

WILLIAN DE OLIVEIRA FAHL

Marcadores moleculares para a patogenia de vírus da raiva:
relação entre períodos de incubação, carga viral e os genes
codificadores das proteínas virais P e L

São Paulo

2014

WILLIAN DE OLIVEIRA FAHL

Marcadores moleculares para a patogenia de vírus da raiva:

relação entre períodos de incubação, carga viral e os genes
codificadores das proteínas virais P e L

Tese 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 obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2935
FMVZ

Fahl, Willian de Oliveira

Marcadores moleculares para a patogenia de vírus da raiva: relação entre períodos de incubação, carga viral e os genes codificadores das proteínas virais P e L / Willian de Oliveira Fahl. -- 2014.
84 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Marcadores moleculares. 2. Patogenia. 3. Raiva. 4. Fosfoproteína. 5. RNA polimerase RNA dependente. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Marcadores moleculares para a patogenia de vírus da raiva: relação entre períodos de incubação, título viral e os genes codificadores das proteínas virais P e L", protocolado sob o nº 2024/2010, utilizando amostras de tecido nervoso de camundongos, canídeos, morcegos e bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Molecular markers for rabies virus pathogeny: relationship among incubation periods, viral titers and genes P and L", protocol number 2024/2010, utilizing nervous tissue samples from mice, dogs, bats and cattle, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 15 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FAHL, Willian de Oliveira

Título: Marcadores moleculares para a patogenia de vírus da raiva: relação entre períodos de incubação, carga viral e os genes codificadores das proteínas virais P E L

Tese 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 obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

À infância, pelos momentos felizes,
por me incentivar a sonhar e a possibilitar a busca pelos sonhos;
Por me despertar a curiosidade e o desejo á experimentação,
que, desde cedo, me instigaram a me tornar um cientista.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Paulo Eduardo Brandão**, pela brilhante orientação e pela amizade.

Ao Prof. Dr. **Fernando Ferreira**, por toda dedicação à Pós-Graduação do VPS.

Aos meus pais, **Gentil Fahl** e **Irma de Oliveira Fahl** e meus irmãos, **Andréia Fahl Oliveira**, **Fernando Oliveira Fahl** e **Ronaldo de Oliveira Fahl**, pelo incondicional apoio, incentivo e confiança.

Ao **Alexandre Santos da Silva**, por todos os sentimentos dedicados, pelo incentivo, disponibilidade e por acreditar em mim, até mais do que eu mesmo.

À **Ana Rita de Toledo Piza**, pelo exemplo, incentivo, torcida e pela ajuda em vários aspectos.

A todos os **Amigos da Pós-Graduação**, em especial a **Sibele Pinheiro de Souza**, **Vanessa Riesz Salgado**, **Thaisa Lucas Sandri**, **Ekaterina A. Durymanova Ono** e **Danival Lopes Moreira**, pela acolhida, atenção e ajuda.

A todos os meus **Amigos**, que participaram de minha vida, independentemente do tempo, e favoreceram meu crescimento, tanto pessoal como profissional.

A todos os **funcionários-amigos** do **Instituto Pasteur**, em especial a **Karin Corrêa Scheffer Ferreira**, **Keila Iamamoto Nogi**, **Karen Miyuki Asano**, **Enio Mori**, **Pedro Carnieli Junior**, **Carla Isabel Macedo**, **Rafael de Novaes Oliveira**, **Graciane Maria Medeiros Caporale**, **Andréa de Cassia Rodrigues da Silva**, **Luciana Botelho Chaves**, **Zélia Maria Pinheiro Peixoto**, **Samira Maria Achkar Pinheiro**, **Maria Aparecida da Silva – “Cidoka”**, **Adriana Cândido Rodrigues Nasraui**, **Rosangela Lopes**, **Silverlei Calvento da Silva**, **Maria Luiza Carrieri** e **Ivanete Kotait**, pelos ensinamentos, incentivo, acolhimento e disponibilidade, que muito me enriqueceram.

Ao **Instituto Pasteur**, em nome da Sra. Diretora, Dra. **Luciana Hardt**, e da chefia do laboratório, Dra. **Juliana Galera Castilho**, por disponibilizarem tempo e condições para a realização de meu trabalho.

Aos muitos **chocolates**, que, ora me alegraram o ânimo, ora acalmaram minha ansiedade.

À **CAPES** (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao **Universo**, que sempre conspirou a meu favor.

“Nada é mais poderoso do que uma ideia que chegou no tempo certo”
Victor Hugo

RESUMO

RESUMO

FAHL, W. O. **Marcadores moleculares para a patogenia de vírus da raiva: relação entre períodos de incubação, carga viral e os genes codificadores das proteínas virais P e L.** [Molecular markers for the pathogenesis of rabies virus: relationship among incubation periods, viral load and the genes encoding the viral P and L proteins]. 2014. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A raiva é uma doença aguda, progressiva e infecciosa do sistema nervoso central de mamíferos, causada pelo vírus da raiva (RABV). Embora possa ser prevenida por vacina, continua sendo um grave problema de saúde pública, além de ser responsável pela morte de seres humanos e muitos outros animais, incluindo os de interesse econômico. Este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre polimorfismos dos genes que codificam as proteínas P e L de amostras de RABV pertencentes a variantes antigênicas 2 e 3 e períodos de incubação e títulos em camundongos. Para isso, foram selecionadas amostras isoladas de diferentes reservatórios de raiva de mamíferos das Ordens Carnivora e Chiroptera e amostras de bovinos, de áreas endêmicas para o vírus da raiva. As sequências obtidas foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas para procurar os padrões de segregação de linhagens. Os resultados mostraram que não houve marcadores ou polimorfismos que explicam as variações nos períodos de incubação e de letalidade entre cepas pertencentes a variantes antigênicas 2 e 3. Esta informação pode ser usada para discussões sobre a importância de reservatórios de raiva, a dinâmica do vírus da manutenção e evolução das diferentes formas desta zoonose entre os animais infectados, contribuindo para um estudo mais aprofundado sobre a busca de marcadores moleculares para patogênese.

Palavras-chave: Marcadores moleculares. Patogenia. Raiva. Fosfoproteína. RNA polimerase RNA dependente.

ABSTRACT

ABSTRACT

FAHL, W. O. **Molecular markers for the pathogenesis of rabies virus:** relationship among incubation periods, viral load and the genes encoding the viral P and L proteins. [Marcadores moleculares para a patogênese de vírus da raiva: relação entre períodos de incubação, carga viral e os genes codificadores das proteínas virais P e L]. 2014. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Rabies is an acute, progressive and infectious disease of the central nervous system of mammals, caused by Rabies virus (RABV). Although preventable by vaccine, it remains a serious public health problem, and is responsible for the death of humans and many other animals, including those of economic interest. This study aimed to assess the relationship between polymorphisms in genes encoding the P and L proteins of RABV samples belonging to antigenic variants 2 and 3 and incubation periods and titers in mice. For this, samples isolated from different mammalian rabies reservoirs of the Orders Carnivora and Chiroptera and samples of cattle from endemic areas for rabies virus were selected. The sequences obtained were used to construct phylogenetic trees to search for the segregation patterns of strains. The results showed that there were no markers or polymorphisms that explain variations in incubation periods and lethality amongst strains belonging to antigenic variants 2 and 3. This information might be used for discussions about the importance of rabies reservoirs, the dynamics of the virus maintenance and evolution of the different forms of this zoonotic disease among infected animals, contributing to further study about the search for molecular markers for pathogenesis.

Keywords: Molecular markers. Pathogenesis. Rabies. Phosphoprotein. RNA dependent RNA polymerase

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo das reações de RT-PCR. Na técnica de RT-PCR as amostras positivas apresentaram o fragmento esperado de 1200pb (figura 1A) para o gene P, e 470pb (figura 1B) para o gene L 60
- Figura 2 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo MCL para o gene *P* de RABV e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2014 62
- Figura 3 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo MCL para o gene *L* de RABV e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo – 2014 63

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos <i>Lyssavirus</i> – São Paulo – 2012	30
Quadro 2 - Relação dos isolados de vírus da raiva de morcegos frugívoros do gênero <i>Artibeus</i> , indicando o número de identificação/ano de recebimento, hospedeiro original e município onde foram encontrados - São Paulo – 2011	48
Quadro 3 - Relação dos isolados de vírus da raiva de bovinos, como relacionadas a morcegos hematófagos, indicando o número de identificação/ano de recebimento, hospedeiro original e município onde foram encontrados - São Paulo – 2013	49
Quadro 4 - Relação dos isolados de vírus da raiva de canídeos, indicando o número de identificação/ano de recebimento, hospedeiro original e município onde foram encontrados - São Paulo – 2011	50
Quadro 5 - Relação dos <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR e no sequenciamento das amostras de RABV de morcegos do gênero <i>Artibeus</i> spp., de canídeos e de amostras de bovinos	51
Quadro 6 - Ciclo da reação de PCR para amplificação do gene <i>P</i> e <i>L</i> do vírus da raiva dos isolados utilizados no presente estudo	51

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação dos isolados de vírus da raiva de morcegos frugívoros do gênero <i>Artibeus</i> para estudo, identificando o hospedeiro original, período de Incubação (PI), Letalidade (LET) e resultado da titulação viral em cultivo celular (TCID50) - São Paulo – 2014	57
Tabela 2 -	Relação dos isolados de vírus da raiva de canídeos usados neste estudo, identificando o hospedeiro original, período de Incubação (PI), Letalidade (LET) e resultado da titulação viral em cultivo celular (TCID50) – São Paulo – 2014	58
Tabela 3 -	Relação dos isolados de vírus da raiva de bovinos usados neste estudo, identificando o hospedeiro original, período de Incubação (PI) e Letalidade (LET) - São Paulo – 2013	59

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABLV	<i>Australian bat lyssavirus</i>
AcM	Anticorpos monoclonais
AgV	Variante antigênica
ARAV	<i>Aravan virus</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BBLV	<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>
BLAST/n	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Gás carbônico
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxinucleosídeo-trifosfato
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
DUVV	<i>Duvenhage virus</i>
EBLV-1	<i>European bat lyssavirus 1</i>
EBLV-2	<i>European bat lyssavirus 2</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
G	Glicoproteína do vírus da raiva
IFD	Imunofluorescência Direta
IKOV	<i>Ikoma lyssavirus</i>
INF	<i>Interferon</i>
IRKV	<i>Irkut virus</i>
KHUV	<i>Khujand virus</i>
L	Proteína L do vírus da raiva/ RNA polimerase L
LBV	<i>Lagos bat virus</i>
LET	Letalidade
LLEBV	<i>Lleida bat lyssavirus</i>
LTD	Limitada
M	Proteína matriz do vírus da raiva
m7G	7-metilguanosina
MCL	<i>Maximum Composite Likelihood</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MEM	Meio mínimo essencial
MOKV	<i>Mokola virus</i>
mRNA	RNA mensageiro
N	Nucleoproteína do vírus da raiva
nt	Nucleotídeos
P	Fosfoproteína do vírus da raiva
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PI	Período de incubação
RABV	<i>Rabies virus</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	<i>Ribonuclease</i>

RNAseout	Inibidor de RNAse
RNP	Ribonucleoproteína
RT	Transcrição Reversa
SFB	Soro fetal bovino
SHIBV	<i>Shimoni virus</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris Borato
TCID50	Dose infectante de 50% em cultivo celular
U	Unidade internacional
VSV	Vírus da Estomatite Vesicular
WCBV	<i>West Caucasian bat vírus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	<i>Copyright</i>
®	Marca registrada
μL	Microlitro
μM	Micromolar
g	Aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto de hora
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
pmol	Picomol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
™	Marca registrada comercial, do inglês <i>trademark</i>
X	Veze
\bar{x}	Média aritmética

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	OBJETIVOS	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	AMOSTRAS E ANÁLISE DAS FICHAS DE LEITURA	44
3.2	TITULAÇÃO VIRAL DAS AMOSTRAS EM CULTIVO CELULAR ..	45
3.2.1	Reação de Imunofluorescência Direta (IFD)	45
3.3	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA FOSFOPROTEÍNA (<i>P</i>) E RNA POLIMERASE L (<i>L</i>) DO RABV	46
3.3.1	Extração de RNA	47
3.3.2	Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR)	50
3.4	SEQUENCIAMENTO DE DNA	52
3.4.1	Purificação dos produtos de PCR	52
3.4.2	Reação de sequenciamento de DNA	52
3.4.3	Edição de sequências	53
3.5	ANÁLISE FILOGENÉTICA	54
4	RESULTADOS	56
4.1	ANÁLISE DAS FICHAS DE LEITURA E TITULAÇÃO VIRAL DAS AMOSTRAS EM CULTIVO CELULAR	56
4.2	RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA FOSFOPROTEÍNA (<i>P</i>) E RNA POLIMERASE L (<i>L</i>)	59
4.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA	60
4.3.1	Gene <i>P</i>	60
4.3.2	Gene <i>L</i>	61
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	73

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa zoonótica aguda do sistema nervoso central de mamíferos causada por vírus do gênero *Lyssavirus*, de evolução fatal e de distribuição mundial (ACHA; SZYFRES, 2003), mantida em populações animais sob a forma enzoótica, mas que nestas periodicamente se manifesta sob a forma de epizootias, bem como surtos epidêmicos considerando-se populações humanas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

O gênero *Lyssavirus* pertence à família *Rhabdoviridae*, sendo estes vírus envelopados com 75nm de diâmetro e 150-300nm de comprimento e que apresentam o formato de bala de revólver (KAPLAN, 1996).

O gênero *Lyssavirus* é classificado em doze espécies: Espécie I – *Rabies virus* (RABV), Espécie II – *Lagos bat virus* (LBV), Espécie III – *Mokola virus* (MOKV), Espécie IV – *Duvenhage virus* (DUVV), Espécie V – *European bat lyssavirus 1* (EBLV-1), Espécie VI – *European bat lyssavirus 2* (EBLV-2), Espécie VII – *Australian bat lyssavirus* (ABLV), Espécie VIII - *Aravan virus* (ARAV), Espécie IX - *Khujand virus* (KHUV), Espécie X - *Irkut virus* (IRKV), Espécie XI - *West caucasian bat virus* (WCBV) e Espécie XII – *Shimoni bat virus* (SHIBV) (CARSTENS, 2010; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV, 2012) (Quadro 1).

Outros três novos vírus continuam a ser estudados e, no futuro, poderão ser classificados como novas espécies de *Lyssavirus*, são eles: *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV), isolado do morcego insetívoro *Myotis nattererii*, na Alemanha (FREULING et al., 2011); *Ikoma lyssavirus* (IKOV), isolado de um espécime de civeta africana (*Civettictis civetta*) (MARSTON et al., 2012), na Tanzânia; e *Lleida bat lyssavirus* (LLEBV), isolado do morcego *Miniopterus schreibersii*, na Espanha (CEBALLOS et al., 2013).

A espécie I apresenta maior importância epidemiológica por sua associação com um grande número de casos de raiva em relação a outras espécies e por ser mais amplamente distribuída no mundo (TORDO, 1996; WUNNER, 2002). Entre as demais espécies, apenas a espécie III, foi a única, até o momento, não isolada de morcegos (NEL, 2001).

Quadro 1 – Classificação dos *Lyssavirus* – São Paulo - 2012

Espécies	Filogrupo	Nomes	Abreviatura (ICTV*)	Distribuição	Reservatórios
1	I	<i>Rabies virus</i>	RABV	Mundial (exceção de algumas ilhas)	Carnívoros (mundo) e morcegos (Américas)
2	II	<i>Lagos bat virus</i>	LBV	África	Morcegos frugívoros
3	II	<i>Mokola virus</i>	MOKV	África	Desconhecido (isolado de musaranhos)
4	I	<i>Duvenhage virus</i>	DUVV	África	Morcegos insetívoros
5	I	<i>European bat lyssavirus 1</i>	EBLV-1	Europa	Morcegos insetívoros (<i>Eptesicus serotinus</i>)
6	I	<i>European bat lyssavirus 2</i>	EBLV-2	Europa	Morcegos insetívoros (<i>Myotis</i> sp)
7	I	<i>Australian bat lyssavirus</i>	ABLV	Australia	Morcegos insetívoros e frugívoros
8	I	<i>Aravan virus</i>	ARAV	Ásia Central	Morcego insetívoro (<i>Myotis blythi</i>)
9	I	<i>Khujand virus</i>	KHUV	Ásia Central	Morcego insetívoro (<i>Myotis mystacinus</i>)
10	I	<i>Irkut virus</i>	IRKV	Leste da Sibéria	Morcego insetívoro (<i>Murina leucogaster</i>)
11	II	<i>West Caucasian bat virus</i>	WCBV	Região do Cáucaso	Morcego insetívoro (<i>Miniopterus schreibersi</i>)
12	II	<i>Shimoni virus</i>	SHIBV	Quênia	Morcego insetívoro (<i>Hipposideros commersoni</i>)

*ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*

Fonte: adaptado de McElhinney, Fooks e Radford (2008).

Dados epizootiológicos para raiva e os tipos moleculares do vírus têm demonstrado que existem diversos reservatórios para os vírus, na qual variantes continuam na natureza por ciclos independentes, sendo que, dentro de cada ciclo, um diferente reservatório exerce um papel fundamental específico na manutenção de cada uma das variantes do vírus da raiva, tais como aquelas relacionadas a “raccoons”, cangambás, canídeos silvestres e morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros (VELASCO-VILLA et al., 2002).

A importância da raiva para saúde pública não ocorre apenas pelo número de casos, mas também por sua alta taxa de mortalidade, além de gastos significativos com diagnósticos e tratamentos (KAPLAN; TURNER; WARREL, 1986; WHO EXPERT CONSULTATION ON RABIES, 2005; CHILDS; REAL, 2007).

Esta zoonose é causada pelo Vírus da Raiva (RABV), os quais apresentam um genoma não-segmentado de RNA fita-simples com polaridade negativa (FENNER et al., 1992; MAYO; PRINGLE, 1997; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2012). Possui 11.932 pares de bases (pb), os quais codificam as cinco proteínas estruturais N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de matriz), G (glicoproteína) e L _do inglês *large*_ (RNA polimerase RNA dependente L), sendo que os genes para estas proteínas apresentam-se separados por pequenas regiões intergênicas de 2, 2, 5 e 24 nucleotídeos, respectivamente (TORDO et al., 1986 a, b).

O RABV possui, ainda, envoltório externo (envelope) formado por lipídeos da célula hospedeira, com espículas de 5 a 10nm de comprimento, cerca de 3nm de espessura, distanciadas em 5nm, formadas por trímeros da glicoproteína G (MADORE; ENGLAND, 1977; GAUDIN et al., 1992).

A constituição do envelope é semelhante à da membrana da célula infectada pelo vírus e, normalmente, são detectados fosfolipídeos, lipídeos neutros e glicolipídeos (WUNNER, 1991).

Logo abaixo do envelope (superfície interna) encontra-se uma camada matriz formada por proteínas M, que une o envelope do vírus à ribonucleoproteína (RNP) interna e está envolvida na montagem e liberação viral (MEBATSION, 2001).

A RNP tem forma de um complexo helicoidal, possuindo 30 a 35 giros, com 50nm de espessura por 170nm de comprimento, em média, e é composta pelo RNA genômico, associado às proteínas RNA polimerase RNA dependente L, fosfoproteína P, nucleoproteína N. Tem estrutura lábil e se desenrolada, poderia

atingir o comprimento de 0,20 a 0,65nm (KAPLAN; TURNER; WARREL, 1986). Devido à presença de L, a transcrição e a replicação são autônomas e independentes da célula hospedeira (WUNNER, 2002; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2005).

A proteína N e o gene que a codifica são os mais conservados componentes moleculares em termos de similaridade de sequência de aminoácidos (aa) e nucleotídeos (nt), dentre os genótipos, apesar da relativa alta diversidade entre pequenas regiões do gene N entre os genótipos (ERTL et al., 1989, WUNNER, 2002). O mais alto grau de similaridade entre sequências de aa (98-99%) ocorre entre diferentes cepas “fixas” de laboratório (espécie 1). Os vírus que apresentam menos que 80% de similaridade na sequência de nt ou menos que 92% na sequência de aa pertencem a diferentes genótipos (KISSI; TORDO; BOURHY, 1995; WUNNER, 2002).

Por essa razão, para a detecção do vírus da raiva por RT-PCR e para sua classificação, o gene da nucleoproteína tem sido o alvo consensualmente utilizado (KAMOLVARIN et al., 1993; SMITH; ORCIARI; YAGER, 1995; DE MATTOS et al., 1996; ITO et al., 2001; FAVI et al., 2003; SCAGLIARINI et al., 2003; ROMIJN et al., 2003).

A fosfoproteína P é multifuncional e é a menos conservada entre as outras proteínas do RABV (WU et al., 2007). Contudo, apresenta um papel essencial na replicação do genoma, e interagindo com o sistema de defesa imunológica do organismo infectado (WILTZER et al., 2014). Ao se ligar à RNP em formação (RNA mais N), a proteína P auxilia L em ligação a esta RNP. A interação de P com L ocorre nos seus primeiros 19 aa (GERARD et al., 2009).

Interagindo com N, a proteína P regula a ação da polimerase L na replicação e transcrição e atua sobre as proteínas N recém sintetizadas, impedindo sua polimerização ou sua união com RNA que não seja o do RABV (MAVRAKIS et al., 2003), como também direciona a capsidização do RNA por N (GIGANT et al., 2000).

Como subunidade de L, a proteína P tem um papel duplo, pois é um co-fator não-catalítico, necessário para a transcrição dos genes e, também, para a replicação do genoma, estabilizando L e posicionando o complexo polimerase (L mais P) sobre o molde (*template*) RNA (FU et al., 1994).

Outras interações que envolvem P estão relacionadas ao tropismo do RABV, à propagação do vírus célula a célula e à inibição da resposta imune inata que

interfere ou cessa a replicação dos vírus (WUNNER, 2007). Também, envolve-se no transporte de algumas organelas (RAUX; FLAMAND; BLONDEL, 2000; GERARD et al., 2009), e com o transporte do RABV pelos neurônios (JACOB et al., 2000). É responsável por inibir a resposta do interferon (INF) nas células infectadas pelo RABV (WUNNER, 2007).

A polimerase L é o componente catalítico do complexo polimerase que, juntamente com o cofator P, é responsável pela maioria das atividades enzimáticas que ocorrem tanto na transcrição quanto na replicação do genoma do RABV. Muitas das atividades deste complexo advêm de estudos com o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV), o vírus protótipo da Família *Rhabdoviridae*. Além das atividades enzimáticas necessárias para a transcrição e replicação, L é responsável pelas modificações co-transcricionais dos mRNA (BANERJEE; CHATTOPADHYAY, 1990).

Pesquisas com vírus RNA com sentido negativo auxiliaram a determinar áreas do gene L com o objetivo de localizar sequências genéticas do gene responsáveis pelas atividades enzimáticas da polimerase L (TORDO et al., 1986b; BARIK et al., 1990; POCH et al., 1990).

Entre as principais características de L está a existência de agrupamentos de aa conservados em blocos ao longo da proteína. São comumente nomeados com os números romanos I até VI (POCH et al., 1990), sendo que entre esses blocos alguns aa formam domínios conservados. (TORDO et al., 1988; BANERJEE; CHATTOPADHYAY, 1990; POCH et al., 1990). Como exemplo, temos o bloco III. Neste, o domínio catalítico (entre os aa 530 e 1177) possui quatro “motifs” (A, B, C e D), e representa a região com o maior grau de conservação (TORDO et al., 1988; POCH et al., 1989). Estes “motifs”, considerados os módulos polimerase de L, mantêm a mesma disposição linear e localização nas RNA polimerase e nas DNA polimerase (BARIK et al., 1990; DELARUE et al., 1990; POCH et al., 1990). Entre as sequências conservadas dos quatro “motifs”, a sequência GDN (glicina, ácido aspártico e asparagina), no “motif” C, é muito conservada em todos os vírus RNA com sentido negativo e não segmentados, sugerindo ser uma função catalítica da atividade polimerase (POCH et al., 1989), desta forma, apresenta grande importância na manutenção da atividade polimerase que polimeriza nt (SCHNELL; CONZELMANN, 1995).

Três atividades essenciais realizadas por L necessitam de utilização do trifosfato de adenosina (ATP): a atividade transcricional, que requer ligação com o

substrato ribonucleosídeo-trifosfato; a poliadenilação e; a atividade quinase para a fosforilação de P, necessária para a ativação da transcrição (SÁNCHEZ; DE; BANERJEE, 1985; BANERJEE; CHATTOPADHYAY, 1990).

Outras funções da polimerase L, que necessariamente devem estar localizadas no interior de L, incluem: mRNA “*capping*” (adição de 7-metilguanossina (m₇G) no final 5’), metilação (adição de grupo metila no RNA) e poliadenilação (formação da cauda poli-A) (SCHNELL; CONZELMANN, 1995).

Considerando as atividades da polimerase L durante a transcrição e a replicação, esta pode seguir por duas configurações, sendo uma designada por replicase e a outra por transcriptase (QANUNGO et al., 2004). Ambas são complexos multienzimáticos (holoenzimas). A replicase, relacionada à replicação, é formada pelas proteínas L, P e N, enquanto que a transcriptase, relacionada à transcrição, é formada pelas proteínas L, P e mais três moléculas celulares. Estas descobertas mudaram a compreensão efetiva dos processos de transcrição e replicação dos *Mononegavirales* (QANUNGO et al., 2004), e entre eles o vírus da raiva.

O envelope viral é composto pela glicoproteína (G) e pela proteína M. Esta última está localizada na superfície interna do envelope viral circundando a RNP e está envolvida na montagem e liberação viral (MEBATSION, 2001).

A glicoproteína é uma proteína de membrana que possui 505 aa, traduzidas de um mRNA que codifica 524 aa. É a proteína de fusão, que permite a entrada do vírus na célula, assim, é crítica para a resposta imune contra o vírus da raiva, pois é responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, sendo alvo destes e dos linfócitos T *helper* e citotóxicos (WUNNER, 2002).

Oito sítios antigênicos foram identificados no domínio externo da proteína G (I-VI, “a” e G1). Os sítios I, III, VI e “a” envolvem os aa nas posições 231, 330-338, 264 e 342-343, respectivamente. O sítio II é descontínuo e está localizado nas posições 34-42 e 198-200 ligadas por pontes dissulfeto (TORDO, 1996). Além disso, a arginina na posição 333 da glicoproteína tem sido descrita como responsável pela patogenicidade do vírus da raiva (TORDO, 1996; MEBATSION, 2001), sendo determinante nesta atividade, pois regula a taxa de replicação do vírus em conjunto com outros elementos virais.

A transmissão do RABV ocorre principalmente pelo contato direto e as principais formas de transmissão entre as espécies são por mordedura e lambedura

de um animal com raiva, cuja saliva contém o vírus (JACKSON, 2008; PASSOS et al., 1999). Os mamíferos, em geral, são suscetíveis ao RABV e vários deles desempenham papel de hospedeiro, sendo considerados os principais reservatórios os que pertencem às ordens *Carnivora* e *Chiroptera* (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). A transmissão eficiente da doença depende da quantidade de vírus presente na saliva do animal infectado e particularmente da gravidade da mordedura, principalmente se esta alcança o tecido muscular onde há alta densidade de receptores celulares específicos, como o da acetilcolina (JACKSON, 2002).

Há relatos de casos de transmissão por arranhões, contato de mucosas com saliva ou materiais contaminados, inalação de aerossóis em laboratórios ou cavernas, mas com chances reduzidas de causarem infecção (VEERARAGHAVAN, 1954).

Nos continentes, africano, asiático e europeu a raiva em canídeos ainda exerce um papel fundamental na disseminação e manutenção das espécies de raiva e do RABV (NIEZGODA; HANLON; RUPPRECHT, 2002). Estima-se que ocorram, anualmente, em torno de 55.000 óbitos humanos por raiva na Ásia e África. Na América Latina, a incidência anual da raiva por 100.000 habitantes varia entre 0 e 0,09 na América do Sul, 0 e 0,10 na América Central e 0 e 0,06 nas ilhas do Caribe. Na grande maioria dos casos, o cão foi identificado como o animal agressor (CHILDS; REAL, 2007).

No Brasil, entre 1986 e setembro de 2008, ocorreram 761 óbitos por raiva humana, sendo que destes, 516 tiveram o cão como animal agressor, seguido dos quirópteros que foram responsáveis por 135 casos.¹

Há cerca de uma década, vêm sendo notado um decréscimo no número de casos atribuídos a transmissão da doença por canídeos, no Brasil (DA SILVA et al., 2004; QUEIROZ et al., 2009), e muito se deve ao trabalho de vigilância realizado no país (ANDRADE et al., 2008). Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil (SVS/MS) o número de ataques de animais silvestres a humanos notificados em 1999 e 2005 foram, respectivamente, 35 e 16334, e destes, os morcegos foram responsáveis, respectivamente, por 29 e 11811 ataques.

¹ Dados cedidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil – SVS/MS.

Nos Estados Unidos da América (EUA), as espécies silvestres de animais são responsáveis por mais de 90% dos casos de raiva diagnosticados neste país, (KREBS; WHEELING; CHILDS, 2003), sendo sua maioria em uma diversidade de espécies de quirópteros, sobretudo insetívoros. Estes são grupos de animais com distribuição e importância nacionais e são considerados como hospedeiros primários de variantes específicas do RABV (KREBS et al., 2003).

Em função de fatos como os supracitados, os quirópteros têm recebido uma crescente importância com relação a estudos epidemiológicos no que refere à raiva, dadas as crescentes populações de morcegos e frequência de ocorrência de raiva, inclusive, em áreas urbanas (CARNIELI JR. et al., 2005). Além de ser um sério problema de saúde pública na América do Sul, também causa grande prejuízo econômico para a pecuária (DA ROSA et al., 2006; KOTAIT et al., 2007; BARBOSA et al.; 2008), sendo considerados os responsáveis pela transmissão dos da maior parte dos casos de raiva em bovinos e equinos, infectando milhares de animais anualmente (SCHNEIDER et al., 2009).

O reconhecimento dos morcegos como reservatórios do RABV na América do Norte (SCATTERDAY; GALTON, 1954) levou ao relato de inúmeros casos de raiva humana, nos quais foram identificadas variantes próprias de morcegos, sem evidências de mordeduras.

No Brasil, o envolvimento de morcegos hematófagos na transmissão da raiva aos seres humanos, no início da década de 80, era de 2%, do total destes casos (SCHNEIDER, 1990). Nos anos de 2004 e 2005 ocorreu um surto de raiva humana, na região nordeste do país, sendo registrados 22 e 42 casos de raiva transmitida por morcegos hematófagos. De 2000 a 2009, foram notificados 163 casos de raiva em humanos no Brasil, sendo que 45% (43 casos) foram transmitidos por morcegos (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011). Na década anterior foram registrados 412 casos, dos quais 12% (49 casos) tiveram os morcegos como transmissores (SCHNEIDER, 2009).

Na América do Sul, pesquisas mostram que os gêneros de morcegos não hematófagos com maior importância epidemiológica para a raiva são *Artibeus* sp., *Tadarida* sp., *Myotis* sp. e *Lasiurus* sp. Entre as 1.113 espécies de quirópteros existentes no mundo, 174 espécies entre insetívoros, frugívoros e hematófagos são encontrados no Brasil (PAGLIA et al., 2012). Destas, 42 espécies já foram diagnosticadas com o RABV (FAHL et al., 2013).

Em se tratando de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*, o primeiro diagnóstico deu-se em Trinidad, em 1931, em um exemplar da espécie *Artibeus planirostris* e, desde então, a raiva já foi relatada nas espécies *A. fimbriatus*, *A. jamaicensis*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *A. obscurus* (UIEDA et al., 1996; CUNHA et al., 2005; FAHL et al., 2013).

Por meio de investigações epidemiológicas da raiva em animais silvestres, foi demonstrado que o vírus pode ser transmitido especificamente para uma determinada espécie de hospedeiro, tornando-se extremamente adaptado a esta espécie e menos capacitado para infectar outras espécies. Esta relação hospedeiro-parasita tornou-se conhecida como "compartimentalização" do vírus da raiva (WINKLER, 1975; CONSTANTINE, 1988). Alguns autores sugerem que exista a compartimentalização quando o vírus da raiva de determinada espécie de morcego não apresenta características semelhantes às dos vírus isolados de outras espécies de morcegos. Estes estudos foram grandemente facilitados com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais (AcM) e técnicas de caracterização genética (CONSTANTINE, 1988).

No Brasil, foram estabelecidas quatro variantes antigênicas (AgV) por AcM circulantes: AgV2 (cão), AgV3 (*Desmodus rotundus*), AgV4 (*Tadarida brasiliensis*) e AgV6 (*Lasiurus cinereus*). Além destas quatro variantes, outra variante antigênica, AgV5 (morcego hematófago da Venezuela), também foi identificada, porém não é comumente encontrada no país. Além das variantes mencionadas, outros seis perfis antigênicos não determinados foram descritos, um deles em primatas e outros em morcegos insetívoros (ALBAS et al., 2009).

Delpietro e colaboradores (1997) em estudo com AcM, relataram que amostras de RABV isolados de morcegos frugívoros *A. lituratus* eram antígenicamente relacionados com a variante de morcegos hematófagos.

A análise de amostras de morcegos hematófagos *D. rotundus* mostra que existem no mínimo duas variantes antigênicas, AgV3 e AgV11, na população deste animal no México. Em relação aos morcegos frugívoros, existem duas variantes do RABV, AgV4 e AgV9, estabelecidas na população de *Tadarida brasiliensis mexicana* (VELLASCO-VILLA et al., 2002; VELLASCO-VILLA et al., 2006). Entre os herbívoros de interesse econômico, as AgV encontradas foram tipificados como AgV3. Ainda, no Estado de São Paulo, foram tipificados antígenicamente isolados do RABV de

morcegos não hematófagos, sendo detectados as variantes antigênicas AgV3 e AgV4, típicas de *D. rotundus* e *T. brasiliensis*, respectivamente (ALBAS et al., 2009).

Considerando a transmissão do vírus da raiva, ao ocorrer o contato do animal infectado com outro animal suscetível, ocorre inicialmente uma replicação viral nos miócitos, podendo também ocorrer no tecido subepitelial, dependendo da espécie. Após atingirem altas concentrações antigênicas, ocorre, então, a replicação extraneural, direcionando-se, então, às terminações nervosas (FEKADU et al., 1988).

Depois desta fase, a glicoproteína viral se liga a receptores específicos, como o receptor nicotínico da acetilcolina, na altura das junções neuromusculares, e penetra nas terminações nervosas sensitivas (LEWIS; FU; LENTZ, 2000).

Quando no sistema nervoso periférico (SNP), o vírus é transportado aos gânglios sensitivos por trajeto centrípeto, e atinge o sistema nervoso central (SNC), sendo a propagação viral por fluxo axoplasmático retrógrado por meio de junções sinápticas (KUCERA et al., 1985; TSIANG; CECCALDI; LYCKE, 1991).

No SNC, ocorre uma intensa disseminação, entretanto, a mesma não é homogênea, podendo afetar de diferentes maneiras as diversas estruturas deste órgão. Posteriormente, por via axoplasmática ou perineal, o vírus migra por trajeto centrífugo em direção aos diferentes órgãos (coração, rins, cavidades nasais, córnea, pulmões, língua, vesícula biliar, bexiga, músculos, junções mioneurais, placas motoras, etc) (CORRÊA; CORRÊA, 1992; BRASS, 1994; AWASTHI et al., 2001; DE MATTOS; DE MATTOS; RUPPRECHT, 2001; SCHEFFER et al., 2007), envolvendo particularmente o sistema nervoso parassimpático (BEER, 1999; JACKSON, 2002).

O forte tropismo pelas glândulas salivares representa o final do ciclo no hospedeiro, que culmina com a morte. Desta forma, o RABV durante seu ciclo, passa pelo sistema límbico, altera o comportamento, geralmente, aumentando a agressividade. O animal tem como reflexo a mordedura e o vírus, estando presente na saliva, passa para o animal agredido, perpetuando-se (MURPHY, 1985). Ainda, as lesões do tecido nervoso, causadas pelo vírus, são concentradas na medula espinhal, tronco encefálico e rinencéfalo, provocando a alteração das células ganglionares, especialmente do hipocampo, levando manifestações clínicas de perda das funções motoras (BEER, 1999).

A forma clínica da raiva se manifesta de forma muito variada entre as espécies. As apresentações clássicas da doença são a parálitica e a furiosa, as quais se desenvolvem em consequência à localização das lesões no SNC (MAYR; GUERREIRO, 1972). Distinções em relação à evolução (tempo de sobrevivência), manifestações clínicas e lesões podem estar relacionadas às características de neuroinvasividade (capacidade de penetração e distribuição no SNC após replicação extra-neural) e neuropatogenicidade (habilidade de replicação no SNC com consequente disfunção ou morte celular) das diferentes variantes do RABV.

Quando a hiperexcitabilidade é predominante, o quadro clínico é classificado como “furioso” e quando a paralisia é predominante, como “paralítico” (CHOPRA et al., 1980). A raiva parálitica é mais observada em herbívoros expostos a vírus inoculados por morcegos. A raiva furiosa progride mais rapidamente (2 a 7 dias) do que a parálitica (média de 2 meses) no período neurológico.

Manifestações límbicas de agressividade, alta neuroinvasividade (quantificada pela concentração de antígeno e de RNA viral no encéfalo) e moderada inflamação foram observadas em cães com manifestação de raiva furiosa. Já em cães com manifestações de raiva parálitica, observou-se predominância de paralisia do neurônio motor inferior e intensa inflamação no tronco encefálico (SHUANGSHOTI et al., 2013). Entretanto, os mecanismos que resultam nessas formas clínicas não foram ainda totalmente esclarecidos (TIRAWATNPONG et al., 1989).

Estudos realizados demonstraram que componentes das membranas celulares com fosfolipídios e glicolipídios estimulam o neurotropismo do vírus da raiva. Neurônios, fibroblastos e componentes de membrana, como o ácido siálico e gangliosídeos, estão envolvidos neste processo (LENTZ et al., 1982).

O conhecimento de aspectos ligados à patogenia da raiva nas diferentes espécies constitui importante instrumento para o controle da enfermidade nesses animais e humanos (SCHEFFER et al., 2007).

A emergência da raiva enzoótica requer mudanças genéticas na linhagem do vírus original para que esta se adapte a um novo hospedeiro, sendo necessário um constante estudo acerca desta zoonose (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDA, 2002).

A hipótese a ser avaliada neste estudo é que polimorfismos na proteína L levem a variações na eficiência de replicação de diferentes linhagens de RABV em diferentes hospedeiros, culminando em títulos virais variáveis, modulando a

patogenia viral em conjunto com a proteína P, em função de polimorfismos nesta que possam levar a diferentes eficiências de transporte intra-axonal e de função cofatorial na síntese de RNA viral.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve os seguintes objetivos:

- Estudar a relação entre polimorfismos no gene codificador das proteínas P e L de amostras de RABV pertencentes às variantes antigênicas 2 e 3 e períodos de incubação em camundongos.
- Avaliar a relação entre títulos virais de amostras de RABV pertencentes às variantes antigênicas 2 e 3 e sequências dos genes codificadores da RNA polimerase L e da fosfoproteína P.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 AMOSTRAS E ANÁLISE DAS FICHAS DE LEITURA

Foram utilizadas 30 amostras de vírus da raiva, isoladas de morcegos do gênero *Artibeus* (Quadro 2), 18 de bovinos (Quadro 3) e 21 amostras de canídeos domésticos e silvestres do Brasil (Quadro 4), reservatórios do vírus da raiva segundo a literatura (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDA, 2002) de áreas endêmicas para a raiva.

Para estas amostras, foram levantados os dados de letalidade (LET) e períodos de incubação (PI) em dias após a inoculação em sistema nervoso central (SNC) de camundongos, previamente realizada pela Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo.

Para o levantamento dos dados de LET e PI foi realizado o inventário das fichas de leitura dos camundongos das amostras escolhidas. Nestas fichas, encontrou-se anotados os dados do desenvolvimento da doença, como início dos sintomas característicos da raiva, dia de morte dos animais ou dia em que foram sacrificados, quantidade de animais inoculados e quantidade de animais sobreviventes até o final do período de observação. Estes animais foram acompanhados diariamente por um período de 30 dias após a inoculação.

Com base nas anotações das fichas foram levantados os dados de LET e PI (em dias) após a inoculação em SNC de camundongos.

Como LET entende-se o total de animais mortos dentre os inoculados com suspensão da amostra em estudo, ou seja, o número de animais mortos dentre os infectados. E como PI, o primeiro dia em que o animal apresentou sinal da doença após a inoculação. Foi realizada a média do PI, sendo esta calculada considerando o intervalo da inoculação intracerebral até o dia do início dos sintomas ou da morte dos animais.

3.2 TITULAÇÃO VIRAL DAS AMOSTRAS EM CULTIVO CELULAR

A partir da primeira passagem em camundongo, de amostras previamente inoculadas, foi preparada uma suspensão a 20% do SNC do animal, sendo esta suspensão utilizada no experimento. Foram utilizadas nesta etapa do trabalho as amostras de isolados de morcegos do gênero *Artibeus*, como representantes de AgV3 e as amostras de isolados de canídeos como representantes de AgV2.

Para a titulação dos vírus em células da linhagem neuroblastoma murino (N2A), foi utilizada uma placa de 96 cavidades para cada isolado. Inicialmente, foram preparadas diluições seriadas dos isolados na base de 10 em meio essencial mínimo de Eagle (MEM), sem soro fetal bovino (SFB). A partir deste ponto, em cada cavidade foram acrescentados 100µL da suspensão das células N2A (5×10^5 células/mL), 160µL de MEM com 10% de SFB e 0,3mM de aminoácidos não essenciais e gentamicina, e 40µL de vírus, correspondendo a primeira linha à diluição 10^0 (com 12 cavidades da placa/coluna), a segunda 10^{-1} e assim por diante até a sétima linha com a diluição 10^{-6} . A oitava linha da placa foi utilizada como controle negativo, sendo adicionado em cada orifício 40µL de suspensão de célula em substituição a amostra. As placas foram mantidas na estufa a 37°C com 5% de CO₂, durante 96 horas para replicação do vírus (CASTILHO et al., 2007).

Após este período, o conteúdo líquido (MEM contendo vírus) de todos os orifícios foi aspirado com pente ligado à bomba de sucção. Em seguida, as placas foram submetidas à reação de imunofluorescência direta (IFD), conforme descrito no item a seguir.

3.2.1 Reação de Imunofluorescência Direta (IFD)

As monocamadas celulares contidas em cada orifício da placa foram fixadas, em banho de gelo, com 200µL de acetona a 80% a -20°C, durante 15 minutos. Após este intervalo a acetona foi descartada por inversão da placa e as monocamadas

celulares foram submetidas à IFD, como descrito por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996). Em cada orifício foi acrescentado 40µL do conjugado antívirus de raiva policlonal antinucleocapsídeo, produzido a partir de soro hiperimune de coelho (CAPORALE et al., 2009) combinado com Azul de Evans conforme titulação prévia desse conjugado e a seguir, as placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora. Logo após, o conjugado foi descartado por inversão da placa e as placas contendo a monocamada celular foram lavadas três vezes em PBS (pH 7,4) e em água destilada, e em seguida foi realizada a secagem das placas. Logo após a secagem foi acrescido 50µL de glicerina a 20% por cavidade e finalizando o processo, as placas contendo células foram examinadas em microscópio invertido de fluorescência (Leica®) em aumento de 40x e os resultados foram avaliados para verificar replicação viral, considerando como positivo o orifício no qual houve uma ou mais células infectadas detectadas por fluorescência. O título de cada isolado foi calculado a partir dos dados obtidos na leitura das placas, utilizando-se o método de Reed-Müench.

3.3 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA FOSFOPROTEÍNA (P) E RNA POLIMERASE L (L) DO RABV

As amostras foram submetidas à reação de RT-PCR para amplificação do gene *P* e do gene *L*, segundo protocolo descrito por Carnieli Jr. (1999), com *primers* para fosfoproteína descritos por Kobayashi e colaboradores (2007) e *primers* para a RNA polimerase viral descritos por Bourhy e colaboradores (2005). Como controles positivo e negativo, foram inseridos, respectivamente, suspensão de cérebros de camundongos inoculados com a amostra fixa *Challenge Virus Standard* (CVS) e água ultra-pura livre de DNase e RNase, desde a fase de extração do RNA até a amplificação das amostras.

3.3.1 Extração de RNA

Para a técnica de extração utilizou-se, para as amostras (Quadros 2, 3 e 4), o protocolo do *TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[®])*. Foram utilizadas amostras de SNC, sendo acrescentado 1,0mL de *TRIzol[®]* em cada tubo contendo a suspensão, homogeneizado com o auxílio do agitador de tubos por aproximadamente 20 segundos, após a agitação foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram acrescentados 200µL de clorofórmio no tubo contendo o *TRIzol[®]* e a amostra. O tubo foi então homogeneizado e mantido por 3 minutos em temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 12000xg e 4°C. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida, com auxílio de micropipeta, para outro microtubo de 1,5mL. Para a precipitação do RNA, álcool isopropílico foi acrescido no mesmo volume da fase aquosa retirada anteriormente. Após 10 minutos em temperatura ambiente os materiais foram centrifugados a 12000xg, por 10 minutos, a 4°C, e em seguida o sobrenadante foi desprezado pela inversão do tubo, ficando o precipitado no fundo do tubo. Posteriormente, o precipitado foi lavado com 1,0mL de etanol 75%, centrifugado a 12000xg, por 5 minutos, a 4°C, o álcool foi desprezado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente, e finalmente, ressuspendido em 25µL de água livre de DNase/RNase. Em cada extração foi acrescentado um controle negativo, utilizando 300µL de água destilada *UltraPure[®]* livre de RNase/DNase (*Invitrogen[®]*) e um controle positivo, sendo amostras de vírus fixo padrão (CVS) em SNC de camundongos. Todo o procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica (CSB). Os tubos contendo o RNA total extraído foram colocados em termobloco a 56°C por 10 minutos e após, acondicionados à temperatura de -20°C até o momento da sua utilização.

Quadro 2 - Relação dos isolados de vírus da raiva de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*, indicando o número de identificação/ano de recebimento, hospedeiro original e município onde foram encontrados - São Paulo - 2011

Amostra	Espécie hospedeira	Origem geográfica
1110V/09	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Ribeirão Preto – SP
2242V/09	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Ribeirão Preto – SP
2470V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
2734V/09	<i>Artibeus planirostris</i>	Ribeirão Preto – SP
2939V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3017V/09	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Ribeirão Preto – SP
3173V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3174V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3175V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3401V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3405V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3406V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3852V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3933V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3970V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
4506V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
4606V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
4607V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
4925V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas – SP
4987V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
5059V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Assis – SP
5610V/09	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Jales – SP
7204V/09	<i>Artibeus obscurus</i>	Ribeirão Preto – SP
2202V/10	<i>Artibeus sp</i>	Ribeirão Preto – SP
3015V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Jales – SP
3088V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas – SP
3208V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
3848V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP
5378V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas – SP
5731V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto – SP

Quadro 3 - Relação dos isolados de vírus da raiva de bovinos, como relacionadas a morcegos hematófagos, indicando o número de identificação/ano de recebimento, hospedeiro original e município onde foram encontrados - São Paulo - 2013

Amostra	Espécie hospedeira	Origem geográfica
732/12	Bovino	Mococa – SP
1490/12	Bovino	Mococa – SP
1708/12	Bovino	Amparo – SP
2005/12	Bovino	Amparo – SP
2023/12	Bovino	Descalvado – SP
2180/12	Bovino	Cristais Paulista - -SP
2747/12	Bovino	Mococa – SP
2825/12	Bovino	Patrocínio Paulista - SP
2835/12	Bovino	Santa Rita do Passa Quatro - SP
3125/12	Bovino	Santa Rosa do Viterbo - SP
3357/12	Bovino	Tambau – SP
3585/12	Bovino	Espírito Santo do Pinhal - SP
3652/12	Bovino	Descalvado – SP
4015/12	Bovino	Amparo – SP
4274/12	Bovino	São José do Pinhais - PR
4523/12	Bovino	Franca – SP
4798/12	Bovino	Itirapuã – SP
4875/12	Bovino	Guaranésia – MG

Quadro 4 - Relação dos isolados de vírus da raiva de canídeos, indicando o número de identificação/ano de recebimento, hospedeiro original e município onde foram encontrados - São Paulo - 2011

Amostra	Espécie hospedeira	Origem geográfica
5063/05	Cão	Teresina – PI
6053/05	Cão	Socorro – SE
8587/05	Cão	Jacunda – PA
8589/05	Cão	Viséu – PA
9370/05	Cão	Parnaíba – PA
1720/08	Cão	Recife – PE
4105/08	Cão	Panelas – PE
6333/05	Cachorro do mato	Teresina – PI
6369/05	Cachorro do mato	Teresina – PI
6967/05	Cachorro do mato	Recife – PE
6971/05	Cachorro do mato	Recife – PE
6972/05	Cachorro do mato	Recife – PE
6973/05	Cachorro do mato	Recife – PE
6975/05	Cachorro do mato	Recife – PE
6978/05	Cachorro do mato	Recife – PE
7576/05	Cachorro do mato	Teodoro Sampaio – BA
7579/05	Cachorro do mato	Jaguarari - BA
1718/08	Cachorro do mato	Recife - PE
1721/08	Cachorro do mato	Recife - PE
1723/08	Cachorro do mato	Recife - PE
4102/08	Cachorro do mato	Frei Miguelino - PE

3.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) – Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para a transcrição reversa para a amplificação parcial dos genes *P* e *L*, adicionaram-se 5µL do RNA extraído de cada respectiva amostra ao *mix* contendo 8µL 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 6µL do pool de dNTPs na concentração de 10mM, 4µL DTT a 100mM, 5µL de cada *primer* na concentração de 10µM (senso e antissenso, Quadro 5); 200U de Superscript™ II *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), 1µL de RNaseout (Invitrogen™) e 19µL de água ultra-pura livre de

DNase e RNase estéril para um volume final de 45µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60min.

Após a obtenção do cDNA, foi realizada a reação de PCR pela adição, para cada amostra, de 10µL de cada respectivo cDNA ao *mix* de PCR contendo 10µL de 10X PCR *Buffer* (Invitrogen™), 16µL do pool de dNTPs à 1,25mM, 5µL de cada *primer* à 10mM (senso e antissenso, Quadro 5), 5µL 50mM MgCl₂, 48µL de água ultra-pura estéril e 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para um volume final de 100µL e levados ao termociclador e submetidos ao ciclo descrito no Quadro 6.

Quadro 5 – Relação dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR e no sequenciamento das amostras de RABV de morcegos do gênero *Artibeus* spp., de canídeos e de amostras de bovinos

<i>Primers</i>	Sentido	Sequência	Gene	Posição do genoma
Psense1	Senso	5'-CGAATCATGATGAATGGAGG-3'	P	1292-1311
Panti1	Antissenso	5'-TCATTTTATCAGTGGTGTG-3'	P	2499-2479
PVO3	Antissenso	5'-CCADNCBTTTTGYCKYARRCCTTC-3'	L	7526–7503
PVO4	Senso	5'-RAAGGYAGRTTTTTYKCDYTRATG-3'	L	7068–7088

Quadro 6 - Ciclo da reação de PCR para amplificação do gene *P* e *L* do vírus da raiva dos isolados utilizados no presente estudo

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

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em 1% em tampão TBE 1X (0,1M de Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA) contendo brometo de etídeo na concentração de 0,45mg/mL de tampão.

Foram consideradas positivas as amostras que resultaram em fragmentos de 1200 pb para o gene *P*, e 470 pb para o gene *L* (*primers* Psense1/Panti1 e PVO3/PVO4, respectivamente).

3.4 SEQUENCIAMENTO DE DNA

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

3.4.1 Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação a partir das reações de PCR foi utilizado o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen®) segundo instruções do fabricante. As reações que apresentaram bandas inespecíficas foram purificadas a partir do gel com o mesmo kit.

Após a purificação, as amostras de DNA foram quantificadas visualmente em gel de agarose a 2% com *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen™).

3.4.2 Reação de sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento de DNA foi composta de 4µL de *BigDye* 3.1 (Applied Biosystems®), 4µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems®), 3,2pmol de cada *primer* (senso e antissenso, Quadro 5), referente a cada gene (*P* e

L) em reações separadas, 30 a 50ng do DNA alvo e água DNase/RNase free q.s.p. para uma reação final de 10 μ L, levando-se ao termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®) para 35 ciclos de 96°C/10 segundos, 50°C/5 segundos e 60°C/4 min, com rampa de 1°C/segundo entre cada temperatura.

A purificação da reação de sequenciamento foi realizada com o uso de Sephadex™ (GE healthcare Bio-sciences AB) em placas Multiscreen HV (Millipore®) segundo instruções do fabricante.

A seguir, o precipitado foi ressuspenso em 10 μ L de formamida HI-DI, transferido para uma placa de 96 poços para sequenciamento, e levado ao termociclador para denaturar o DNA a 95°C durante 5 minutos. Em seguida a placa de 96 poços foi levada ao sequenciador automático ABI-3130 (Applied Biosystems™), para a obtenção das sequências.

3.4.3 Edição de sequências

Para cada um dos nt mostrados nos eletroferogramas gerados para cada uma das reações de sequenciamento foram atribuídos escores por meio do *software Phred*² online, sendo utilizadas as posições que apresentaram nt com índice *Phred* maior que 20 (EWING; GREEN, 1998).

Os nt com índice *Phred* igual ou menor a 20 foram conferidos manualmente com o programa *Chromas* v. 2.23 (© 1998-2002 *Technelysium Pty LTD*), para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas. A sequência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo *Cap-Contig* com o programa *Bioedit* v. 5.0.9 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida à *BLASTn*³ para confirmação do sequenciamento.

² *Phred* Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 2008/2009.

³ *BLASTn* Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 2008/2009.

3.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências de DNA obtidas foram analisadas pelo método múltiplo de alinhamento CLUSTAL/W utilizando-se o programa *Bioedit* (HALL, 1999), conferindo-se manualmente os alinhamentos para cada conjunto de sequências.

Para a reconstrução filogenética dos isolados de RABV, foi utilizado o método de distância com o algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo *Maximum Composite Likelihood* (MCL), com 1000 repetições de *bootstrap*.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos, baseados nas metodologias definidas para o presente estudo, estão descritos nos itens a seguir.

4.1 ANÁLISE DAS FICHAS DE LEITURA E TITULAÇÃO VIRAL DAS AMOSTRAS EM CULTIVO CELULAR

Foram analisados os dados das fichas de leituras dos camundongos inoculados com as 30 amostras de vírus da raiva isoladas de morcegos do gênero *Artibeus* (Tabela 1), 18 de bovinos (Tabela 2) e 21 amostras de canídeos (Tabela 3).

Os dados de LET e PI encontram-se descritos nas tabelas 1, 2 e 3.

O período de incubação teve um tempo de início dos sintomas ou morte dos animais variando entre cinco e quinze dias.

A letalidade teve uma variação na mortalidade dos animais de 43% a 100%.

Quanto à titulação viral das amostras em cultivo celular, os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 1 e 2. Em um mesmo grupo foram observados valores de TCID₅₀ entre 0,34 e 4,71 (Figura 1 e 2).

Tabela 1 - Relação dos isolados de vírus da raiva de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* para estudo, identificando o hospedeiro original, período de Incubação (PI), Letalidade (LET) e resultado da titulação viral em cultivo celular (TCID50) - São Paulo – 2014

Amostra	Espécie hospedeira	PI (dias)	\bar{x} PI	LET	LET(%)	TCID50
1110V/09	<i>Artibeus fimbriatus</i>	8	8,86	7/7	100	1,40
2242V/09	<i>Artibeus fimbriatus</i>	7	10,40	7/7	100	1,50
2470V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	5	6,00	7/7	100	0,49
2734V/09	<i>Artibeus planirostris</i>	10	10,43	7/7	100	3,00
2939V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	8	10,14	7/7	100	0,78
3017V/09	<i>Artibeus fimbriatus</i>	10	10,00	7/7	100	1,84
3173V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	7	9,17	7/7	100	1,22
3174V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	8	9,29	7/7	100	0,61
3175V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	7	8,00	7/7	100	2,00
3401V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	8	8,00	7/7	100	1,58
3405V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	8	8,00	7/7	100	3,18
3406V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	15	15,00	7/7	100	0,77
3852V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	8	8,57	7/7	100	3,20
3933V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	5	6,23	7/7	100	1,80
3970V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	7	8,43	7/7	100	1,00
4506V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	6	8,00	4/4	100	1,58
4606V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	7	8,29	7/7	100	3,33
4607V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	8	8,00	7/7	100	2,33
4925V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	7	9,57	7/7	100	1,33
4987V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	10	10,00	7/7	100	0,75
5059V/09	<i>Artibeus lituratus</i>	7	13,00	5/7	71	1,40
5610V/09	<i>Artibeus fimbriatus</i>	10	11,14	7/7	100	1,09
7204V/09	<i>Artibeus obscurus</i>	10	10,00	7/7	100	0,34
2202V/10	<i>Artibeus sp</i>	6	6,57	5/7	71	4,71
3015V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	8	9,50	6/6	100	2,60
3088V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	13	13,71	6/7	86	2,87
3208V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	9	9,67	3/7	43	3,00
3848V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	6	8,57	7/7	100	1,31
5378V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	10	10,00	7/7	100	2,59
5731V/10	<i>Artibeus lituratus</i>	11	13,14	7/7	100	1,41

\bar{x} PI = Valor médio do período de incubação

TCID50 = Dose infectante de 50% em cultivo celular

Tabela 2 - Relação dos isolados de vírus da raiva de canídeos usados neste estudo, identificando o hospedeiro original, período de Incubação (PI), Letalidade (LET) e resultado da titulação viral em cultivo celular (TCID50) - São Paulo - 2014

Amostra	Espécie hospedeira	PI (dias)	\bar{x} PI	LET	LET%	TCID50
5063/05	Cão	11	11,43	7/7	100	0,88
6053/05	Cão	11	12,71	7/7	100	0,60
8587/05	Cão	11	13,60	5/5	100	2,40
8589/05	Cão	11	14,00	4/5	80	0,46
9370/05	Cão	9	10,00	6/7	86	0,75
1720/08	Cão	9	9,00	7/7	100	1,50
4105/08	Cão	7	7,29	7/7	100	1,20
6333/05	Cachorro do mato	9	12,33	6/7	86	2,40
6369/05	Cachorro do mato	13	13,00	6/7	86	2,30
6967/05	Cachorro do mato	14	15,50	7/7	100	1,00
6971/05	Cachorro do mato	8	8,57	7/7	100	0,56
6972/05	Cachorro do mato	14	14,00	6/7	86	0,61
6973/05	Cachorro do mato	9	10,00	7/7	100	1,00
6975/05	Cachorro do mato	10	10,29	7/7	100	0,27
6978/05	Cachorro do mato	14	14,00	5/7	71	1,88
7576/05	Cachorro do mato	11	12,00	7/7	100	0,23
7579/05	Cachorro do mato	11	13,14	7/7	100	0,75
1718/08	Cachorro do mato	9	9,60	7/7	100	0,50
1721/08	Cachorro do mato	6	7,71	7/7	100	1,24
1723/08	Cachorro do mato	7	10,29	7/7	100	2,40
4102/08	Cachorro do mato	8	9,57	7/7	100	2,30

\bar{x} PI = Valor médio do período de incubação

TCID50 = Dose infectante de 50% em cultivo celular

Tabela 3 - Relação dos isolados de vírus da raiva de bovinos usados neste estudo, identificando o hospedeiro original, período de Incubação (PI) e Letalidade (LET) - São Paulo - 2013

Amostra	Espécie hospedeira	PI (dias)	\bar{x} PI	LET	LET(%)
IP732/12	Bovino	12	12,23	7/7	100
IP1490/12	Bovino	9	9,33	6/6	100
IP1708/12	Bovino	8	8,14	7/7	100
IP2005/12	Bovino	7	7,29	7/7	100
IP2023/12	Bovino	12	12,00	5/5	100
IP2180/12	Bovino	9	10,20	5/5	100
IP2747/12	Bovino	7	10,86	7/7	100
IP2825/12	Bovino	9	10,00	6/6	100
IP2835/12	Bovino	9	9,60	5/5	100
IP3125/12	Bovino	10	10,00	6/6	100
IP3357/12	Bovino	5	10,83	6/6	100
IP3585/12	Bovino	12	12,00	6/6	100
IP3652/12	Bovino	7	7,00	6/6	100
IP4015/12	Bovino	7	8,71	7/7	100
IP4274/12	Bovino	7	7,83	6/6	100
IP4523/12	Bovino	9	11,00	6/6	100
IP4798/12	Bovino	13	14,71	7/7	100
IP4875/12	Bovino	8	9,33	6/6	100
					100

\bar{x} PI = Valor médio do período de incubação

4.2 RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES FOSFOPROTEÍNA (P) E RNA POLIMERASE L (L) DO RABV

Todas as amostras (Quadros 2, 3 e 4) submetidas à técnica de RT-PCR, tanto as dirigidas para o gene P, como para o para o gene L, resultaram nos fragmentos esperados. Na figura 1, temos o padrão observado para as amostras positivas para raiva na eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. Na técnica de RT-PCR as amostras positivas apresentaram o fragmento esperado de 1200pb (figura 1A) para o gene P, e 470pb (figura 1B) para o gene L.

Possíveis contaminações para as reações de RT-PCR não ocorreram, visto que as reações referentes aos controles negativos não apresentaram bandas resultantes da amplificação de DNA.

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo das reações de RT-PCR. Na técnica de RT-PCR as amostras positivas apresentaram o fragmento esperado de 1200pb (Figura 1A) para o gene P e 470pb (Figura 1B) para o gene L.

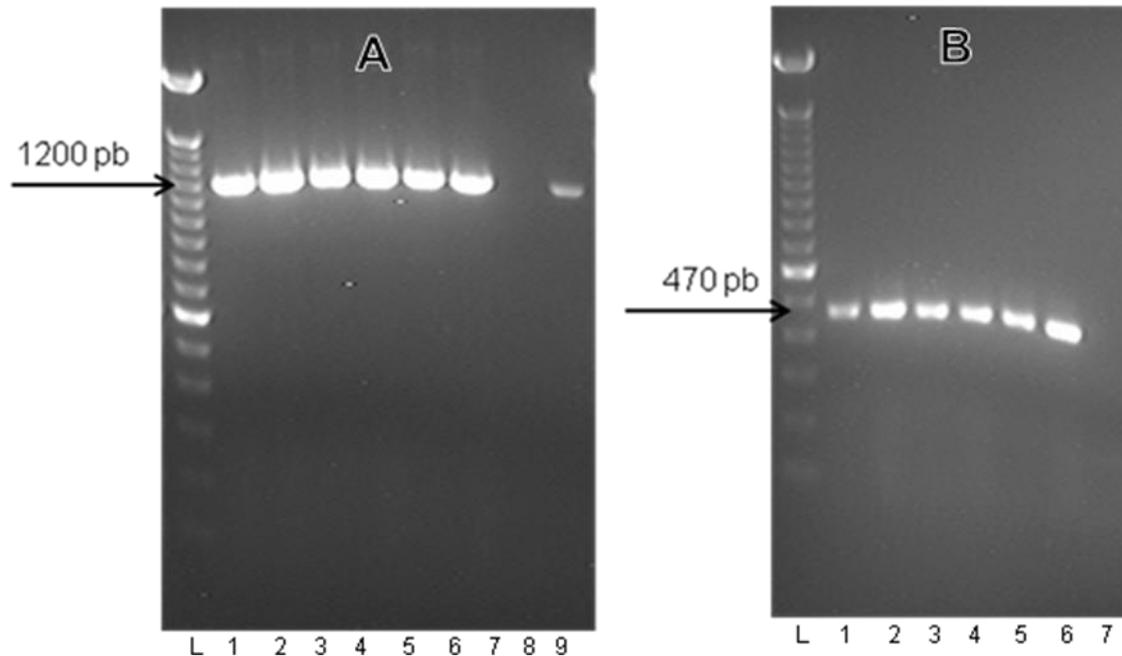


Figura 1A: L- marcador molecular, 1 a 6 amostras teste, 7- H2O e 8 - CVS; e
 Figura 1B: L- marcador molecular, 1 a 5 amostras teste, 6- CVC e 7 - H2O
 Fonte: Fahl, W.O.

4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Foram geradas duas árvores filogenéticas, uma para cada gene analisado, ou seja, *P* e *L*, acrescidas de sequências retiradas do GenBank.

4.3.1 Gene *P*

A árvore filogenética gerada neste estudo para o gene *P* demonstrou a formação de dois grupos, apoiados em *bootstraps* de no mínimo 50% (Figura 2). Em um dos grupos, segregaram as amostras representativas da AgV 3, ou seja, as

amostras de morcegos do gênero *Artibeus* e as de bovinos. O outro grupo, foi formado pelas amostras representativas da AgV2, as amostras de canídeos.

O grupo AgV3, ainda, foi formado por dois grupos, distintos, um com as amostras de morcegos do gênero *Artibeus* e outro com as amostras de bovinos (Figura 2).

4.3.2 Gene *L*

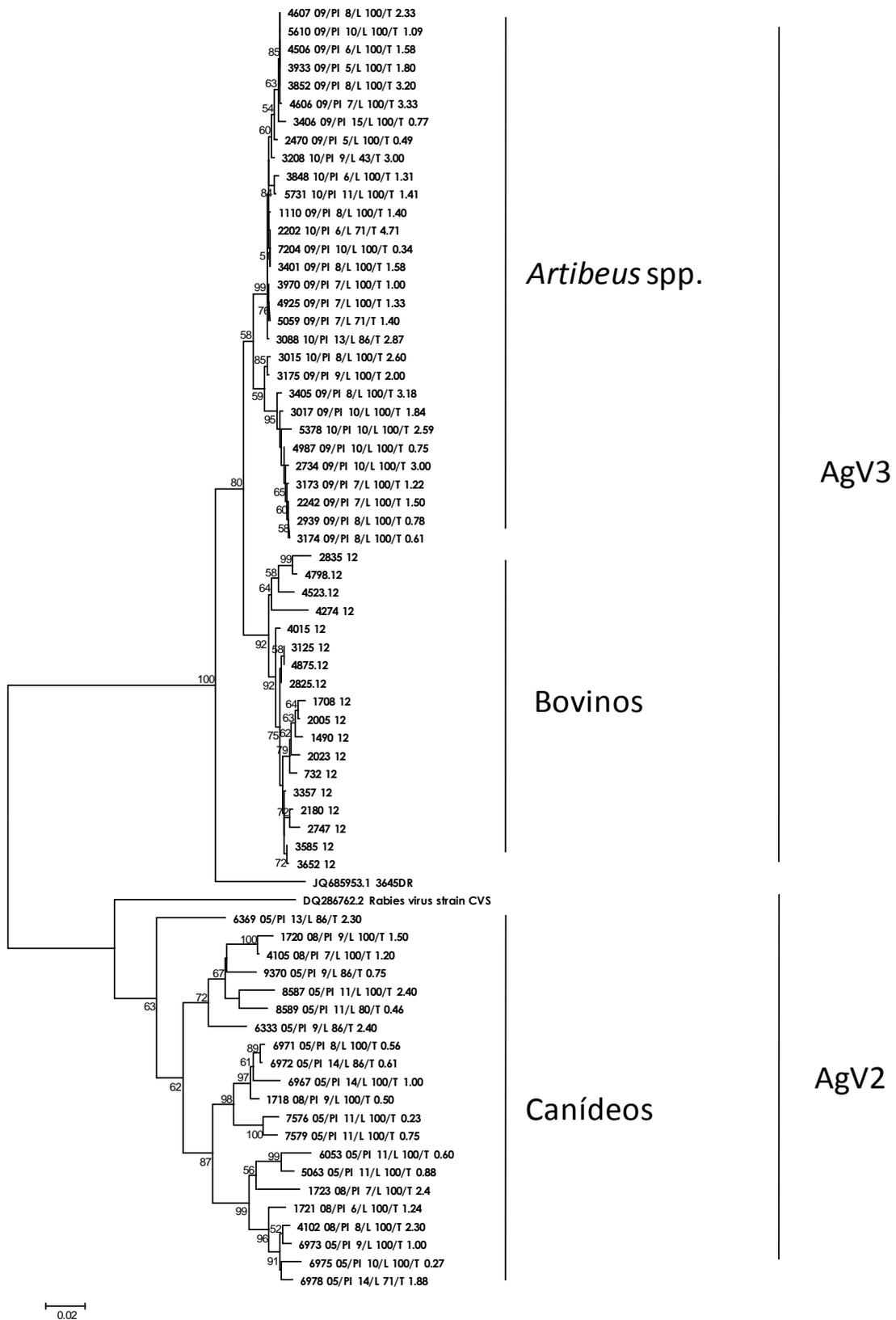
A árvore filogenética gerada neste estudo para o gene *L* demonstrou a formação de dois grandes grupos, concordando com a topologia encontrada para o gene *P*, ou seja, os grupos AgV 3 e AgV2 (Figura 3).

Entretanto, na árvore filogenética gerada para o gene *L*, o grupo com amostras representativas da variante antigênica 3 (AgV3), segregou em quatro grupos, sendo dois grupos para as amostras de morcegos do gênero *Artibeus* e dois grupos para as amostras de bovinos (Figura 3).

Tanto para o gene *P* como para o gene *L*, o agrupamento formado pelos isolados de uma mesma espécie, segregaram como o esperado. Essa topologia ocorreu em função da identidade entre as sequências.

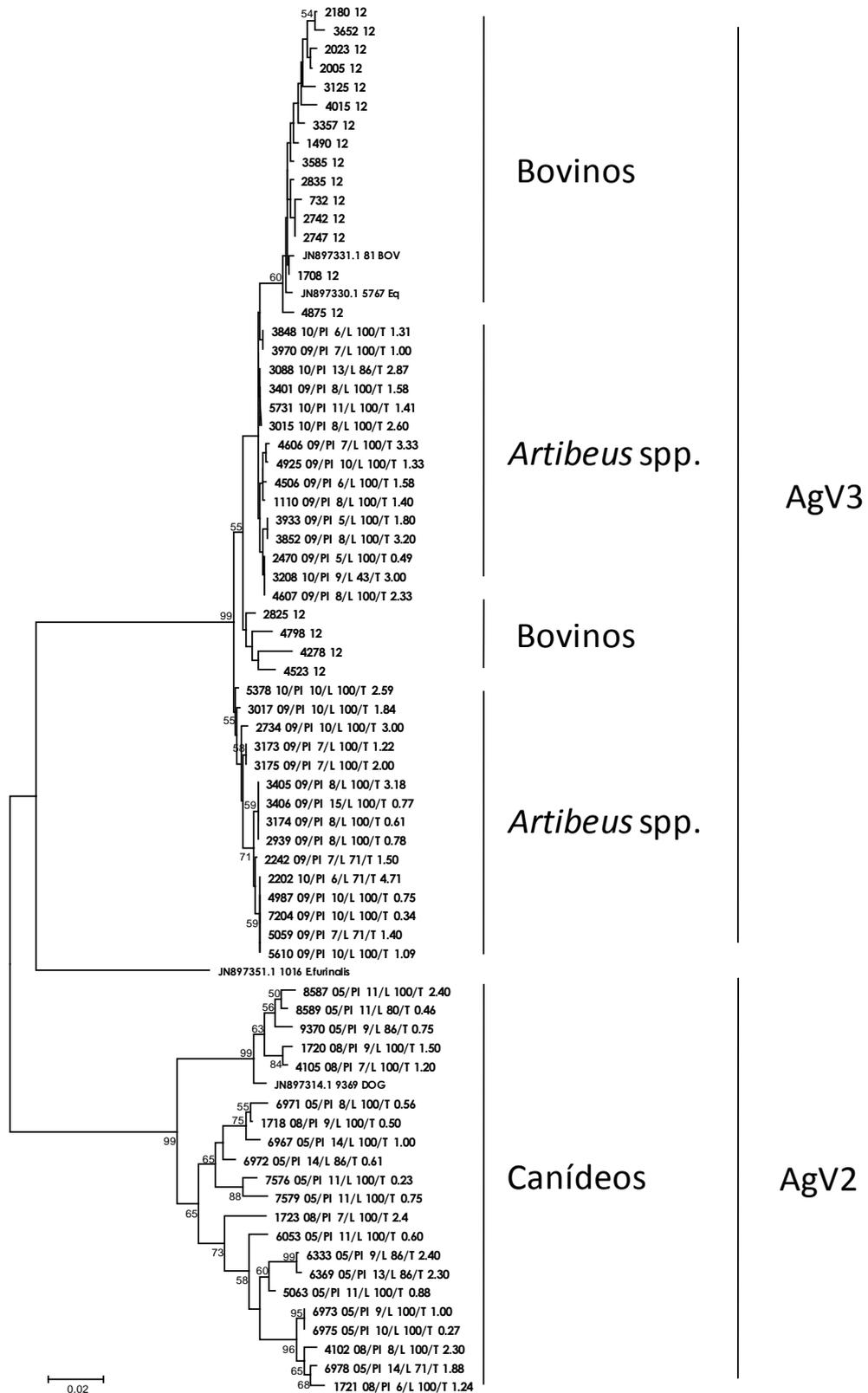
Entretanto, não foram observadas relações entre a formação dos grupos e o período de incubação, letalidade e titulação viral, visto que em todos os grupos houve a variação dos resultados das variáveis analisadas.

Figura 2 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo MCL para o gene *P* de RABV e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de *bootstrap* - São Paulo – 2014



Fonte: Fahl, W. O.

Figura 3 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo MCL para o gene *L* de RABV e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de *bootstrap* - São Paulo - 2014



Fonte: Fahl, W. O.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, analisou-se a filogenia dos genes *P* e *L* de RABV isolados de *Artibeus* spp., em bovinos e canídeos domésticos e silvestres. Morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* apresentam relevância para a epidemiologia da raiva, sobretudo em centros urbanos, sendo relatados como reservatórios de variantes do RABV similares às aquelas encontradas em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*. Da mesma forma, os canídeos, tanto os domésticos como os silvestres, ainda apresentam importância na disseminação da raiva e, conseqüentemente, na epidemiologia dessa zoonose.

Os resultados encontrados pelas técnicas de RT-PCR, obtidos neste estudo, apresentaram positividade para todos os 69 isolados utilizados, tanto para o gene *P* como para o gene *L*.

Assim sendo, neste estudo, as reações de PCR utilizadas mostraram-se eficientes ao serem aplicadas nos isolados de RABV, o que pode ser atribuído principalmente ao baixo polimorfismo das áreas de hibridização dos *primers* selecionados, localizadas em segmentos altamente conservados do genoma do RABV em cada um dos respectivos genes (KISSI; TORDO; BOURHY, 1995; BOURHY et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007), o que torna o desenho dos *primers* mais eficiente.

Esta mesma eficiência aqui encontrada concorda com a apresentada em outras investigações onde os mesmos conjuntos de *primers* foram utilizados, tanto para linhagens de RABV de carnívoros, como para as de quirópteros e herbívoros (SATO et al., 2004; BOURHY et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007; CARNIELI JR. et al., 2008, 2009a, b).

Mesmo sendo reconhecida a eficiência da técnica de PCR para o diagnóstico de raiva por sua elevada sensibilidade analítica (BORDIGNON et al., 2005), há casos em que ocorrem resultados falso-negativos quando o teste é realizado diretamente em amostras clínicas sem o prévio isolamento viral, e mesmo naqueles onde o isolamento foi realizado, tanto em função de variações de sequências-alvo para determinados conjuntos de *primers* e certas linhagens de RABV, quanto por eventuais baixos títulos virais.

Deve-se, ainda, levar em consideração a possibilidade da presença de altos títulos virais, sobretudo nas amostras de *Artibeus* spp., as quais se encontravam isoladas em SNC de camundongos, todas em primeira passagem, o que poderia inibir as reações de transcrição reversa e também de amplificação pela DNA polimerase (WARRELL; WARRELL, 2004).

Quanto à eficiência da técnica de sequenciamento de DNA dos 138 produtos de PCR (69 para o gene *P* e 69 para o gene de *L*), nota-se no item Resultados que a mesma foi de 100%, uma vez que sequências viáveis foram obtidas. Ainda, os métodos criteriosos de edição de sequências utilizados, incluindo a análise de probabilidade de erro para cada base obtida com o aplicativo *Phred*, permitiu que sequências acuradas fossem geradas. Com isto, foram obtidas as 69 sequências para os genes *P* e *L* para os isolados de RABV incluídos desde o início da investigação.

Ao se realizarem as análises filogenéticas dos nucleotídeos para o gene *P*, as sequências segregaram em dois distintos grupos, denominados de grupos AgV2 e AgV3 (Figura 2, item 4.3.1).

Esses resultados mostraram-se como esperado, concordando com outras pesquisas já realizadas (CARNIELI JR. et al. 2009a; FAHL et al., 2012; CARNIELI JR. et al. 2012). A heterogeneidade de isolados de RABV expressada genealogicamente sob a forma de grupos específicos a certos tipos de mamíferos é um episódio detectado entre distintos hospedeiros (DIAZ et al., 1994; DE MATTOS et al., 1996, 2000; ITO et al., 2001; FAVORETTO et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2005, 2007; CARNIELI JR. et al., 2008).

Na árvore gerada para o gene *L*, quando analisado o grupo AgV3, foram encontrados quatro grupos, sendo dois para bovinos e dois para morcegos do gênero *Artibeus*. Esse rearranjo filogenético de dois agrupamentos de morcegos do gênero *Artibeus*, e dois de bovinos, do mesmo modo já descrito para isolados pertencentes à variante antigênica 3 em *Desmodus rotundus* (CARNIELI JR. et al., 2009b), pode, por sua vez, significar linhagens regionais de RABV neste gênero de morcegos (FAHL et al., 2012).

Foram analisados, também, o período de incubação do vírus, a letalidade e a titulação viral em cultivo celular como caracteres fenotípicos para busca por marcadores moleculares.

Entretanto, como visto nas árvores filogenéticas (Figuras 2 e 3), não foram encontrados agrupamentos de linhagens em relação a estas variáveis, pois não houve, dentre os agrupamentos obtidos, clara distinção entre valores mais altos e os mais baixos.

Alguns autores, em experimento *in vitro*, afirmaram que com modificações em uma determinada região do gene P, crítica na replicação viral, fizeram com que o crescimento dos vírus, em camundongos inoculados, fosse atenuado, cessando a produção de sintomas neurológicos (WILTZER et al., 2014). Essas informações reforçam que a fosfoproteína P é multifuncional e têm papel essencial no genoma na replicação viral, bem como, interagindo com o sistema de defesa imunológica e como co-fator na transcrição dos genes, estabilizando L e posicionando o complexo polimerase (ASSENBERG et al., 2010).

Uma possível hipótese que pode ser considerada, com os resultados aqui obtidos, é a de que as regiões gênicas que foram alvo do presente estudo de fato não modulam a virulência e a distribuição do RABV e que estas características possam de fato ser moduladas por outros genes ou mesmo por outras regiões dos genes P e L.

Para uma melhor avaliação destes resultados, poder-se-iam analisar outras regiões dos genes estudados. A polimerase L é a mais abundante das proteínas existentes no vírus da raiva (BANERJEE; BARIK, 1992). A região aqui analisada possui apenas 444pb, sendo uma região bem conservada (BANERJEE; CHATTOPADHYAY, 1990; CARNIELI JR., 2012).

Outra forma de melhorar a avaliação da titulação viral seria com a utilização da técnica de RT-PCR em tempo real, visto que a titulação por cultivo celular pode sofrer variações inerentes a sensibilidade das linhagens celulares às linhagens de RABV e mesmo em relação a adaptação/seleção destas a tais linhagens celulares, visto que se encontravam inicialmente isoladas em camundongos.

A técnica de RT-PCR em tempo real é extremamente útil em estudos de vírus RNA. Além de permitir a amplificação e a detecção de produtos da PCR, possibilita uma quantificação de sequências de ácidos nucleicos. Sendo assim, é possível realizar uma análise quantitativa e qualitativa concomitantemente (HODINKA, 1998; NIESTERS, 2004). Estudos do vírus da raiva e de outras lissavíroses utilizando a RT-PCR em tempo real como um método de detecção e quantificação têm sido realizados (NADIN-DAVIS; SHEEN; WANDELER, 2009; SCHEFFER, 2011;

WACHARAPLUESADEE et al., 2011). A RT-PCR em tempo real quantitativa permite uma quantificação acurada da carga viral, sendo que esses dados podem ser utilizados em estudos relacionados à patogenicidade e proliferação do vírus da raiva (SILVA et al., 2013).

Deve-se considerar, ainda, que as amostras originais enviadas para pesquisa de RABV e que serviram para as inoculações em camundongos podem ter sofrido de desnaturação em função de condições de transporte e/ou armazenamento, que podem ter diminuído os títulos virais, mas não interferido com a diversidade gênica das respectivas linhagens, perdendo-se a relação genótipo/fenótipo.

Além disso, os próprios camundongos utilizados para a inoculação em primeira passagem podem ter causado um viés em relação aos títulos virais, períodos de incubação e letalidade, pois se tratavam de camundongos não-isogênicos, o que pode ter levado a não-homogeneidade da relação vírus-hospedeiro que garantisse resultados acurados.

Os camundongos da linhagem *Swiss Webster*, utilizados neste estudo, são animais heterogênicos, que tem como característica elevada taxa de heterozigose (99%), ou seja, animais de uma mesma colônia apresentam uma grande diversidade genética (SANTOS, 2002), sendo que esses animais apresentam respostas variadas a determinado estímulo, como ocorre nas populações.

Uma maneira de se evitar este viés seria a utilização de animais isogênicos, os quais apresentam elevado índice de homozigose (99%). Desta forma, são considerados idênticos geneticamente (SANTOS, 2002), apresentando uma resposta semelhante ao estímulo.

Os achados neste projeto apontam para a necessidade de estudos mais abrangentes, com maior número de isolados dos diferentes hospedeiros (*D. rotundus* e *Artibeus* spp.) de mesma localidade e de forma concomitante.

Também, o sequenciamento do genoma completo de alguns isolados incluídos neste estudo seria de grande valia para um melhor entendimento das relações entre filogenia e as variáveis como período de incubação, letalidade e titulação viral em cultivo celular.

Estudar a relação entre polimorfismos em sequências de DNA/RNA ou de aminoácidos e sua relação com neuroinvasividade e virulência em RABV é ainda uma das principais áreas pouco exploradas em raiva, como demonstrado por

recentes publicações (YAMADA; NOGUCHI; NISHIZONO, 2013; YAMAOKA et al., 2013).

Os resultados e discussões aqui expostos, ao mesmo tempo em que indicam a ausência de marcadores preditivos de patogenia e virulência em RABV entre as sequências, amostras virais e áreas gênicas utilizadas, instigam a curiosidade sobre o tema e mantêm a ímpeto de pesquisas continuadas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente pesquisa e embasados pela literatura consultada permitiram chegar às conclusões que se seguem:

- Não há, nas regiões gênicas dos genes L e P de RABV aqui estudadas, marcadores ou polimorfismos que expliquem variações de períodos de incubação e letalidade entre amostras pertencentes às variantes antigênicas 2 e 3.
- Para estas mesmas regiões gênicas, não há relação entre títulos virais de amostras de RABV pertencentes às variantes antigênicas 2 e 3 e polimorfismos nucleotídicos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 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. v. 2, 425 p.
- ALBAS, A.; SOUZA, E. A.; LOURENÇO, R. A.; FAVORETTO, S. R.; SODRÉ, M. M. Antigen profile of rabies virus isolated from different species of non-hematophagous bats in the region of Presidente Prudente, State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 15-17, 2009.
- ANDRADE, A. M.; QUEIROZ, L. H.; PERRI, S. H.; NUNES, C. M. A descriptive profile of the canine population in Araçatuba, São Paulo State, Brazil, from 1994 to 2004. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 927-932, 2008.
- ASSENBERG, R.; DELMAS, O.; REN, J.; VIDALAIN P. O.; VERMA, A.; LARROUS, F.; GRAHAM, S. C.; TANGY, F.; GRIMES, J. M.; BOURHY, H. Structure of the nucleoprotein binding domain of Mokola virus phosphoprotein. **Journal of virology**, v. 84, n. 2, p.1089-1096, 2010.
- AWASTHI, M.; PARMAR, H.; PATANKAR, T.; CASTILLO, M. Imaging findings in rabies encephalitis. **AJNR - American Journal of Neuroradiology**, v. 22, n. 4, p. 677-680, 2001.
- BANERJEE, A. K.; BARIK, S. Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. **Virology**, v. 188, p. 417-428, 1992.
- BANERJEE, A. K.; CHATTOPADHYAY, D. Structure and function of the RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. **Advances in Virus Research**, v. 38, p. 99-124, 1990.
- BARBOSA, T. F.; MEDEIROS, D. B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; CASSEB, L. M.; MEDEIROS, R.; PEREIRA, A. S.; VALLINOTO, A. C.; VALLINOTO, M.; BEGOT, A. L.; LIMA, R. J.; VASCONCELOS, P. F.; NUNES, M. R. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. **Virology**, v. 370, n. 2, p. 228-236, 2008.
- BARIK, S.; RUD, E. W.; LUK, D.; BANERJEE, A. K.; KANG, C. Y. Nucleotide sequence analysis of the L gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype): identification of conserved domains in L proteins of nonsegmented negative-strand RNA viruses. **Virology**, v. 175, n. 1, p. 332-337, 1990.
- BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Rocca, 1999, cap. 10, p. 168-178.
- BORDIGNON, J.; BRASIL-DOS-ANJOS, G.; BUENO, C. R.; SALVATIÉRA-OPORTO, J.; DÁVILA, A. M.; GRISARD, E. C.; ZANETTI, C. R. Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and

sequencing of the nucleoprotein gene. **Archives of Virology**, v. 150, n. 4, p. 695-708, 2005.

BOURHY, H.; COWLEY, J. A.; LARROUS, F.; HOLMES, E. C.; WALKER, P. J. Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene. **The Journal of general virology**, v. 86, p. 2849-58, 2005.

BRASS, D. A. **Rabies in bats. Natural history and public health implications.** Connecticut: Livia Press, 1994. 335 p.

CAPORALE, G. M. M.; SILVA, A. C. R.; PEIXOTO, Z. M. P.; CHAVES, L. B.; CARRIERI, M. L.; VASSÃO, R. C. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, n. 1, p. 7-13, 2009.

CARNIELI JR., P.; BRANDÃO, P. E.; CASTILHO, J. G.; BUENO, C. R.; CARRIERI, M. L.; MACEDO, C. I.; OLIVEIRA, R. N.; ZANETTI, C. R.; KOTAIT, I. Phylogeny of a rabies virus identified in a cat closely related to vampire bat rabies based on the nucleoprotein gene. **Virus Reviews and Research**, v. 10, n. 1, p. 50-55, 2005.

CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W. O.; VÉRAS, N. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Molecular characterization of rabies virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 141, n. 1, p. 81-89, 2009a.

CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W. O.; VÉRAS, N. M.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Genetic characterization of rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. **Virus Research**, v. 144, n.1/2, p. 215-224, 2009b.

CARNIELI JR., P.; FAHL, W. O.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; DURYSANOVA, E.; JORGE, R. S. P.; MORATO, R. G.; SPÍNDOLA, R. O.; MACHADO, L. M.; ÚNGAR DE SÁ, J. E.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 131, p. 33-46, 2008.

CARNIELI JR., P.; OLIVEIRA, R. N.; FAHL, W. O.; BATISTA, H. B. C. R.; SCHEFFER, K. C.; IAMAMOTO, K.; CASTILHO, J.G. Phylogenetic analysis of partial RNA-polymerase blocks II and III of Rabies virus isolated from the main rabies reservoirs in Brazil. **Virus Genes**, v. 45, p. 76-86, 2012.

CARNIELI JR., P. **Produção de sondas genéticas não-radioativas para o diagnóstico do vírus rábico pela técnica de RT-PCR e imunoquimioluminescência.** 1999. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Archives Virology**, v. 155, 2010, p. 133-146.

CASTILHO, J. G.; IAMAMOTO, K.; LIMA, J. Y. O.; SCHEFFER, K. C.; CARNIELI JR., P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; ACHKAR, S. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 47, p. 12-18, 2007.

CEBALLOS, N. A.; MORÓN, S. V.; BERCIANO, J. M.; NICOLÁS, O.; LÓPEZ, C. A.; JUSTE, J.; NEVADO, C. R.; SETIÉN, A. A.; ECHEVARRÍA, J. E. Emerg. Novel Lyssavirus in Bat, **Spanish Infects Disease**, v. 19, n. 5, p. 793–795, 2013.

CHILDS, J. E.; REAL, L. A. Epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 123-199.

CHOPRA, J. S.; BANERJEE, A. K.; MURTHY, J. M. K.; PAL, S. R. Paralytic rabies: a clinico-pathologic study. **Brain**, v. 103, p. 789-802, 1980.

CONSTANTINE, D. G. Health precautions for bat researchers. In: KUNZ, T. H. **Ecological and behavioral methods for the study of bats**. Washington: Smithsonian Inst. Press, 1988. p. 491-528.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1992, p. 477-483.

CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; NASSAR, A. F. C.; SODRÉ, M.; AMARAL, L. V. F. Isolamento do vírus da raiva em *Artibeus fimbriatus* no estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 4, p. 683-684, 2005.

DA ROSA, E. S.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B.; SOUSA, R. C.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1197-1202, 2006.

DA SILVA, L. H.; BISSOTO, C. E.; DELBEM, A. C.; FERRARI, C. I.; PERRI, S. H.; NUNES, C. M. Canine rabies epidemiology in Araçatuba and neighborhood, Northwestern São Paulo State-Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 139-142, 2004.

DE MATTOS, C. A.; DE MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **FIELDS Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1245-1278.

DE MATTOS, C. A.; DE MATTOS, C. C.; SMITH, J. S.; MILLER, E. T.; PAPO, S.; UTRERA, A.; OSBURN, B. I. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1553-1558, 1996.

DE MATTOS, C. A.; FAVI, M.; YUNG, V.; PAVLETIC, C.; DE MATTOS, C. C. Bat rabies in urban centers in Chile. **Journal of Wild Diseases**, v. 36, n. 2, p. 231-240, 2000.

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

DELARUE, M.; POCH, O.; TORDO, N.; MORAS, D.; ARGOS, P. An attempt to unify the structure of polymerases. **Protein engineering**, v. 3, n. 6, p. 461-467, 1990.

DELPIETRO, H. A.; GURY-DHOMEN, F.; LARGHI, O. P.; MENA-SEGURA, C.; ABRAMO, L. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihl B. Journal of Veterinary medicine**, v. 44, n. 8, p. 477-483, 1997.

DIAZ, A. M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic Analysis of rabies virus isolates from Latin America and the Caribbean. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 41, n. 3, p. 153-160, 1994.

ERTL, H. C.; DIETZSCHOLD, B.; GORE, M.; OTVOS JR., L.; LARSON, J. K.; WUNNER, W. H.; KOPROWSKI, H. Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. **Journal of Virology**, v. 63, n. 7, p. 2885-2892, 1989.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

FAHL, W.O; IAMAMOTO, K.; MORI, E.; ASANO, K.M.; ACHKAR, S.M.; CARNIELI JR., P.; SCHEFFER, K.C. **The Role of Bats in Lyssavirus Epidemiology**. In: GEYER, G.A. (Ed.). *Bats: Phylogeny and Evolutionary Insights, Conservation Strategies and Role in Disease Transmission*. Nova Science Publishers, 2013. Cap. 1, p. 01 - 37.

FAHL, W. O.; CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J. G.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I.; IAMAMOTO, K.; OLIVEIRA, R. N.; BRANDÃO, P. E. *Desmodus rotundus* and *Artibeus* spp. bats might present distinct rabies virus lineages. **Brazilian Journal of Infects Disease**, v. 16, n. 6, p. 545-551, 2012.

FAVI, M.; NINA, A.; YUNG, V.; FERNÁNDEZ, J. Characterization of rabies virus isolates in Bolivia. **Virus Research**, v. 97, n. 2, p. 135-140, 2003.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; CUNHA, E. M. S.; AGUIAR, A. C.; SILVA, L. H. Q.; SODRÉ, M. M.; SOUZA, M. C. A. M.; KOTAIT, I. Antigenic typing of brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91-95, 2002.

FEKADU, M.; GREER, P. W.; CHANDLER, F. W.; SANDERLIN, D. W. Use of the avidin-biotin peroxidase system to detect rabies antigen in formalin-fixed paraffinembedded tissues. **Journal of Virological Methods**, v. 19, n. 2, p. 91-96, 1988.

FENNER, R.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Virologia veterinária**. Zaragoza: Acribia, 1992. p. 551-556.

FREULING, C. M.; BEER, M.; CONRATHS, F. J.; FINKE, S.; HOFFMANN, B.; KELLER, B.; KLIEMT, J.; METTENLEITER, T. C.; MÜHLBACH, E.; TEIFKE, J. P.; WOHLSEIN, P.; MÜLLER, T. Novel lyssavirus in Natterer's bat, Germany. **Emerging Infectious Disease**, v. 17, n. 8, p. 1519-1522, 2011.

FU, Z. F.; ZHENG, Y.; WUNNER, W. H.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Both the N- and the C-terminal domains of the nominal phosphoprotein of rabies virus are involved in binding to the nucleoprotein. **Virology**, v. 200, n. 2, p. 590-597, 1994.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W.; TUFFEREAU, C.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 627-632, 1992.

GERARD, F. C.; RIBEIRO JR, E. D.; LEYRAT, C.; IVANOV, I.; BLONDEL, D.; LONGHI, S.; RUIGROK, R. W.; JAMIN, M. Modular Organization of Rabies Virus Phosphoprotein. **Journal of Molecular Biology**, v. 388, n. 5, p. 978-996, 2009.

GIGANT, B.; ISENI, F.; GAUDIN, Y.; KNOSSOW, M.; BLONDEL, D. Neither phosphorylation nor the amino-terminal part of rabies virus phosphoprotein is required for its oligomerization. **Journal of Genetic Virology**, v. 81, p. 1757-1761, 2000.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HODINKA, R. L. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 10, n. 1, p. 25-47, 1998.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus Taxonomy**: the classification and nomenclature of viruses: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2005. p. 630-634.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus Taxonomy: 2012 Release**. USA: ICTV. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

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

JACKSON, A. C. Rabies. **Neurologic Clinics**, v. 26, 717-726, 2008.

JACKSON, A. Pathogenesis. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 246-282.

JACOB, Y.; BADRANE, H.; CECCALDI, P. E.; TORDO, N. Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, p. 10217-10222, 2000.

KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMOKE, R.; TIRAWATNPONG, S.; PANPANICH, T.; HEMACHUDHA, T. Diagnosis of Rabies by polymerase chain reaction with nested *primers*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 207-210, 1993.

KAPLAN, G.; TURNER, G. S.; WARREL, D. **Rabies: the facts**. 2nd ed. Oxford; New York: Oxford University Press, 1986. p. 8-74. (Oxford Medical Publications).

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: WHO, 1996.

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

KOBAYASHI, Y.; OKUDA, H.; NAKAMURA, K.; SATO, G.; ITOU, T.; CARVALHO, A. A. B.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; F. H.; SAKAI, T. Genetic Analysis of Phosphoprotein and Matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v. 69, n. 11, p. 1145–1154, 2007.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E. M.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.

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

KREBS, J. W.; WHEELING, J. T.; CHILDS, J. E. Rabies surveillance in the United States during 2002. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 223, n. 12, p. 1736-1748, 2003.

KREBS, J. W.; WILLIAMS, S. M.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E.; CHILDS, J. E. Rabies among infrequently reported mammalian carnivores in the United States, 1960-2000. **Journal of Wild Diseases**, v. 39, n. 2, p. 253-261, 2003.

KUCERA, P.; DOLIVO, M.; COULON, P.; FLAMAND, A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. **Journal of Virology**, v. 55, n. 1, 1985, p. 158-162.

LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G.H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 8, n. 215, p. 182-184, 1982.

LEWIS, P.; FU, Y.; LENTZ, T. L. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve–muscle cocultures. **Muscle & Nerve**, v. 23, n. 5, p. 720–730, 2000.

MADORE, H. P.; ENGLAND, J. M. Rabies virus protein synthesis in infected BHK-21 cells. **Journal of Virology**, v. 22, n. 1, p. 102-112, 1977.

MARSTON, D. A.; HORTON, D. L.; NGELEJA, C.; HAMPSON, K.; MCELHINNEY, L. M.; BANYARD, A. C.; HAYDON, D.; CLEAVELAND, S.; RUPPRECHT, C. E.; BIGAMBO, M.; FOOKS, A. R.; LEMBO, T. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. **Emerging Infects Disease**, v. 18, n. 4, p. 664-667, 2012.

MAVRAKIS, M.; ISENI, F.; MAZZA, C.; SCHOEHN, G.; EBEL, C.; GENTZEL, M.; FRANZ, T.; RUIGROK, R. W. Isolation and characterization of the rabies virus N-P complex produced in insect cells. **Virology**, v. 305, n. 2, p. 406-144, 2003.

MAVRAKIS, M.; MCCARTHY, A. A.; ROCHE, S.; BLONDEL, D.; RUIGROK, R. W. Structure and function of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus. **Journal of molecular biology**, v. 343, n. 4, p. 819-831, 2004.

MAYO, M. A.; PRINGLE, C. R. Virus taxonomy. **Journal of Genetic Virology**, v. 79, p. 649-657, 1997.

MAYR, A.; GUERREIRO, M. G. **Vírus da raiva**. In: *Virologia Veterinária*. 2. Ed. Porto Alegre: Sulina, 1972, 473p.

MCELHINNEY, L. M.; FOOKS, A. R.; RADFORD, A. D. Diagnostic tools for the detection of rabies virus. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v. 18, n. 3, p. 224-231, 2008.

MEBATION, T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p. 11496-11502, 2001.

MURPHY, F. A. **The pathogenesis of rabies virus infection**. In: PLOTKIN, S. A.; KOPROWSKI, H. eds. *Worlds debt to Pasteur*. New York: ALAN LISS, 1985. p. 153-169.

NADIN-DAVIS S. A.; SHEEN, M.; WANDELER, A. I. Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1484-97, 2009.

NEL, L. H. Mokola Virus: A brief review of the status quo. Sixth SEARG meeting, Lilongwe/Malawi: **Bat rabies**, 2001. p.80-86. Disponível em: <<http://searg.info/fichiers/articles/2001080086L.PDF>>. Acesso em: 27 jan 2014.

NIESTERS H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n.1, p. 5–11, 2004.

NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C. E. Animal rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. Academic Press: San Diego, 2002. p. 163-218.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON J. L. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals**. 2 ed. n. 6. Arlington: Occasional Papers in Conservation Biology, Conservation International, 2012. 76 p.

PASSOS, E. C.; CARRIERI, M. L.; SILVA, M. M. S.; PEREIRA, R. G.; MELO, J. A. T. S.; MAULE, L. J. Vírus rábico isolado de morcego frugívoro (*Artibeus lituratus*), capturado em 1997 no município de Rio Claro, SP. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 1, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000100007>. Acesso em: 25 jan 2012.

POCH, O.; BLUMBERG, B. M.; BOUGUELERET, L.; TORDO, N. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. **Journal of Genetic Virology**, v. 71, p. 1153-1162, 1990.

POCH, O.; SAUVAGET, I.; DELARUE, M.; TORDO, N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. **The EMBO Journal**, v.8, n. 12, p. 3867-3874, 1989.

QANUNGO, K. R.; SHAJI, D.; MATHUR, M.; BANERJEE, A. K. Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5952-5957, 2004.

QUEIROZ, L. H.; DE CARVALHO, C.; BUSO, D. S.; FERRARI, C. I.; PEDRO, W. A. Epidemiological profile of rabies in the northwestern region of São Paulo State, from 1993 to 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 09-14, 2009.

RAUX, H.; FLAMAND, A.; BLONDEL, D. Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, p. 10212-10216, 2000.

ROMIJN, P. C.; HEIDI, R. V. D.; CATTANEO, C. A. M.; SILVA, R. C. F.; POEL, W. H. M. V. D. Study of Lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 81-86, 2003.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 327-343, 2002.

- SÁNCHEZ, A.; DE, B. P.; BANERJEE, A. K. In vitro phosphorylation of NS protein by the L protein of vesicular stomatitis virus. **Journal of Genetic Virology**, n. 66, p. 1025-1036, 1985.
- SANTOS, B. F. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao *Status* Genético. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 75-70, 2002.
- SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S. M.; CARVALHO, A. 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. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.
- SCAGLIARINI A.; BATTILANI, M.; CIULLI, S.; PROSPERI, S.; MORGANTI, L. Molecular analysis of the NP gene of Italian CDV isolates. **Veterinary Research Common**, v. 27, p. 355-357, 2003. Supplement 1.
- SCATTERDAY, J. E.; GALTON, M. M. Bat rabies in Florida. **Veterinary Medicine**, v. 49, p. 133-135, 1954.
- SCHEFFER, K. C. **Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, Hemi-Nested RT-PCR e Real Time RT-PCR**. 2011. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- SCHEFFER, K. C.; CARRIERI, M. L.; ALBAS, A.; SANTOS, H. C. P.; KOTAIT I.; ITO, F. H. Rabies virus 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, M. C. **Estudo de avaliação sobre área de risco para a raiva no Brasil**. 1990. 229 f. Tese (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública; Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1990.
- SCHNEIDER, M. C.; ROMIJN, P. C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; DA SILVA, D. F.; BELOTTO, A.; DA SILVA, J. B.; LEANES, L. F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? **Revista Panamericana de la Salud Publica**, v. 25, n. 3, p. 260-269, 2009.
- SCHNELL, M. J.; CONZELMANN, K. K. Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. **Virology**, v. 214, n. 2, p. 522-530, 1995.
- SHUANGSHOTI, S.; THEPA, N.; PHUKPATTARANONT, P.; JITTMITTRAPHAP, A.; INTARUT, N.; TEPsumETHANON, V.; WACHARAPLUESADEE, S.; THORNER, P. S.; HEMACHUDHA, T. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 9, p. 31, 2013.
- SILVA, S. R.; KATZ, I. S.; MORI, E.; CARNIELI JR., P.; VIEIRA, L. F.; BATISTA, H. B.; CHAVES, L. B.; SCHEFFER, K. C. Biotechnology advances: a perspective on the diagnosis and research of Rabies Virus. **Biologicals**, v. 41, n. 4, p. 217-23, 2013.

SMITH, J. S.; ORCIARI, L. A.; YAGER, P. A. Molecular epidemiology of rabies in the United States. **Seminars in Virology**, v. 6, p. 387-400, 1995.

TIRAWATNPONG, S.; HEMACHUDHA, T.; MANUTSATHIT, S.; SHUANGSHOTI, S.; PHANTHUMCHINDA, K.; PHANUPHAK, P. Regional distribution of rabies viral antigen in central nervous system of human encephalitic and paralytic rabies. **Journal of the neurological sciences**. v. 92, n. 1, p. 91-99, 1989.

TORDO, N. Characterization and molecular biology of rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneva: WHO, 1996, p. 28-51.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. **Nucleic Acid Research**, v. 14, p. 2671-2683, 1986a.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-stand RNA-viruses. **Virology**, v. 165, p. 565-576, 1988.

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

TSIANG, H.; CECCALDI, P. E.; LYCKE, E. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1191-1194, 1991.

UIEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOMES, L. H.; SILVA, M. M. S. Espécies de quirópteros diagnosticados com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**, v. 1, p. 17-35, 1996.

VEERARAGHAVAN, N. Phenolized vaccine treatment of people exposed to rabies in Southern India. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 10, n. 5, p. 789-796, 1954.

VELASCO-VILLA, A.; GÓMEZ-SIERRA, M.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, G.; JUÁREZ-ISLAS, V.; MELÉNDEZ-FÉLIX, A.; VARGAS-PINO, F.; VELÁZQUEZ-MONROY, O.; FLISSER, A. Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 951-958, 2002.

VELASCO-VILLA, A.; ORCIARI, L. A.; JUAREZ-ISLAS, V.; GOMEZ-SIERRA, M.; PADILLA-MEDINA, I.; FLISSER, A.; SOUZA, V.; CASTILLO, A.; FRANKA, R.; ESCALANTE-MANE, M.; SAURI-GONZALEZ, I.; RUPPRECHT, C. E. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1697-1710, 2006.

WACHARAPLUESADEE, S.; PHUMESIN, P.; SUPAVONWONG, P.; KHAWPLOD, P.; INTARUT, N.; HEMACHUDHA, T. J.; Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. **Virological Methods**, v.175, p. 278-82, 2011.

WADA, M. Y.; ROCHA, S. M.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 509-518, 2011.

WARRELL, M. J.; WARRELL, D. A. Rabies and other lyssavirus disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 363, p. 959-969, 2004.

WILTZER, L.; OKADA, K.; YAMAOKA, S.; LARROUS, F.; KUUSISTO, H. V.; SUGIYAMA, M.; BLONDEL, D.; BOURHY, H.; JANS, D. A.; ITO, N.; MOSELEY, G. W. Interaction of Rabies virus P-protein with Stat proteins is critical to lethal rabies disease. **Journal of Infectious Disease**, v. 829, 2014. Disponível em:< <http://www.jid.oxfordjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=24367042>>. Acesso em: 24 jan 2014.

WINKLER, W. G. Airbone rabies. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 2, p. 115-121.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Expert consultation on rabies: first report**. Geneva: World Health Organization, 2005. 88 p. (WHO Technical Series, 931).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World survey of Rabies: n. 34 For the Year 1998**. Geneva: WHO, 2000. 31 p.

WU, X.; FRANKA, R.; VELASCO-VILLA, A.; RUPPRECHT, C. E. Are all lyssavirus genes equal for phylogenetic analyses? **Virus Research**, v. 129, n. 2, p. 91-103, 2007.

WUNNER, H. W. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, H. W. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 23-68.

WUNNER, H. W. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, H. W. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 93-111.

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 31-67.

YAMADA K, NOGUCHI K, NISHIZONO A. Characterization of street rabies virus variants with an additional N-glycan at position 247 in the glycoprotein. **Archives of virology**, 2013. Disponível em:< <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1805-5>>. Acesso em: 06 jan 2014.

YAMAOKA, S.; ITO, N.; OHKA, S.; KANEDA, S.; NAKAMURA, H.; AGARI, T.; MASATANI, T.; NAKAGAWA, K.; OKADA, K.; OKADERA, K.; MITAKE, H.; FUJII, T.;

SUGIYAMA, M. Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness. **Journal of Virology**, v. 87, n. 22, p. 12327-12338, 2013.