos da nucleoproteína do CVS e o vírus de *L. ega*, foram achada diferenças nos sítios antigênicos AIII e AIV, estes são considerados epitopos imunodominantes, reconhecidos pelos LT-helpers (TORDO, 1996).

A existência de mutações pontuais (transições ou transversões) na sequência de nucleotídeos nem sempre implica em mudanças na sequência de aminoácidos de uma proteína. Esse fato pode ser explicado pela chamada “degenerescência do código genético”. Isso significa que mais de um códon pode codificar para um mesmo aminoácido (NETO; MENCK, 2001).

Na literatura foram descritos filogrupos no gênero *Lyssavirus*, expressando diferenças na patogenicidade, conforme as vias de inoculação testadas. Todas as linhagens descritas dentro do genótipo I, excetuando as amostras vacinais atenuadas, têm capacidade em causar

doença a partir de diferentes vias de inoculação, incluindo a intracerebral. As amostras PV (Pasteur Vírus), ERA (Evelyn, Rokitniki e Abelseth), SAD, entre outras, atenuadas em laboratório, são consideradas de baixa patogenicidade para determinadas espécies animais (SMITH, 1981).

Os membros dos filogrupos 1 (genótipos 1, 4, 5, 6 e 7) são patogênicos no modelo murino pela via intracerebral e intramuscular e os do filogrupo 2 (genótipos 2 e 3), apenas pela via intracerebral. As diferenças antigênicas são evidentes, pela ausência de neutralização cruzada entre isolados de filogrupos diferentes (PERRIN, 1996; BADRANE et al., 2001).

No presente trabalho, a glicoproteína G do isolado de *L. ega* possui um comprimento de 505 aminoácidos, resultado concordante com o de Sato et al. (2009). Na sequência de aminoácidos da nucleoproteína do isolado do *L. ega* foi detectada uma substituição do aa no sítio antigênico AIII, que é um dos dois epítomos reconhecidos pelos linfócitos T-helpers, segundo observações de Tordo (1996).

A árvore filogenética baseada na nucleoproteína mostrou que o isolado de *L. ega* pertence ao grupo de vírus de morcegos insetívoros, apresentando semelhança com outros isolados detectados no Brasil, Canadá e os Estados Unidos (KOBAYASHI et al., 2007).

Foi possível observar uma segregação entre os isolados pertencentes aos quirópteros, vírus fixo e de cão, quando foi obtida a árvore filogenética baseada na glicoproteína e os resultados deste trabalho condizem com os de Ito et al. (2001) e Kobayashi et al. (2005). Dentro do clado de quirópteros foi constatado que a variante do *D. rotundus*, está presente também nos morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus*; resultados estes concordantes com o registrado por Shoji et al. (2004).

No Brasil há cada vez mais relatos de raiva em morcegos não-hematófagos, especialmente em ambientes urbanos densamente povoados (BRASIL, [2009]). Nestas circunstâncias, no caso de acontecer adentramento de morcegos em habitações humanas, é importante que as pessoas estejam alertadas para o risco em adquirir raiva pelo contato com os morcegos, mesmo os não hematófagos. No caso de ocorrer agressões por morcegos, as pessoas devem ser orientadas para procurar as autoridades sanitárias.

Os estudos de patogenia e patogenicidade do vírus da raiva, envolvendo as substituições de aminoácidos encontradas na glicoproteína devem ser continuados, utilizando um número cada vez maior de isolados, procedentes de diferentes espécies animais, de diferentes regiões geográficas, para a melhor compreensão desta doença.

7 CONCLUSÕES

O vírus fixo CVS e o isolado do morcego *L. ega*, inoculados em hamsters e camundongos, apresentaram comportamento biológico compatível com o descrito na literatura para o vírus da raiva.

O isolado de *L. ega* produziu raiva furiosa em hamsters e camundongos, enquanto que o vírus CVS causou raiva paralítica.

O isolado de *L. ega* conseguiu provocar raiva em hamsters e camundongos, quando inoculados pela via intramuscular e intranasal, apresentando comportamento biológico diferente em relação ao vírus CVS, caracterizado por uma menor mortalidade.

Com o vírus CVS, a via de inoculação intranasal produziu períodos de incubação e clínicos mais prolongados.

Pelos estudos filogenéticos do Gene N e G, o isolado de *L. ega* está relacionado com outras linhagens procedentes de morcegos do gênero *Lasiurus* das Américas e que pertence ao Genótipo 1.

Com o isolado do *L. ega*, as principais substituições foram encontradas na sequência de aminoácidos da glicoproteína G envolvendo os sítios antigênicos AI, AII e no domínio de fusão dependente do baixo pH, enquanto que o vírus CVS não apresentou semelhantes alterações.

REFERENCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud. 2003, p. 351-383.

ABELSETH, M. K. Further studies on the use of ERA rabies vaccine in domestic animals. **Canadian Veterinary Journal**, v. 8, n.1, p. 221-227, 1967.

ARAI, Y.T.; KUZMIN, I.V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A. D.; New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p.333 – 337, 2003.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two *Lyssavirus* phylogroup with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n.7, p. 3268-3276, 2001.

BAER, G. M.; SMITH, J. S. Rabies in non hematophagous bats. In: BAER, G.M., (Ed). **The Natural History of Rabies**. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991 p. 341-366.

BOTVINKIN, A. D.; POLESCHUK, E. M.; KUZMIN, I. V.; BORISOVA, T. I.; GAZARYAN, S. V.; YAGER, P.; RUPPRECHT C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, n. 12, p. 1623-1625, 2003.

BRASIL. Ministerio da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Mapas da raiva no Brasil, 2009. [2009]. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivo/pdf/raiva_situacao_brasil_30_09_09.pdf. Acesso em: 04 nov 2009.

BRASS, D. A. Rabies and rabies-related viruses of Africa. In: _____. **Rabies in bats. Natural history and public health implications**. 1st ed. Connecticut: Livia Press, 1994. p. 131-162.

CARINI, A. Su rune grande épizootie de rage. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 25, n. 11, p. 843-846, 1911.

CHARLTON, K. M. The pathogenesis of rabies. In: CHARLTON, K.M.; CAMPBELL, J. B. **Rabies**. Boston, Kluwer Academic Publishers. p 110 – 111, 1988

CHILDS, J. E. Epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, p. 114-162. 2002.

CONSTANTINE, D. G. **Bat Rabies and other Lyssavirus infections**, Reston , Va., U.S. Geological Survey Circular 1329, 2009. p. 14,

CONSTANTINE, D. G. Rabies transmission by non bite route. **Public Health Repts**. v. 77, n 4: 287-289. 1962

CONSTANTINE, D. G. Rabies virus in nasal mucosa in naturally infected bats. **Science**, v. 175, n. 27, p.1255-6, 1972

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody. In: MESLIN, F. X; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, p. 88-95, 1996

DEAN, D. J.; BAER G. M.; THOMPSON W. Studies on the local treatment of rabies infected wounds. Bulletin World Health Organization 28: 477 – 486, 1963.

DESPOND, O.; TUCCI, M.; DECALUWE H.; GRÉGOIRE M. C.; TEITELBAUM, J. Rabies in a nine-year-old child: The myth of the bite. **Canadian Journal of Infectious Diseases**. v. 13, n 2, p. 121- 125, 2002

DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, H.; TADEUSZ, J.; LOPES, D.; LAFON. M.; SMITH, C. L., KOPROWSKI, H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**. v. 80, n. 1, pp. 70-74, 1983.

FABER, M. L.; FABER, A. L.; PAPANERI, M.; BETTE, E., WIEHE, B., DIETZSCHOLD, M.J.; SCHNELL. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 14141 – 14148, 2005.

FAMILUSI, J. B; OSUNKOYA, B. O; MOORE, D. L; KEMP, G. E; FABIYI, A. A fatal human infection with Mokola virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, n. 6, p. 959–63, 1972

FAVI, M.; MATTOS, C. A.; YUNG, V.; CHALA, E.; LOPEZ, L. R.; DE MATTOS, C. C. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 79-81, 2002.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ARAÚJO, F. A. A.; DE MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1062-1065, 2001.

FOOKS, A. R.; BROOKES, S. M.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L. M.; HUTSON, A. M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiology and infection**, v. 131, n. 3, p. 1029-1039, 2003

GIBBONS, R. V. Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. **Annals of Emergency Medicine**, v. 39, n. 5, p. 528-536, 2002.

GOLDWASSER, R. A.; KISSLING, R. E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 98, p. 219-223, 1958.

HAMIR, A. N.; MOSER, G.; RUPPRECHT, C. E. Clinicopathologic variation in raccoons infected with different street rabies virus isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic investigation**, v. 8, n. 1, p. 31-37, 1996.

HANLON, C.A.; NIEZGODA, M.; RUPPRECHT, C. E. Rabies in terrestrial animals. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. 2nd ed. Academic Press, London, 2007, p. 201-257.

HAUPT, H.; REHAAG, H. Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina, Sul do Brasil, transmitida por morcegos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 2, p. 17-47, 1925.

HEATON, P. R, JOHNSTONE, P., McELHINNEY, L. M., COWLEY, R., O'SULLIVAN, E., WHITBY, J. E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2762 – 2766, 1997

HUOT, C.; SERRES, G.; DUVAL, B.; MARANDA-AUBUT R.; OUAKKI M.; SKOWRONSKI D. M. The cost of preventing rabies at any cost: Post-exposure prophylaxis for occult bat contact. **Vaccine**. v. 26, n, 35, p. 446 – 4450, 2008

ITO, M., ITOU, T., SHOJI, Y., SAKAI, T., ITO F.H., ARAI Y.T., TAKASAKI T., KURANE I. 2003. Discrimination between dog related and vampire related viruses in Brazil, by strains specific reverse transcriptase polymerase chain reaction and restriction fragment polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, n.1, p. 317-330, 2003

JACKSON, A. C. Human disease, In: JACKSON A.C, WUNNER W. H. **Rabies**. Londres, Inglaterra. Academic Press, p. 309 – 333, 2007a

JACKSON, A.C. Pathogenesis, In: JACKSON A.C, WUNNER W. H. **Rabies**. Londres, Inglaterra. Academic Press, p. 351 – 353, 2007b

JHONSON, N.; PHILLPPOTS, R.; FOOK, A.R. Airborne transmission of lyssaviruses. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 785 – 790, 2006.

KING, A. A. Rabies, In: PALMER, S. R., SOULSBY L., SIMPSON D.I.H. **Zoonoses: Biology, clinical practice, and public health control**. London, Oxford University Press, p. 437 – 458, 1998.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; KATO, M.; ITOU, T.; CUNHA, E.; SILVA, M.; MOTA, C.; ITO, F. H.; SAKAIT, T. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. **Archives of virology**, v 153, n. 11, p. 1995-2004, 2007.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Molecular Epidemiological Analysis of Bat Rabies Viruses in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Sciences**, v. 67, n 7, p. 647-652, 2005.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; CARNIELI, P. J.; CASTILHO, J. G.; OLIVIERA, R., MACEDO, C. I.; SCHEFFER, K. C.; ACKHAR, S.M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde publica. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 2 – 8, 2007.

KOTAIT, I. Raiva em morcegos em áreas urbanas no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, Ano 2, n. 20, p. 7-9, 2005.

KOPROWSKI, H. Routine laboratory procedures: the mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Genebra: World Health Organization, 1996. p. 80-87.

KUZMIN, I. V.; RUPPRECHT, C.E. Bat Rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. London, Academic Press, 2007, p. 259 - 299

KUZMIN, I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T.; SMITH, J. S.; HANLON, C. A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C. E. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N. P and G gene sequences. **Virus Research**, v. 97, n. 2, p. 65-79, 2003.

LAFAY, F.; COULON, P.; ASTIC, L.; SAUCIER, D.; RICHE, D.; HOLLEY, A.; FLAMAND, A. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 320 - 330. 1991

LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G. H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?. **Science**, v. 215, n.4529, p.182-184, 1982

LE MERCIER, P., JACOB, Y., TORDO, N. The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 7, p. 1571-1576, 1997

LUNT, R. A. Rabies and lyssavirus: an Australian diagnostic perspective. **Australian Journal of Medical Science**.; v. 27, n. 1, p. 20- 25, 2006

MESSENGER, S. L.; SMITH, J. S.; ORCIARI, L. A.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E. Emerging pattern of rabies deaths and increased viral infectivity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 151-154, 2003.

MESSENGER, S. L.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT C. E. Emerging epidemiology of bat-associated cryptic cases of rabies in humans in the United States. **Emerging Infections**, v. 35, p. 738-747, 2002.

MITA, T.; SHIMIZU, K.; ITO, N.; YMADA, K.; ITO, Y.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO M. Aminoacid at position 95 of the matrix protein is a cytopathic determinant of rabies virus. **Virus Research**, v. 137, p. 33-39, 2008.

MORIMOTO, K.; PATEL, M.; CORISDEO, S.; HOOPER, D.; FANG, Z., RUPPRECHT, C., KOPROWSKI H., DIETZSCHOLD, B. Characterization of a unique variant of bat rabies virus responsible for newly emerging human cases in North America. **Proceedings of National Academy of Sciences. USA**, v. 93, p. 5653-5658, 1996

MORIMOTO, K.; SHOJI, Y.; INOUE, S. Characterization of P gene-deficient rabies virus: propagation, pathogenicity and antigenicity. **Virus Research**, v. 111, p. 61-67, 2005

NEL, L.; JACOBS, J.; JAFTHA, J.; VON TEICHMAN, B.; BINGHAM, J.; OLIVIER, M. New cases of Mokola virus infection in South Africa: a genotypic comparison of Southern African virus isolates. **Virus Genes**, v. 20, n. 2, p. 103-106, 2000

NETO, L.E.; MENCK, C.F. Estabilidade do material genético: mutagênese e reparo. In: MATOLI S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo: Holos Editora, p. 43., 2001

PAEZ, A.; NUÑEZ, C.; GARCIA, C.; BOSHELL, J. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence of human and dog rabies associated with bats. **Journal of**

PAWAN, J. L. Fruit-eating bats and paralytic rabies in Trinidad. **Annals of Tropical Medicine**, v. 42, p. 173-177, 1948.

PERRIN, P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. In: MESLIN, F-X; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Genebra: World Health Organization, p. 442, 1996.

PIZZI, M. Sampling variation for the 50% end point, determined by the Reed Muench (Behrens) method. **Human Biology**, v22, p. 151-180, 1950.

PREHAUD, C.; COULON, P.; LAFAY, F. L.; THIERS, C.; FLAMAND, A. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. **Journal of Virology**, v. 62, n. 1, p.1-7, 1988.

REED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REIS, N. R.; SHIBATTA O. A.; PERACCHIH, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, A. L. Sobre os morcegos brasileiros. In: REIS, N. R.; PERACCHIH, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, A. L. **Morcegos do Brasil**, Londrina, 2007, p. 18 – 26

ROSS, A. B.; FAVI, M. C.; VÁSQUEZ, A. Glicoproteína del virus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. **Revista Chilena de Infectología**; 25 (Supl): S 14-S 18, 2008.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet, Infectious Diseases**, v2, n. 6, p.327-343, 2002.

SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; MOTIZUKI, N.; HIRANO, S.; ITOU, F.; CUNHA, E. M.; ITO, F. H.; SAKAI, T. A unique substitution at position 333 on the glycoprotein of rabies virus street strains isolated from non-hematophagous bats. **Virus genes**, n. 38, p. 74-79, 2009.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURNAE, I.; SAMARA, S.; CARVALHO, A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and

phylogenetic analysis of Glycoprotein of Rabies virus isolated from several species in Brazil. **Virology**, v. 66, n. 7, p. 747 -753, 2004.

SCHEFFER, K. C.; CARRIERI, M. L.; ALBAS, A.; SANTOS, H.C.; KOTAIT, I.; ITO, F. H.; Rabies in naturally infected bats in the State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v, 41, n. 3, p: 389-395, 2007.

SCHNEIDER, L. G.; BARNARD, B. J.; SCHNEIDER, H. P. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigations and oral vaccination studies: I. African virus. In: KUWERT E, MÉRIEUX C, KOPROWSKI H, BÖGEL K, editors. **Rabies in the tropics**. Berlin: Springer-Verlag; 1985. p. 47–59.

SHIMIZU, K.; NAOTO, I.; TETSUO, M.; YAMADA, K.; HOSOKAWA-MUTO, J.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. **Virus Research**, n. 123, p. 154-160, 2007.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; CUNHA, E. M.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A.; NOCITTI, D. P.; ITO, F. H.; KURANE, I.; SAKAI, T. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus spp*) in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science** v. 66, p.1271-1273, 2004

SHOPE, R. E.; MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K.; CAUSEY, O. R.; KEMP, G. E.; SIMPSON, D. I.; & MOORE, D. L. Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus. **Journal of Virology**, v. 5, n. 6, p., 690–692, 1970.

SILVA M. L.; LIMA, F. S.; GOMEZ, A. B.; AZEVEDO, S.; ALVES, A. L.; BATISTA, C.; ALVES, C. J.; CARVALHOS, K. S.; DANTAS, A. Ensaio experimental em hamsters com vírus rábico isolado de morcego insetívoro *Molossus molossus* no semi-árido de Paraíba. In: Anais, 2008. ENCONTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, Campo Grande, MS, p. 183-184.

SMART, N. L.; CHARLTON, K. M. The distribution of challenge virus standard rabies virus versus skunk street rabies virus in the brains of experimentally infected rabid skunks. **Acta Neuropathologica** v. 84, 501 – 508, 1992

SMITH, J. S. Model of abortive rabies infection of the central nervous system. **Infection and immunity**, v. 31, n. 1, p. 297-308, 1981

SMITH, P. C.; LAWHASWASDI, K.; VICK, W. E.; STANTON, J. S. Isolation of rabies virus from fruit bats in Thailand. **Nature**; v. 216, n.113, p. 384 - 384. 1967

TAKAYAMA, M., ITO, N., YAMADA, K., SUGIYAMA, M., MINAMOTO, N. Multiple aminoacids in the glycoprotein of rabies virus are responsible for pathogenicity in adult mice. **Virus research**, n,115: 169 – 175. 2006

THOULOZE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER., H; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of virology** v.72, n.9, p.7181-90, 1998.

THOULOZE, M. I.; LAFAGE, M.; MONTANO-HIROSE, J.A.; LAFON, M. Rabies virus infects mouse and human lymphocytes and induces apoptosis. **Journal of Virology**, v. 71, n. 10, p. 7372- 7380, 1997

TIGNOR, G. H.; MURPHY, F. A.; CLARK, H. F.; SHOPE, R. E.; MADORE, P.; BAUER, S. P.; BUCKLEY, S. M.; MEREDITH, C. D. Duvenhage virus: morphological, biochemical, histopathological and antigenic relationships to the rabies serogroup. **Journal of General Virology** v. 37, p. 595–611, 1977.

TORDO, N.; BENMANSOUR, A.; CALISHER, C.; DIETZGEN, R. G.; FANG, R. X; JACKSON, A. O.; KURATH, G.; NADIN-DAVIES, S.; TESH, R. B.; WALKER, P. J.; Rhabdoviridae. In: FAUQUET C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U; BALL, L. **Virus Taxonomy**: classification and nomenclature of viruses:Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2004, p.623–644.

TORDO N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus In: MESLIN F.X., KAPLAN M., KOPROWSKY H. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION, p. 32 – 33.1996

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; ROUGEON, F. Walking along rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene ?. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 83, p. 3914 – 3918, 1986.

TSIANG, H.; CECCALDI, P. E.; LYCKE, E. Rabies virus pathogenesis in neurons, viral transport in cultured cells. **Virus Research**, v. 11, p. 83, 1988. Supplement 1

UIEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOEMS, L. H.; SILVA, M. M. Espécies de quirópteros diagnosticados com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**, São Paulo, v.2, n.1., p. 17 -36, 1996.

WEBSTER, W. A.; CASEY, G. A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, p. 96 – 104, 1996.

WINKLER, W. G.; BAKER, E. F.; HOPKINS, C. C. An outbreak of non-bite transmitted rabies in a laboratory animal colony. **American Journal of Epidemiology**, v. 95, n.3, p. 267 - 277, 1972

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Rabies. Geneva, 2008. (Fact Sheet, n. 99). Disponível em: < <http://www.WorldHealthOrganization.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/index.html> >. Acesso em: 10/01/2009

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, San Diego: Academic Press, p. 23 – 77, 2007.

APÊNDICE

Resultados análise estatístico no Minitab

Results for: Worksheet 2

Kruskal-Wallis Test: Período de incubação versus Via de administracao

Kruskal-Wallis Test on Período de incubação

Via de

administracao	N	Median	Ave Rank	Z
---------------	---	--------	----------	---

42	6,000	30,9	-5,06	
----	-------	------	-------	--

2	31	7,000	49,8	0,98
---	----	-------	------	------

3	18	9,000	74,8	5,17
---	----	-------	------	------

Overall	91		46,0	
---------	----	--	------	--

H = 35,82 DF = 2 P = 0,000

H = 37,38 DF = 2 P = 0,000 (adjusted for ties)

Kruskal-Wallis Test: Período clínico versus Via de administracao

Kruskal-Wallis Test on Período clínico

Via de

administracao	N	Median	Ave Rank	Z
---------------	---	--------	----------	---

1	42	3,000	39,0	-2,33
---	----	-------	------	-------

2	31	4,000	47,0	0,25
---	----	-------	------	------

3	18	6,000	60,6	2,62
---	----	-------	------	------

Overall	91		46,0	
---------	----	--	------	--

H = 8,48 DF = 2 P = 0,014

H = 8,68 DF = 2 P = 0,013 (adjusted for ties)

Kruskal-Wallis Test: Período de incubação (días) versus VIRUS

82 cases were used

Incubation period L. ega versus CVS

1 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on Período de incubação (días)

VIRUS	N	Median	Ave Rank	Z
-------	---	--------	----------	---

2	10	12,000	70,2	4,06
---	----	--------	------	------

3	72	7,500	37,5	-4,06
---	----	-------	------	-------

Overall	82		41,5	
---------	----	--	------	--

H = 16,48 DF = 1 P = 0,000

H = 16,79 DF = 1 P = 0,000 (adjusted for ties)

Kruskal-Wallis Test: Período clínico (días) versus VIRUS

82 cases were used

1 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on Período clínico (días)

VIRUS	N	Median	Ave Rank	Z
-------	---	--------	----------	---

2	10	3,000	41,5	0,01
---	----	-------	------	------

3	72	3,000	41,5	-0,01
---	----	-------	------	-------

Overall	82		41,5	
---------	----	--	------	--

H = 0,00 DF = 1 P = 0,994

H = 0,00 DF = 1 P = 0,994 (adjusted for ties)

Descriptive Statistics: Período de incubação. Período clínico

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Variance	CoefVar	Minimum
Período de incubação	83	0	6,651	0,170	1,549	2,401	23,30	5,000
Período clínico	83	0	4,386	0,221	2,011	4,045	45,86	1,000

N for

Variable	Q1	Median	Q3	Maximum	IQR	Mode	Mode
Período de incubação	5,000	6,000	7,000	13,000	2,000	5	23
Período clínico	3,000	4,000	6,000	9,000	3,000	3	19

Descriptive Statistics: Período de incubação (di. Período clínico (días) v

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Variance	CoefVar
Período de incubação (di	42	0	6,048	0,223	1,447	2,095	23,93
Período clínico (días) v	42	0	4,167	0,379	2,459	6,045	59,01

Variable	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum	IQR	Mode
Período de incubação (di	5,000	5,000	6,000	6,250	13,000	1,250	5
Período clínico (días) v	1,000	2,000	3,000	5,500	9,000	3,500	3

Variable	N for Mode
Período de incubação (di	17
Período clínico (días) v	12

Kruskal-Wallis Test: Período de incubação versus Via de administracao

Kruskal-Wallis Test on Período de incubação

Via de

administracao	N	Median	Ave Rank	Z
1	42	6,000	30,9	-5,06
2	31	7,000	49,8	0,98
3	18	9,000	74,8	5,17
Overall	91	46,0		

H = 35,82 DF = 2 P = 0,000

H = 37,38 DF = 2 P = 0,000 (adjusted for ties)

Kruskal-Wallis Test: Período clínico versus Via de administracao

Kruskal-Wallis Test on Período clínico

Via de

administracao	N	Median	Ave Rank	Z
1	42	3,000	39,0	-2,33
2	31	4,000	47,0	0,25