

HAILA CHAGAS PEIXOTO

**Epidemiologia molecular de vírus da raiva isolados de
herbívoros e suínos procedentes da Amazônia Brasileira**

**São Paulo
2012**

HAILA CHAGAS PEIXOTO

**Epidemiologia molecular de vírus da raiva isolados de
herbívoros e suínos procedentes da Amazônia Brasileira**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo
2012

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.2610
FMVZ

Peixoto, Haila Chagas

Epidemiologia molecular de vírus da raiva isolados de herbívoros e suínos procedentes da Amazônia Brasileira / Haila Chagas Peixoto. -- 2012.
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Vírus da raiva. 2. Epidemiologia molecular. 3. Herbívoros. 4. Suínos.
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 "Epidemiologia molecular de vírus da raiva isolados de herbívoros e suínos procedentes da Amazônia Brasileira", utilizando 50 amostras de vírus da raiva isolados das espécies bovinas, suínas e equinas, protocolado sob o nº 1918/2010, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, 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 07/04/2010.

We certify that the Research "Molecular epidemiology of rabies virus isolated from herbivores and pigs coming from the Brazilian Amazon", protocol number 1918/2010, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, 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 04/07/2010.

São Paulo, 08 de abril de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PEIXOTO, Haila Chagas

Título: Epidemiologia molecular de vírus da raiva isolados de herbívoros e suínos procedentes da Amazônia Brasileira

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À minha mãe Conceição chagas pelo
afago e suporte ao longo desse período de desenvolvimento
dessa dissertação.

A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve
fazer do seu próprio conhecimento.
Platão

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer nos momentos difíceis.

A minha família Camilla Oliveira, Ray Chagas, José Alberto, Jéssica Beatriz, Daniel Lima, por todo incentivo doado.

Em especial a minha mãe por toda força doada e sempre acreditar que eu iria conseguir.

A minha tia Dra. Ray Chagas, pelo incentivo e auxílio no período que morei em São Paulo.

Aos meus avôs Maria Celeste e João Chagas (in memoriam) por tudo que me ensinaram durante a minha adolescência, o qual fez ser quem eu sou hoje.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo José Richzenhain por acreditar que eu seria capaz de desenvolver essa dissertação e por confiar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão pelo esclarecimento de inúmeras dúvidas surgidas ao longo da elaboração dessa dissertação.

Ao coordenador do Lanagro Francisco Airton Nogueira e aos funcionários da Virologia (Raiva) Ofir de Sales Ramos e Lucila Pereira da Silva pelo apoio e auxílio, os quais foram fundamentais para a plena realização deste trabalho.

A técnica do Laboratório Sheila Oliveira pela amizade e compreensão.

A minha amiga de laboratório MsC. Andrea Isabel Estevez Garcia pela imensa ajuda, pelos conselhos, incentivo. Com ela aprendi que a dissertação são males profundos e desconhecidos e que escrever é uma aventura.

As pós-graduandas do LABMAS, Bianca Santos, Bruna Barbosa, Carolina Torres, Camila Oliveira, Cíntia Baldin, Cíntia Favero, Giselle Ayres, Juliana Martins, Karen Ferrari, Laila Andréia, Sueli Santos, pelos inúmeros momentos de alegrias e descontração.

Aos meus amigos da república Caio Souza, Gabriel Verlangieri, Mateus Leandro, Natália Cleves, Nayara Abreu, Neto Alcides, Tatiana Pérez, por fazerem parte da minha família durante o período que morei em São Paulo.

Ao meu namorado e amigo Hadir Castro por todo companheirismo e amor, apesar de toda distância sempre conseguiu está presente.

As minhas amigas Érica Monteiro e Cristiane Santos pelas longas conversas, conselhos e risos.

RESUMO

PEIXOTO, H. C. Epidemiologia molecular de vírus da raiva isolados de herbívoros e suínos procedente da Amazônia Brasileira. [Molecular epidemiology of rabies virus isolated herbivorous and swine from Brazilian Amazon]. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A raiva é uma antroponose com alta letalidade, acomete todos os animais de sangue quente, essa doença causa enormes prejuízos econômicos ao rebanho pecuário nacional, é impossível estimar os custos reais com controle dessa doença, em decorrência do grande número de subnotificações. O uso de ferramentas moleculares permite identificar as linhagens virais circulantes, facilitando desse modo à compreensão da epidemiologia da raiva. A técnica de RT-PCR para amplificação parcial dos genes N e G, foi aplicada em 60 amostras positivas para o vírus da raiva pelas provas de imunofluorescência direta e prova biológica, procedentes dos Estados do Pará, Tocantins, Rondônia e Acre das espécies bovina, equídea, bubalina e suína. As sequências nucleotídicas obtidas para os genes N (41 amostras) e G (17 amostras) foram analisadas pelo algoritmo Neighbor-Joining e modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros. Essa análise permitiu identificar distintas linhagens circulantes nas regiões estudadas, foi evidenciado ainda, um padrão de distribuição geográfico dessas linhagens. Além disso, este estudo possibilitou identificar marcadores moleculares para diferentes regiões geográficas, promovendo um melhor entendimento da epidemiologia molecular da raiva das linhagens circulantes da região em estudo.

Palavras-chave: Vírus da raiva. Epidemiologia molecular. Herbívoros. Suínos.

ABSTRACT

PEIXOTO, H. C. Molecular epidemiology of rabies virus isolated herbivorous and swine from Brazilian Amazon. [Epidemiologia molecular de vírus da raiva isolados de herbívoros e suínos procedentes da Amazônia brasileira]. 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Rabies is an anthroponosis with high mortality, affects all warm-blooded animals, this disease causes major economic losses to livestock. It is difficult to estimate the actual costs of disease control, due to sub notification of cases. Molecular techniques allow identification of genetic viral strains circulating, improving rabies epidemiology comprehension. Sixty rabies virus isolates from bovines, equines, swine and buffaloes coming from the states of Pará, Tocantins, Rondônia and Acre were analyzed in the present study. All samples were previously submitted to direct immunofluorescence test and inoculation in mice, afterwards were submitted to RT-PCR for amplification of partial Nucleoprotein and Glycoprotein genes. Nucleotide sequences from nucleoprotein (41 samples) and glycoprotein G (17 samples) genes were analyzed by Neighbor-joining algorithm and Kimura two-parameter model. This analysis allowed to identify different genetic strains circulating and its geographic distribution patterns. Moreover this study revealed molecular markers for different geographic regions, promoting a better understanding of rabies molecular epidemiology of circulating strains of study area.

Keywords: Rabies virus. Molecular epidemiology. Herbivorous. Swine.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do vírus da Raiva seção longitudinal.....	20
Figura 2 -	Esquema do genoma do vírus da raiva. Seguida pelos genes N-P-M-G-L e sequências intergênicas.....	20
Figura 3 -	Ciclo de replicação e replicação do vírus da raiva.....	25
Figura 4 -	Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva.....	27
Figura 5 -	Mapa do Brasil indicando os Estados de origem das amostras utilizadas no presente estudo.....	37
Figura 6 -	Esquema do genoma do vírus da raiva com a localização dos primers utilizados no protocolo de RT-PCR com seus respectivos tamanho dos produtos.....	40
Figura 7 -	Resultados obtidos através da técnica de RT-PCR dos isolados do presente estudo para o gene N.....	45
Figura 8 -	Resultados obtidos através da técnica de RT-PCR dos isolados do presente estudo para o gene G.....	46
Figura 9 -	Árvore filogenética de distância para uma região de alinhamento de 172 nucleotídeos do gene N do vírus da raiva. As amostras integrantes do presente estudo encontram-se sublinhadas identificadas pelo número de registro do LANAGRO, espécie, Estado de origem, ano de isolamento, as amostras extraídas do Genbank estão apresentadas por seus números de acesso.....	53
Figura 10 -	Distribuição geográfica do vírus da raiva dos isolados obtidos do presente estudo as cores denotam os grupos formados no Dendograma com base no sequenciamento parcial do gene N.....	54
Figura 11 -	Árvore filogenética de distância para uma região de alinhamento de 587 nucleotídeos do gene G do vírus da raiva. As amostras integrantes do presente estudo encontram-se sublinhadas identificadas pelo número de registro do LANAGRO, espécie, Estado de origem, ano de isolamento, enquanto que as amostras do Genbank estão apresentadas por seus números de acesso.....	57
Figura 12 -	Distribuição geográfica de vírus da raiva isolados do presente estudo. As cores denotam os grupos formados no Dendograma.....	58
Figura 13 -	Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene da proteína N dos isolados do presente estudo em relação ao vírus fixo PV (M13215).....	62

Figura 14 -	Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene N de todos os isolados utilizados na filogenia com exceção do grupo externo (M13215) e VAg – 2 (<i>Canis familiaris</i>).....	64
Figura 15 -	Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene da proteína G dos isolados do presente estudo em relação ao vírus padrão PV (Genbank accession number : M13215).....	66
Figura 16 -	Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene G de todos os isolados utilizados na filogenia com exceção do grupo externo (EU293119.1) e VAg – 2 (<i>Canis familiaris</i>).....	69

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1 -	Genótipos do gênero <i>Lyssavirus</i>	23
Quadro 2 -	Relação das amostras analisadas no presente estudo, com sua espécie de origem, procedência, ano de isolamento, número de registro interno do LANAGRO e localidade.....	37
Quadro 3 -	Primers utilizados nas provas de RT-PCR e sequenciamento de DNA para os genes G e N.....	40
Quadro 4 -	Resultados obtidos através da técnica de RT-PCR para os genes N e G, para cada amostra, com seus respectivos dados de origem.....	47
Quadro 5 -	Resultado de sequenciamento de DNA para os genes N e G.....	49
Quadro 6 -	Nomenclatura, símbolos e abreviatura de 20 aminoácidos traduzidos a partir do código genético.....	60
Quadro 7 -	Substituição de aminoácidos para a proteína N encontradas nos isolados obtidos no presente estudo em relação ao PV.....	63
Quadro 8 -	Substituição de aminoácidos do gene N de todos os isolados utilizados na filogenia.....	65
Quadro 9 -	Substituição de aminoácidos para a proteína G dos isolados do presente estudo em relação ao PV (Genbank accession number : M13215).....	67
Quadro 10 -	Substituições de aminoácidos do gene G de todos os isolados utilizados na filogenia.....	70

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 -	Identidade de nucleotídeos intragrupo obtidas no presente estudo para o gene N.....	59
Tabela 2 -	Identidade de nucleotídeos intragrupo obtidas no presente estudo para o gene G.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

N	Nucleoproteína do vírus da raiva
G	Glicoproteína do vírus da raiva
a.C.	Antes de Cristo
VR	Vírus da raiva
P	Fosfoproteína do vírus da raiva
M	Proteína Matriz do vírus da raiva
L	Proteína L do vírus da raiva
RNA	Ácido ribonucleico
CDC	Center for disease control and prevention
ICTV	International Committee on taxonomy of viruses
RABV	<i>Rabies Virus</i>
LBV	<i>Lagos Bat</i>
MOKV	<i>Mokola</i>
DUVV	<i>Duvenhage</i>
EBLV-1	<i>European bat lyssavirus - 1</i>
EBLV-2	<i>European bat lyssavirus - 2</i>
ABLV	<i>Australian bat lyssavirus</i>
ARAV	<i>Aravan virus</i>
KHUV	<i>Khujand virus</i>
IRKV	<i>Irkut virus</i>
WCBV	<i>West Caucasian bat virus</i>
PTN	Proteína
IFD	Imunofluorescência direta
PB	Prova biológica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CVS	Challenge Vírus Standard
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	DNA complementar
DEPC	dietil-pirocarbonato
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DTT	Dithiothreitol
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
Min	minuto de hora
mM	Milimolar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Vírus
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
RT	transcrição reversa
U	unidade internacional

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	graus Celsius
+	Positivo
-	Negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	RAIVA: BREVE HISTÓRICO.....	18
1.2	ETIOLOGIA.....	19
1.3	TAXONOMIA DO VÍRUS.....	22
1.4	PATOGENIA DA RAIVA.....	24
1.5	EPIDEMIOLOGIA.....	25
1.5.1	Transmissão	25
1.5.2	Ciclo de transmissão	26
1.5.3	Utilização da biologia molecular para caracterização do vírus da raiva	29
1.6	SINAIS CLÍNICOS.....	29
1.7	DIAGNÓSTICO.....	30
1.8	1.8 PREVENÇÃO E CONTROLE	32
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	VÍRUS DE REFERÊNCIA.....	36
3.2	AMOSTRAS DE CAMPO.....	36
3.3	PROVA DE IMUNOFLORESCÊNCIA DIRETA (IFD) E PROVA BIOLÓGICA.....	38
3.4	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	39
3.5	REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA OS GENES N E G.....	40
3.6	PURIFICAÇÃO.....	41
3.7	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	41
3.8	PRECIPITAÇÃO.....	42
3.9	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE GENEALÓGICA.....	42
3.10	ANÁLISE ESPACIAL.....	43
3.11	CÁLCULO DE IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS.....	43

3.12	ANÁLISE DE MUDANÇAS E INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NAS SEQUÊNCIAS PUTATIVAS DE AMINOÁCIDOS.....	44
4	RESULTADOS	45
4.1	RT-PCR PARA OS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) VIRAIS.....	45
4.2	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	48
4.3	ANÁLISE GENEALÓGICA.....	50
4.3.1	Gene N	50
4.3.2	Gene G	55
4.4	CÁLCULO DE IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS.....	59
4.4.1	Gene N	59
4.4.2	Gene G	59
4.5	ANÁLISE DE MUDANÇAS E MARCADORES MOLECULARES NAS SEQUÊNCIAS PUTATIVAS DE AMINOÁCIDOS	60
4.5.1	Gene N	61
4.5.2	Gene G	65
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 RAIVA: BREVE HISTÓRICO

A raiva é conhecida desde a mais remota antiguidade, foi atribuída, naquela época a fenômenos sobrenaturais (REZENDE et al.,1997; MURPHY et al., 1999; NOVA; RENGELL; HINRICHSEN, 2002). As primeiras referências conhecidas que citam a raiva datam do século X a.C. no código de Eshnunna da Mesopotâmia (NOVA; RENGELL; HINRICHSEN, 2002).

Em 1879, Galtier experimentalmente reproduziu a doença em coelhos e este modelo foi seguido por Pasteur, o qual contribuiu para a investigação durante o final de 1800 (RUPPRECHT ; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

Ao eminente cientista francês Pasteur e seus colaboradores (1881-1884) deve-se a elucidação de muitos pontos acerca da patogenia, ao demonstrarem a presença de inclusões específicas determinadas pelo vírus em células do sistema nervoso central, sua transmissibilidade, presença na saliva de casos raivosos humanos e obtenção do vírus fixo mediante passagens sucessivas pela via intracerebral (REZENDE et al., 1997).

A primeira epizootia de Raiva em herbívoros notificada no Brasil ocorreu em Santa Catarina, entre 1906 a 1908. Foi denominada de Epizootia de Biguaçu, e estudada por Parreiras Horta, médico do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (PARREIRAS ; FIGUEIREDO, 1911).

No entanto, coube a Carini, médico do Instituto Pasteur de São Paulo, identificar o vírus da raiva (VR), determinando o agente causador da epizootia de Biguaçu. Observou ainda, que o número de cães, afetados pela Raiva, era desproporcional ao de bovinos e equinos, e levantou então a hipótese da Raiva ser transmitida por morcegos hematófagos (CARINI, 1911).

Pesquisadores da época classificaram o relato de Carini como uma “fantasia tropical” (BRASIL, 2009).

A hipótese de Carini se confirmou quando Haupt e Rehaag em 1925, veterinários alemães contratados pelo governo catarinense, identificaram o vírus da raiva no cérebro de morcegos hematófagos (HAUPT; REHAAG, 1925).

Muitas contestações se sucederam após o relato de Carini e de Haupt e Rehaag, pois o mundo relutava em aceitar que os morcegos pudessem ser “reservatórios” de vírus da raiva, considerando que naquela época Louis Pasteur afirmava que “para ser raiva, havia a necessidade do envolvimento de um cão raivoso” (BRASIL, 2009).

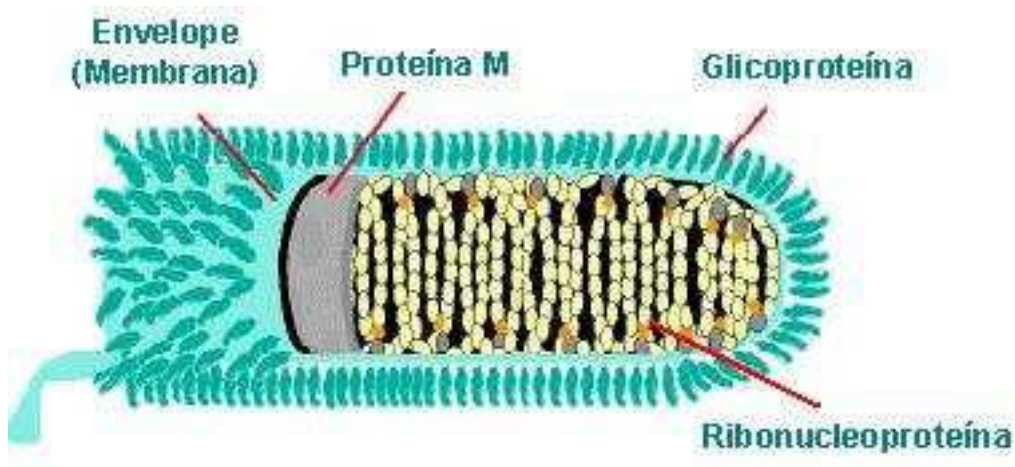
No período entre 1925 e 1929, foi registrada a ocorrência de “botulismo” em bovinos e de “poliomielite ascendente” em seres humanos, na ilha de Trinidad, no Caribe. Dois médicos, Hurst e Pawan, confirmaram que a doença em bovinos e humanos tratava-se de raiva, transmitida por morcegos hematófagos (HURST ; PAWAN; 1931, 1932).

Após os trabalhos de Hurst e Pawan (1931-1932) e outros pesquisadores como Torres e Queiróz Lima (1935), aceitou-se finalmente a idéia de que morcegos hematófagos podiam transmitir raiva aos animais e aos seres humanos (BRASIL, 2009).

1.2 ETIOLOGIA

O vírus da raiva (VR) pertence ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae* (RADOSTITS et al., 2000; ACHA; SZYFRES, 2003; FAUQUET et al., 2005), possui a forma de uma bala de revólver, com 200 nanômetros (nm) de comprimento e 75 nm de diâmetro (RUPPRECHT ; HANLON; HEMACHUDHA, 2002) (Figura 1).

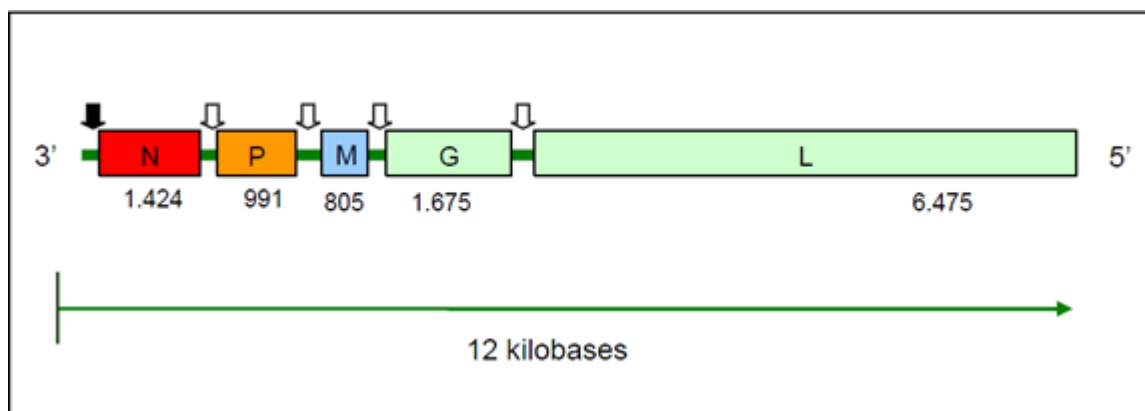
Figura 1 – Esquema do vírus da Raiva secção longitudinal



Fonte: Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the_virus/virus.htm

O genoma do VR consiste de um ácido ribonucléico de fita única, sentido negativo, não segmentado. Esse genoma codifica cinco proteínas virais: Nucleoproteína (N); Fosfoproteína (P); Proteína Matriz (M); Glicoproteína (G); e RNA-Polimerase (L) (MURPHY et al., 1999; FAUQUET et al., 2005; CDC, 2012) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do genoma do vírus da raiva. Sequência líder (Seta preta). Seguida pelos genes N-P-M-G-L (com os referidos comprimentos em kilobases). Sequências intergênicas não codificantes (Setas brancas)



Fonte: (adaptado CDC, 2012)

A molécula da proteína N consiste em dois lóbulos, com o RNA inserido entre os mesmos. Há duas ou mais regiões de contato entre as moléculas da proteína N, que proporcionam estabilidade ao complexo ribonucleocapsídeo (SCHOEHN et al., 2001).

O complexo ribonucleocapsídeo é composto pelo RNA genômico intimamente associada com a proteína N, L polimerase e sua cofator proteína P (anteriormente denominada M1). O referido complexo garante a transcrição e replicação do genoma no citoplasma (WHO, 2004).

A proteína N é a mais conservada entre as proteínas dos lissavírus, está intimamente associada ao RNA viral, protegendo-o da ação das ribonucleases (RODRIGUEZ ET al., 2007).

Ressalta-se que a nucleoproteína é o principal componente do nucleocapsídeo viral, e possui epítomos que atuam na resposta imune celular (MURPHY et al., 1999; BRASIL, 2008).

O gene N vem sendo amplamente utilizado, apesar de ser uma região conservada, quando comparado ao gene G. Em estudos genéticos com gene N ressaltam-se pequenas variações filogenéticas, que permitem identificar diferentes linhagens virais (HEATON et al., 1997).

Tem sido descritos três sítios com atividade biológica: I compreende a posição 358 – 367, e o sitio antigênico III, dividido em duas regiões independentes entre as posições 359 – 366 e 375 – 386. Mediante o emprego de anticorpos monoclonais nos corpúsculos de inclusão virais, tem sido identificado o epítome II, (353 – 373) o qual aparentemente se superpõe ao sitio IV (TORDO, 1996; WUNNER, 2007)

A glicoproteína por sua vez, é responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, e está envolvida no tropismo e patogenicidade do vírus (MURPHY et al., 1999; FAUQUET et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2007; WUNNER, 2007).

A glicoproteína está dividida em três regiões (domínios). O ectodomínio (ED), externo ao vírus e com 439 aminoácidos (1 a 439) da região N-terminal o domínio transmembrana (TM), com 22 aminoácidos (440 a 461) e o endodomínio (EDO) com 44 aminoácidos (462 a 505) da região C-terminal e situado no interior do vírus (WUNNER, 2007).

Na literatura já foram descritos vários sítios com atividade biológica: I, III, VI e “a” compostos pelos aminoácidos nas posições 231, 330 – 338, 264 e 342 – 343 respectivamente. O sítio II é descontínuo, localizado nas posições 34 – 42 e 198 – 200 ligadas por pontes de dissulfeto. O domínio de fusão dependente de pH baixo está localizado entre as posições 102 a 179, sendo de crucial importância para a adesão entre o vírus e a célula (TORDO, 1996; WUNNER, 2007).

Destaca-se, contudo, que o número de casos de raiva em rebanho transmitido por morcegos hematófagos está aumentando e existem poucas análises contemplando o gene G de variantes do VR obtidas de morcegos hematófagos no Brasil. A análise do gene G fornece um melhor entendimento da epidemiologia e prevenção da raiva na América do Sul (SATO et al., 2004).

1.3 TAXONOMIA DO VÍRUS

Vários estudos baseado nas comparações das sequências nucleotídicas dos genes N e G, e de pseudogenes (Ψ) de numerosos isolados de *Lyssavirus*, permitiram a identificação e caracterização de sete genótipos (GTs), denominados GT1 a GT7 (BADRANE et al., 2001). Esses genótipos são divididos em dois filogrupos. O filogrupo 1 compreende o genótipo 1 (vírus da raiva clássico); o European Bat Lyssavirus (EBL) dos genótipos 5 (EBL1) e 6 (EBL2); genótipo 4 (Duvnhage Virus), e o genótipo 7 (Australian Bat Lyssavirus). O filogrupo 2 inclui os genótipos 2 (Lagos Bat Virus) e 3 (Mokola virus) (MURPHY et al., 1999; KNIPE; HOWLEY, 2006). Atualmente, o Comitê Internacional de taxonomia de vírus 2009, apresentou uma nova classificação para o gênero *Lyssavirus*, incluindo quatro novos genótipos. Os genótipos recém criados são *Aravan virus* (ARAV), *Khujand virus* (KHUV), *Irkut virus* (IRKV) e *West Caucasian bat virus* (WCBV), sendo que os três primeiros pertencem ao filogrupo 1 e o último ao filogrupo 2. Os genótipos de 1 a 11 estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Genótipos do gênero *Lyssavirus*

Genótipo	Abreviação	Potencial vetor(s) /Reservatórios	Distribuição
<i>Rabies Virus</i>	RABV	Cães, carnívoros silvestres, morcegos	Mundial, com exceção da Austrália, Antártica e países designados como rabies-free (Japão e os da Grã-Bretanha)
<i>Lagos Bat</i>	LBV	Morcegos - <i>Megachiroptera</i> ; <i>Eidolon helvum</i> , <i>Micropterus pusillus</i> , <i>Epomophourus wahlbergi</i>	África: República Africana, Etiópia, Nigéria, Senegal, África do Sul
<i>Mokola</i>	MOKV	Shrew – <i>Insectivora</i> ; <i>Crocidura spp.</i> ; <i>Rodentia</i> ; <i>Lophyromys sikapusi</i>	África: Camarões central, República Africana, Etiópia, Nigéria, África do Sul, Zimbábue
<i>Duvenhage</i>	DUVV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Miniopterus schreibersii</i> , <i>Nycteris gambiensis</i> , <i>N. hebaica</i>	África: África do Sul, Guiné, Zimbábue
<i>European bat lyssavirus 1</i>	EBLV-1	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Myotis dasycneme</i> , <i>M. daubentonii</i>	Europa
<i>European bat lyssavirus 2</i>	EBLV-2	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Eptesicus serotinus</i>	Europa
<i>Australian bat lyssavirus</i>	ABLV	Morcegos - <i>Megachiroptera</i> ; <i>Pteropus alecto</i> , <i>P. scapulatus</i>	Austrália, 1996; possivelmente e ocasionalmente Sudeste do continente asiático
<i>Aravan virus</i>	ARAV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Myotis blythi</i>	Quirquístão, 1991
<i>Khujand virus</i>	KHUV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Myotis mystacinus</i>	Tajiquistão, 2001
<i>Irkut virus</i>	IRKV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Murina leucogaster</i>	Sibéria Oriental, 2002
<i>West Caucasian bat vírus</i>	WCBV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Miniopterus schreibersi</i>	Montanhas do Cáucaso, 2003

Fonte: Adaptado de (ICTV= International Committee on Taxonomy of Viruses, 2009; WHO, 2004)

1.4 PATOGENIA DA RAIVA

O ciclo de replicação do vírus inicia com a interação da glicoproteína do envelope viral com receptores na superfície celular, essa interação resulta na adsorção e penetração dos vírions por endocitose (FAUQUET et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2007; CDC, 2012). No interior da vesícula endocítica a proteína G promove a fusão do envelope viral com a membrana do ribossomo, causando a liberação do complexo ribonucleoproteína (RNA + N + L + P) para o citoplasma (desencapsulamento), e a fita simples de RNA negativo é transcrita pela polimerase (CDC, 2012).

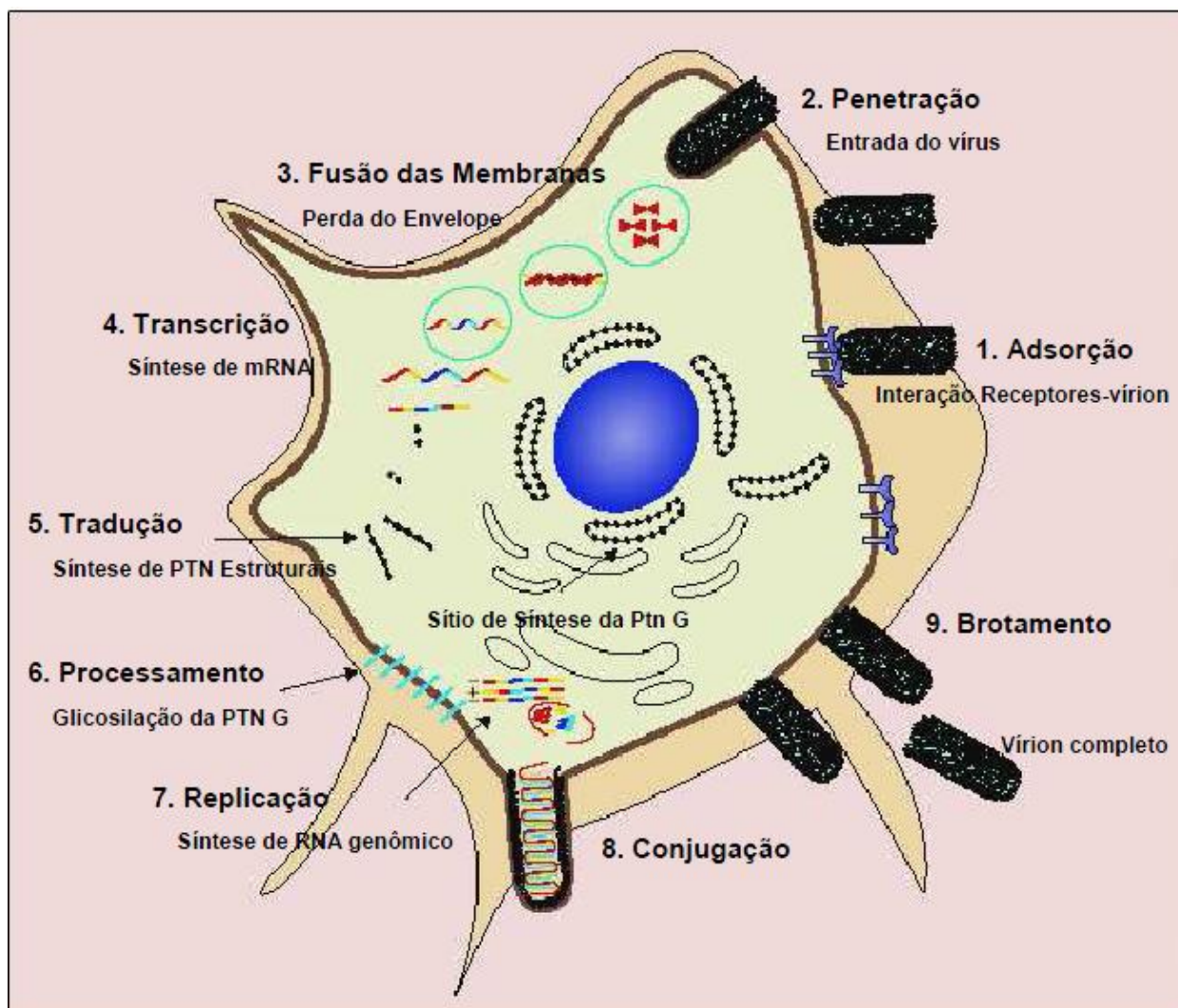
A transcrição do genoma dos rhabdovírus é regulada por um mecanismo simples e eficiente, em que o nível de expressão de cada gene é determinado pela sua distância em relação ao promotor único, localizado próximo a extremidade 3'. Esse mecanismo é denominado de atenuação da transcrição, e o gradiente de produção de transcritos será na ordem N>P>M>G>L (RODRIGUEZ et al., 2007). Portanto grandes quantidades de proteína N são produzidas em relação a quantidade da proteína L (MURPHY et al., 1999).

Embora a síntese de proteína G seja iniciada em ribossomos livres, sua conclusão de síntese e glicosilação (processamento da glicoproteína) ocorrem no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (CDC, 2012).

A concentração intracelular de moléculas de RNA líder para a proteína N regula a interrupção da transcrição e a transição para a replicação, cuja primeira etapa é a síntese de cópia complementar autêntica do RNA genômico. Quando ocorre interrupção da replicação, a transcrição do mRNA não contém stop códons (CDC, 2012).

Observa-se também que: a) A polimerase viral reconhece a extremidade 3' e inicia a síntese de cópias do RNA genômico; b) Estas fitas positivas do RNA do VR servem como moldes para a síntese das fitas negativas do genoma viral; c) Na montagem da partícula viral, o complexo protéico N-P-L encapsula o RNA genômico formando RNP e a proteína de M forma a matriz em torno do RNP; d) O complexo de RNP-M migra em áreas da membrana plasmática da célula que contém inserções de glicoproteínas e e) O complexo de RNP-M liga com as glicoproteínas e o vírus terminado brota da membrana (CDC, 2012) (Figura 3).

Figura 3 - Ciclo de infecção e replicação do vírus da raiva



Fonte: (Adaptado CDC, 2012)

PTN: proteína

1.5 EPIDEMIOLOGIA

1.5.1 Transmissão

A transmissão do vírus da raiva geralmente começa quando a saliva infectada de um hospedeiro é passada a um animal sadio através de um ferimento na pele ou nas mucosas, sendo a mordedura a via principal de transmissão (CDC, 2012).

Outro método de transmissão é a via aerógena. Aerossóis criados por morcegos em cavernas causaram infecções humanas. (NOVA; RENGELL; HINRICHSEN, 2002; ACHA; SZYFRES, 2003).

Em 2007, Scheffer et al., evidenciaram a presença do vírus da raiva nos pulmões de morcegos provenientes de diversos municípios do Estado de São Paulo, reforçando, dessa forma, a teoria da transmissão da raiva por aerossóis entre os quirópteros, especialmente em cavernas densamente povoadas por morcegos infectados.

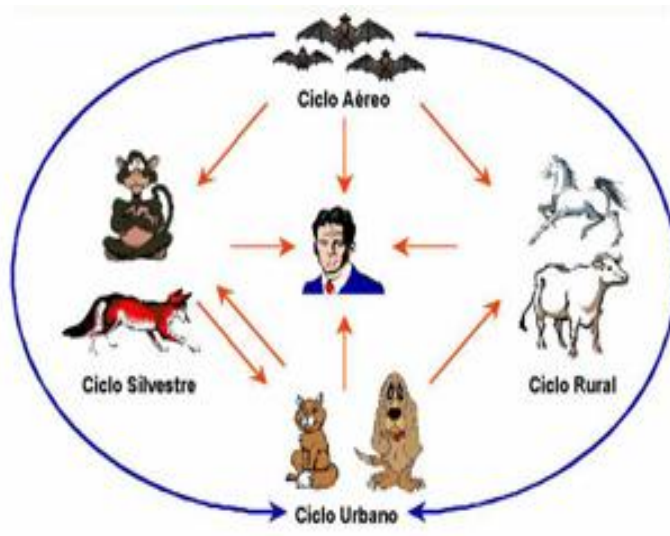
Deve ser considerada também a transmissão por transplante de córnea e mais recentemente, por transplante de órgãos sólidos (rins, pulmões, fígado e pâncreas) provenientes de doadores com encefalite de origem desconhecida ocorrida nos Estados Unidos em 2004 e na Alemanha em 2005 (HELLENBRAND et al., 2005; JOHNSON et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2005).

Estes fatos salientam a necessidade da inclusão de testes específicos para o diagnóstico de raiva, particularmente em potenciais doadores com sinais de comprometimento neurológico (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

1.5.2 Ciclo de transmissão

Na natureza o vírus da raiva é mantido por ciclos epidemiológicos ocasionalmente inter-relacionados, denominados ciclo urbano, silvestre, aéreo e rural (TAKAOKA et al., 2003; RODRIGUEZ ET al., 2007) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva



Fonte: Adaptado de Takaoka et al. (2003).

O ciclo urbano refere-se à raiva em cães e gatos domésticos, sendo o cão o principal transmissor dos casos de raiva humana. O caráter zoonótico da raiva é mais evidente neste ciclo, em função da natureza da relação entre cães e humanos (ACHA; SZYFRES, 2003; BELOTTO et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2007).

No entanto houve uma importante alteração do perfil epidemiológico de raiva no Brasil, e o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) passou a desempenhar o papel de reservatórios, tendo em vista os surtos ocorridos nas regiões Norte e Nordeste, em 2004 e 2005, respectivamente (CARRIERI et al., 2006). O *Desmodus rotundus* é responsável por enormes prejuízos econômicos na América Latina, especialmente em herbívoros (ACHA; SZYFRES, 2003).

Nos últimos dez anos mais de 40.000 casos foram notificados em herbívoros. Estimativas mais recentes indicam prejuízos em torno de 25 milhões de dólares a cada ano, além de perdas indiretas em torno de 37,5 milhões, sendo a subnotificação uma realidade e, portanto, tornando-se impossível a determinação real das perdas associadas a raiva dos herbívoros (KOTAIT et al., 2010).

É válido ressaltar que há ainda duas outras espécies de morcegos hematófagos conhecidas, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*, as quais alimentam-se preferencialmente de sangue de aves, desse modo não desempenhando importante papel

na epidemiologia da doença (ACHA; SZYFRES, 2003; MAYEN, 2003; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

Deve-se destacar, contudo, que o conhecimento de aspectos ligados à patogenia e epidemiologia da raiva nas diferentes espécies de morcegos constitui um importante instrumento para o controle da enfermidade nesses animais, bem como em herbívoros, animais de estimação e humanos (SCHEFFER et al., 2007).

Em Portel e Viseu, municípios do Estado do Pará, ocorreu o primeiro surto de raiva notificado no Brasil em que o vírus da raiva foi isolado e caracterizado geneticamente e antigenicamente como variante 3 (VAg3), variante comumente encontrada em morcego hematófago (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006).

Além disso, estudos realizados na província de Pastaza no Equador em 2005 e 2007, a análise filogenética demonstrou que os isolados de raiva humana e outros animais, desse período, segregaram no mesmo cluster do morcego hematófago, mostrando, dessa forma, a importância do *Desmodus rotundus* como principal transmissor do vírus para os seres humanos (CASTILHO et al., 2010a).

Ressalta-se que o número de casos de raiva em herbívoros, confirmados laboratorialmente, tem tido, nos últimos anos, um preocupante preocupante em algumas regiões, devido, principalmente, a intensa proliferação dos morcegos hematófagos e à crescente dificuldade de controle de suas populações. Os morcegos das mais diferentes espécies estão envolvidos no ciclo aéreo da raiva e atualmente possuem uma grande importância para a manutenção do vírus em uma determinada área geográfica (BRASIL, 2008; KOTAIT et al., 2010).

O ciclo silvestre, por fim, é representado pela raiva nas espécies de mamíferos silvestres terrestres, com ênfase nos canídeos silvestres. Em nosso meio, a real importância desse ciclo não é, ainda, bem conhecida, razão pela qual se torna indispensável à implementação de programas de vigilância epidemiológica (BRASIL, 2008; KOTAIT et al., 2010).

1.5.3 Utilização da biologia molecular para caracterização do vírus da raiva

Diversos estudos de caracterização molecular e análise filogenética foram e estão sendo realizados, por meio do sequenciamento parcial ou completo dos genes N e G.

Em 2001, Ito e colaboradores analisaram sequências parciais do gene N com 203 nucleotídeos de comprimento, de 50 amostras de isolados do Brasil, onde se identificaram dois grupos de reservatórios, os dos cães e dos morcegos hematófagos.

Já Carnieli et al. (2009), caracterizaram geneticamente isolamentos de RABV de bovinos e equinos durante o período de 1997-2002, no estado de São Paulo, sendo todas pertencentes à variante antigênica 3 (VAg3). Neste trabalho foram identificadas três linhagens genéticas diferentes envolvidas na epizootia apresentada nesse período.

Entre março e maio de 2004 em Portel e Viseu, municípios do Estado do Pará, ocorreram surtos de raiva transmitidos por morcegos. Essas amostras foram caracterizadas antigenicamente, usando anticorpos monoclonais, como variante 3 (VAg3). Geneticamente, por meio do sequenciamento nucleotídico parcial do gene N, as mesmas apresentaram alta similaridade genética com os isolados de *Desmodus rotundus* (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006).

Mais recentemente, no estado do Pará, foi descrita a caracterização genética de 37 cepas de vírus da raiva, isoladas de diferentes espécies animais e de humanos, obtidas no período de 2000 a 2005. Onde, identificaram-se linhagens distintas entre as variantes circulantes no Pará, demonstrando uma importante correlação dessas linhagens com a distribuição geográfica, dentro do estado e em relação ao restante do país (BARBOSA et al., 2007).

1.6 SINAIS CLÍNICOS

Classicamente, a raiva apresenta três fases: a prodrômica, que geralmente é a mais curta e inclui mudanças de conduta; a fase excitativa, que inclui sinais exacerbados

de hiperexcitabilidade e agressividade; e a fase paralítica, que geralmente segue a anterior e cursa com paralisia progressiva (REZENDE et al., 1997; FERNANDES, 2001).

Nos bovídeos os sinais mais comumente observados são: isolamento do rebanho, apatia, anorexia, cabeça baixa, indiferença ao ambiente, aumento de sensibilidade, prurido no local da mordedura, ataxia, debilidade dos membros e hiperexcitabilidade (RADOSTITS et al., 2000; ACHA; SZYFRES, 2003; KOTAIT et al., 2010).

Além desses sintomas descritos há sinais gástricos como atonia ruminal, obstipação, diarreia, timpanismo, contração dos músculos abdominais (REZENDE et al., 1997).

É válido ressaltar que o animal não consegue deglutir por isso a salivação excessiva, em função dessa dificuldade, torna-se evidente (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

Em equídeos, há poliúria e, de forma semelhante aos bovinos há sinais do trato gastrointestinal como cólicas (REZENDE et al., 1997). Podendo ser observado ainda irritação no ponto de penetração do vírus, associada a grande excitação; a paralisia manifesta-se primeiro na faringe, esôfago e depois atinge os membros posteriores (HIPÓLITO, 1948).

Os suínos, assim como os demais animais manifestam excitação, incoordenação, salivação intensa e convulsões e posteriormente paralisia (RADOSTITS et al., 2000). Ressalta-se que nem sempre estes sinais descritos acima são claramente observáveis (KOTAIT et al., 2010).

1.7 DIAGNÓSTICO

A raiva possui a maior taxa de letalidade reconhecida, portanto a segurança é de suma importância quando se trabalha com essa zoonose (WHO, 2004).

Dessa forma o diagnóstico laboratorial deve ser rápido e preciso em humanos e outros animais. Pois, além de identificar os casos de raiva positivos, proporcionam mais

informações sobre os padrões epidemiológicos atuais da doença, fornecendo desse modo informações apropriadas para os programas de controle (CDC, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda, para o diagnóstico específico, o uso das técnicas de Imunofluorescência Direta (IFD), conforme descrita por Dean et al., (1996), e a Prova Biológica (PB), segundo Koprowsky (1996), como os principais métodos para o diagnóstico específico da raiva.

A IFD é considerada uma técnica rápida, altamente sensível, e específica. O tecido ideal de eleição para essa técnica é o cérebro de animais suspeitos, podendo ser utilizado, também material de indivíduos vivos como impressões corneais, raspado de mucosa lingual, tecido do bulbo de folículos pilosos e cortes cutâneos congelados (ACHA; SZYFRES, 2003).

A IFD baseia-se na detecção do vírus em esfregaços de tecido, utilizando-se anticorpos específicos conjugados a uma substância fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996).

A eficácia do teste depende da competência do técnico e da qualidade dos reagentes, especialmente o conjugado (FERNANDES, 2001; ACHA; SZYFRES, 2003).

O conjugado absorve a luz de um comprimento de onda para emitir em comprimentos de ondas mais longos, portanto a qualidade do microscópio também é importante para se obter uma alta resolução da imagem de diagnóstico (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). Usualmente, a IFD é acompanhada de um teste de confirmação biológica (WEBSTER; CASEY, 1996).

A PB se baseia na reprodução da doença em camundongos albinos suíços recém-nascidos, através de inoculação via intracerebral de uma suspensão do material suspeito. (KOPROWSKY, 1996).

É válido ressaltar objetivando diminuir as necessidades de inoculação em animais de experimentação, por razões tanto humanitárias como de custo, que há uma tendência à substituição da inoculação em camundongos pela inoculação de cultivos celulares (WEBSTER; CASEY, 1996).

Técnicas baseadas em métodos moleculares vêm sendo largamente aplicadas ao diagnóstico e caracterização do VR (DANTAS JUNIOR et al., 2004; CARNIELI et al.,

2006; KIMURA et al., 2006). Elas podem ser utilizadas quando a amostra apresenta uma carga viral muito pequena, especialmente, quando há necessidade de diagnóstico *in vivo* em amostras de saliva ou em biópsias de pele, o que é mais frequente em humanos (FERNANDES, 2001).

Segundo Rupprecht, Hanlon e Hemachudha (2002), as técnicas moleculares têm se mostrado eficientes se usadas em conjunto com outras técnicas já estabelecidas, como a IFD, podendo reduzir o número de diagnósticos falso-negativos, aumentando dessa forma a sensibilidade no diagnóstico.

Em 2006, Macedo et al. utilizaram a técnica de PCR em amostras de biópsia de pescoço de humanos provenientes do surto de raiva ocorrido, em Augusto Corrêa, município do Estado do Pará. Este método poderia se tornar uma importante ferramenta para o diagnóstico da raiva, particularmente em amostras ante-mortem.

Assim sendo, as técnicas moleculares são de extrema importância, entre outras aplicações, para a identificação do reservatório da doença, desempenhando dessa forma um importante papel na epidemiologia do vírus da raiva (ITO et al., 2001, 2003).

1.9 PREVENÇÃO E CONTROLE

A prevenção da raiva baseia-se na vacinação e no controle de vetores, medidas governamentais para o transporte internacional de animais e prevenção de raiva humana através de vacinação pré e pós-exposição (ACHA; SZYFRES, 2003).

As principais medidas de controle empregadas no ciclo urbano da raiva tem sido a vacinação de caninos e felinos e a captura e eliminação de cães errantes (SCHNEIDER et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 2007).

A raiva dos herbívoros é controlada pela vacinação de animais em áreas endêmicas e pelo controle da população de *Desmodus rotundus* (RODRIGUEZ et al., 2007).

Do ponto de vista epidemiológico, os morcegos hematófagos constituem os reservatórios mais importantes para o vírus da raiva, mas outras espécies de quirópteros são, também, passíveis de transmitir o agente (GERMANO, 1994).

A referida população é controlada pelo uso de pasta vampiricida (á base de substâncias anticoagulantes), seja nos morcegos hematófagos ou nos animais agredidos. Como os morcegos têm o hábito de limparem-se mutuamente, o anticoagulante aplicado deverá levar à eliminação de vários indivíduos na colônia (KOTAIT et al., 1998; GOMES; UIEDA; LATORRE, 2006).

Não existe tratamento para a doença uma vez iniciados os sinais clínicos (SMITH, 1993; FERNANDES, 2001). Entretanto Willoughby et al. (2005) relataram a sobrevivência de uma garota de 15 anos de idade, que desenvolveu a doença depois de ter sido mordida por um morcego após um mês, esse foi o primeiro sucesso no tratamento da raiva humana.

Estudos em epidemiologia molecular nos permitem identificar a linhagem viral circulante, e os padrões de distribuição dessas linhagens em relação á origem geográfica.

Estudos realizados por Kobayashi et al., (2006 e 2008), mostram que os morcegos utilizam rios para se deslocar, pois foi identificado a mesma variante circulante ao longo do mesmo rio, isso ocorre porque existem abundância de abrigos adequados e cavernas ao longo de suas margens (LORD, 1980).

Estes achados sugerem que os padrões de distribuição das variantes, podem estar correlacionados com o comportamento do morcego e que a propagação do vírus está associada com a sua migração. Estudos epidemiológicos são, portanto necessário para avaliar as características espaciais da distribuição da raiva transmitida por morcegos hematófagos. Uma vez que as características epidemiológicas podem ser associadas com características geográficas de áreas onde os bovinos são mantidos. Estes fatores devem ser considerados como detalhe adicional, para se estabelecer medidas de controle para prevenção da raiva entre morcegos hematofágos com finalidade de minimizar o alastramento para outros animais (KOBAYASHI et al., 2008; HIRANO et al., 2010).

Além disso, os resultados moleculares derivados do sequenciamento de DNA, em regiões onde esses dados são escassos, como é o caso das regiões aqui estudadas, permitirá um melhor entendimento da epidemiologia da doença nessas regiões, contribuindo assim para um delineamento de medidas de controle da doença.

2 OBJETIVOS

- Identificar a linhagem genética do vírus da raiva ocorrido em herbívoros e suínos procedentes da região Amazônica com base no sequenciamento parcial do gene codificador da nucleoproteína e glicoproteína.
- Estabelecer genealogias dessas amostras virais e possíveis relações geográficas.
- Verificar a existência de assinaturas genéticas relacionadas à distribuição geográfica das amostras virais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

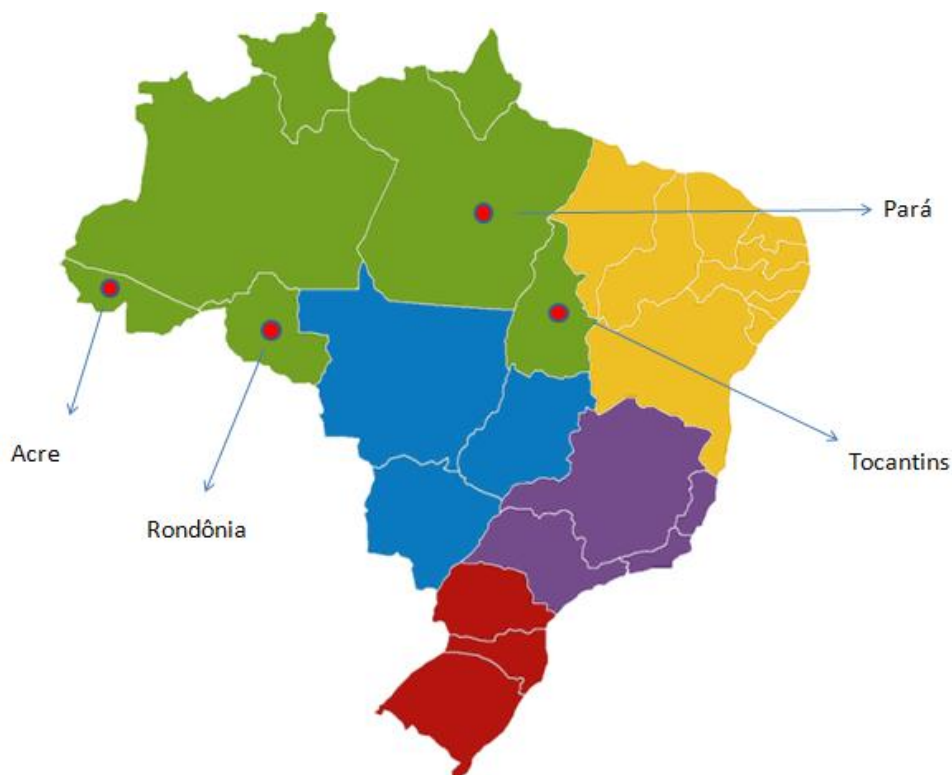
3.1 VÍRUS DE REFERÊNCIA

A amostra viral de referência utilizada neste estudo foi o CVS (Challenge Virus Standard), mantida por passagens em cérebros de camundongos, por inoculação intracerebral, tendo sido empregada como controle positivo da extração do RNA, reação em cadeia pela polimerase antecedida pela transcrição reversa (RT-PCR).

3.2 AMOSTRAS DE CAMPO

Foram escolhidas aleatoriamente 60 amostras de partes do SNC (Sistema nervoso central), isoladas das espécies bovina, bubalina, suína e equídea, de amostras procedentes dos seguintes estados: Acre, Pará, Rondônia e Tocantins, no período de 2004 a 2009, recebidas no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Estado do Pará, e que foram previamente diagnosticadas como positivas para a raiva, pelas provas de IFD (Imunofluorescência direta) e/ou PB (Prova biológica) (Figura 5 e Quadro 2). As amostras estavam armazenadas a -20C e foram transportadas em TRIZOL (Invitrogen™, San Diego, EUA), com a finalidade de evitar possíveis riscos biológicos. Em decorrência disso, não foi possível fazer passagens em camundongos.

Figura 5 – Mapa do Brasil indicando os Estados de origem das amostras utilizadas nesse estudo



Quadro 2 – Relação das amostras analisadas no presente estudo, com sua espécie de origem, procedência, ano de isolamento, número de registro interno do LANAGRO e localidade

(Continua)

ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA	ANO	Nº	LOCALIDADE
Bovina	Rondônia	2004	80	Campo Novo de Rondônia
Bovina	Rondônia	2004	169	Cacoal
Bovina	Tocantins	2004	340	Bom Jesus
Bovina	Tocantins	2004	212	Abreulândia
Bovina	Acre	2004	256	Senador Guiomard
Bovina	Pará	2004	346	Santa Lúzia do Pará
Bovina	Pará	2004	347	Xinguara
Bovina	Tocantins	2005	66	Monte do Carmo
Equídea	Tocantins	2005	157	Ponte Alta do Tocantins
Bovina	Tocantins	2005	204	Tupirama
Equídea	Tocantins	2005	286	Palmeirópolis
Bovina	Tocantins	2005	509	Porto Nacional
Bovina	Tocantins	2005	611	Porto Nacional
Bovina	Tocantins	2005	679	Porto Nacional
Bovina	Pará	2005	568	Augusto Corrêa
Bovina	Pará	2005	640	Bragança
Bovina	Pará	2005	673	Ipixuna

(Conclusão)

ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA	ANO	Nº	LOCALIDADE
Bovina	Pará	2005	721	Bragança
Bovina	Pará	2005	723	Bragança
Suína	Pará	2005	81	Eldorado
Ovina	Tocantins	2005	367	Porto Nacional
Bovina	Rondônia	2005	615	Porto Velho
Bubalina	Pará	2006	93	Bragança
Bubalina	Pará	2006	129	Quatipuru
Bubalina	Pará	2006	135	Bragança
Bovina	Pará	2006	175	Santa Maria das Barreiras
Bovina	Pará	2006	02	Capitão Poço
Bovina	Pará	2006	79	Bragança
Bovina	Pará	2006	138	Redenção
Bovina	Pará	2006	142	Irituia
Bovina	Tocantins	2006	158	Ponte Alta do Tocantins
Bovina	Tocantins	2006	168	São Félix do Tocantins
Bovina	Rondônia	2006	18	Ouro preto do oeste
Bovina	Rondônia	2006	56	Ouro preto do oeste
Bovina	Tocantins	2006	186	Conceição
Equídea	Pará	2007	146	Mãe do rio
Bovina	Pará	2007	181	Tracuauteua
Suína	Pará	2007	99	Conceição do Araguaia
Bovina	Pará	2007	118	Concórdia do Pará
Bovina	Pará	2007	184	Mãe do Rio
Bovina	Pará	2007	239	Aurora do Pará
Equídea	Pará	2007	266	Tracuateua
Bovina	Tocantins	2007	204	Combinado
Bovina	Tocantins	2007	222	Riachinho
Bovina	Tocantins	2007	186	Natividade
Suína	Tocantins	2007	60	Paraná
Bovina	Rondônia	2007	177	Campo Novo
Bovina	Rondônia	2007	169	Rio Crespo
Bovina	Pará	2008	214	Aurora do Pará
Equídea	Pará	2008	114	São Miguel do Guamá
Bovina	Tocantins	2008	234	Pium
Bovina	Tocantins	2008	243	Santa Rita do Tocantins
Bovina	Tocantins	2008	244	Talismã
Bovina	Tocantins	2008	251	Marianópolis
Bovina	Rondônia	2008	266	Porto velho
Bovina	Rondônia	2008	276	Jaru
Bovina	Rondônia	2008	68	Urupá
Equídea	Rondônia	2008	110	Machadinho do Oeste
Bovina	Tocantins	2009	19	Araguacema
Bovina	Tocantins	2009	59	Natividade

3.3 PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD) E PROVA BIOLÓGICA (PB)

Essas etapas do estudo foram realizadas no LANAGRO, utilizando-se as duas técnicas de diagnóstico preconizadas pela Organização Mundial de Saúde: a IFD

realizada pelo método descrito por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996), e a prova biológica (PB) realizada por meio da inoculação intracerebral em camundongos jovens, descrita por Koprowski (1996).

3.4 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

Para realização da extração foi utilizado 1g de tecido nervoso macerado, adicionou-se 1000 μ L de reagente TRIZOL (Invitrogen™, San Diego, EUA). Os tubos foram agitados em vórtex durante 15s, permanecendo em repouso durante 10min. Em seguida foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, agitando-se com auxílio de vórtex (15s) e seguindo-se repouso (10min). Prosseguiu-se com uma centrifugação 12000g, durante 15min, a 4°C. Após esta centrifugação foi possível verificar a formação de três fases: uma fase rosada e mais densa constituída pelo trizol e DNA, uma intermediária correspondente aos detritos celulares e impurezas (proteínas e lipídios) e uma fase aquosa superior límpida na qual se encontrava o ácido nucléico.

Foi retirado da fase aquosa 500 μ L e transferido para um tubo de 1,5mL, no qual foram adicionados 500 μ L de propanol, vórtex (15s) e repouso (10min), seguido de uma centrifugação 12000g, durante 15min, a 4°C.

Posteriormente o sobrenadante foi desprezado, acrescentou-se 950 μ L de etanol 75%, seguiu-se com uma centrifugação 12000g, durante 15min, a 4°C.

O etanol foi descartado e os tubos foram colocados para secar em banho seco no eppendorf com a tampa aberta, durante 10min, até a evaporação total, a 55°C. Adicionou-se 20 μ L de água livre de DNase e RNase, a seguir os tubos foram colocados novamente no eppendorf com a tampa fechada, durante 10min e guardados imediatamente a – 20°C.

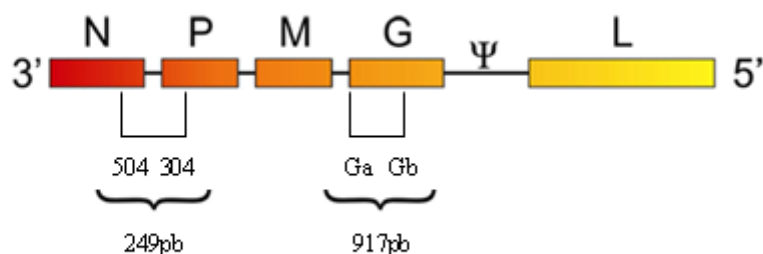
3.5 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA OS GENES N E G

Para cada reação foram adicionados 3,5 μ L do RNA total extraído (conforme 3.4), para uma reação com volume final de 10 μ L, contendo: 2 μ L de 5x First Strand Buffer (InvitrogenTM, San Diego, EUA), 1 μ L do *pool* de dNTPs na concentração de 10mM, 1 μ L DTT a 100mM, 1 μ L de cada *primer* na concentração de 10 μ M (504 e 304 para o gene N e Ga3222-40 e Gb 4119-39 para o gene G, conforme Quadro 3 e Figura 6), 200U de SuperscriptTM II Reverse Transcriptase (InvitrogenTM, San Diego, EUA). A reação foi realizada em um termociclador a 42°C durante 60min.

Quadro 3 – Primers utilizados nas provas de RT-PCR e sequenciamento de DNA para os genes G e N

Primers	Gene	Sequência	Posição no genoma no PV	Autor
504	N	5' TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT 3'	1287-1534	Orciari et al., 2001
304	N	5' TTGACGAAGATCTTGCTCAT 3'		Orciari et al., 2001
Ga3222-40	G	5' CGCTGCATTTTRTCARAGT 3'	3222-4139	Sato et al., 2004
Gb4119-39	G	5' GGAGGGCACCATTTGGTMTTC 3'		Sato et al., 2004

Figura 6 – Esquema do genoma do vírus da raiva com a localização dos primers utilizados no protocolo de RT-PCR com seus respectivos tamanho dos produtos.



Fonte: adaptado CDC, 2012

Para a PCR se utilizou 5µL de cada cDNA, para uma reação com volume final de 50µL contendo: 10x PCR Buffer (Invitrogen™, San Diego, EUA), 8µL do *pool* de dNTPs a 1,25mM, 2,5µL de cada primer a 10µM (Conforme descrito para transcrição reversa), 1,5µL de MgCl₂, 25,25µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™, San Diego, EUA).

A reação foi conduzida segundo o seguinte ciclo: 94°C por 5min e 35 ciclos de 94°C por 45s, 55°C por 45s e 72°C por 2min e extensão final a 72°C por 10min.

Os fragmentos amplificados contendo 249 e 917 pb, referentes ao tamanho de banda esperado dos genes N e G, respectivamente, foram analisados em gel de agarose de 1,5%, imerso em tampão Tris-Ácido bórico-EDTA (1M – 0,1M- 0,5M).

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita através da transiluminação do gel com luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídeo na concentração de 5 µg/mL (SAMBROOK et al., 1989).

3.6 PURIFICAÇÃO

Os fragmentos amplificados foram purificados com ExoSAP-IT (GE Healthcare, EUA). Para cada 10µL de amplicon adicionou-se 4µL de exosap, a reação foi submetida ao seguinte ciclo: 37°C por 15min e 80°C por 15min. Após a purificação o produto apresentava-se pronto para a reação de sequenciamento.

3.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para a reação de sequenciamento utilizaram-se: 2µL Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems™, Foster City, CA), 2µL tampão 5x Buffer (200mM de Tris, 5mM de MgCl₂, pH 9,0), 0,5µL dos primers na concentração de 10pmoles e 5,5µL de DNA purificado com Exosap, para um volume final de 10µL. A reação foi processada nas seguintes condições: 96°C por 1min, seguido de 40 ciclos de 96°C por 15s, 50°C por 15s e 60°C por 4min.

3.8 PRECIPITAÇÃO

Para cada 10 μ L de produto de reação de sequenciamento utilizou-se 2,5 μ L de EDTA 125mM com 30 μ L de etanol absoluto homogeneizando-se, seguiu-se com uma incubação durante 30min a temperatura ambiente, com proteção da luz. A seguir, centrifugou-se a 16500g por 30 minutos a 4°C.

Depois se realizou a inversão, de uma só vez, posteriormente adicionou-se 30 μ L de etanol 70%, submetendo a uma centrifugação a 16500g por 20min a 4°C, inverteu-se novamente e deixando secar até o evaporação total do etanol, durante 10min a 94°C.

3.9 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE GENEALÓGICA

O sequenciamento nucleotídico foi realizado utilizando o kit ABI PRISM Dye Terminator (Applied BiosystemsTM, Foster City, CA), cujas reações foram processadas em sequenciador automático, modelo sequenciador capilar Genetic Analyser 3500 (Applied BiosystemsTM).

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antiseno de cada amostra dos genes N e G, foram submetidos ao aplicativo Phred *online* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) para avaliação da qualidade dos mesmos, foram utilizados nucleotídeos com *score* superior a 20 (probabilidade de um erro a cada 100 nucleotídeos).

A seguir as cromatogramas foram conferidas manualmente utilizando o programa Finch TV 1.4 (© 2012 PerkinElmer), a fim de se encontrarem erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas.

A sequencia final de cada amostra obtida com o aplicativo Cap-Contig, incluído no programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999), foi submetida ao BLASTn, para confirmação do sequenciamento (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

As sequencias de DNA obtidas foram alinhadas pelo método do alinhamento múltiplo CLUSTAL/W, utilizando-se o programa Bioedit (HALL, 1999). Os alinhamentos foram utilizados para a geração das árvores filogenéticas, utilizando-se critério de otimização de distância, com algoritmo Neighbor-Joining e modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros, inserido no programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007), empregando-se 1000 repetições de bootstrap.

Para o enraizamento das árvores foram utilizadas como grupo externos (M13215 para N e EU293119.1 para G). Phred Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>.

3.10 ANÁLISE ESPACIAL

A análise espacial dos isolados investigados no presente estudo foi elaborado, a partir de mapas retirados do IBGE *online* (<http://mapas.ibge.gov.br>), identificando-se as possíveis linhagens virais circulantes com auxílio do programa ArcGis versão 9.3 (ESRI INC. Arc View GIS Redlands, 1996).

3.11 CÁLCULO DE IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS

As identidades de nucleotídeos dos grupos formados no presente estudo, para as sequências dos genes N e G, foram calculados no programa Excel (Microsoft Corporation) a partir da matriz de identidade obtida no programa Bioedit (HALL, 1999).

3.12 ANÁLISE DE MUDANÇAS E INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NAS SEQUÊNCIAS PUTATIVAS DE AMINOÁCIDOS

Para a análise das mudanças de aminoácidos, tais como conservação dos caracteres nas sequências, substituições de aminoácidos específicos, referentes a cada Estado, foram utilizadas as sequências obtidas do referente trabalho.

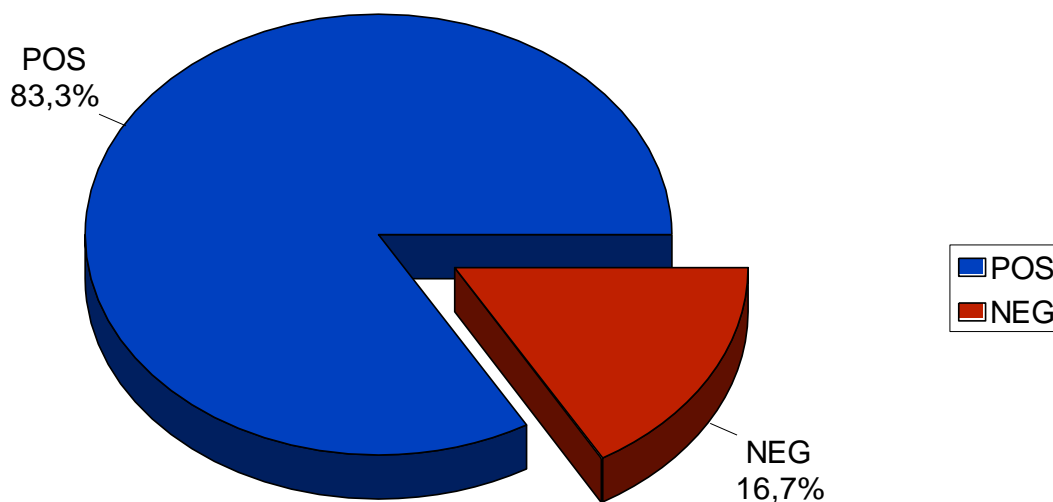
Essas foram alinhadas com o vírus fixo PV (Genbank accession number: M13215), utilizando o Clustal W do programa Bioedit (HALL, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. RT-PCR PARA OS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) VIRAIS

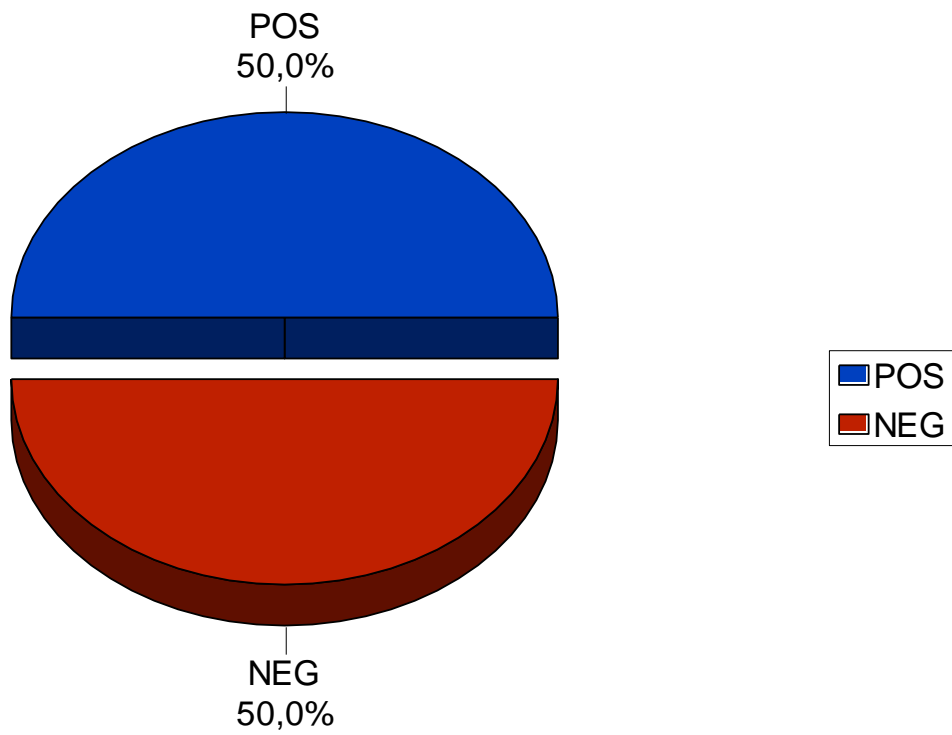
Para o gene N dos 60 isolados submetidos a RT-PCR, 50 amostras demonstraram positividade, o que corresponde a 83,3% do total (Figura 7, Quadro 4).

Figura 7 – Resultados obtidos através da técnica de RT-PCR dos isolados do presente estudo para o gene N



Para o Gene G das 60 amostras analisadas, submetidas a RT-PCR, 30 foram positivas, um valor correspondente de 50% (Figura 8 e quadro 4), é importante assinalar que dessas 30 amostras, 10 foram também negativas para o gene N.

Figura 8 – Resultados obtidos através da técnica de RT-PCR dos isolados do presente estudo para o gene G



Quadro 4 – Resultados obtidos através da técnica de RT-PCR para os genes N e G, para cada amostra, com seus respectivos dados de origem

(Continua)

N de registro	Espécie	Ano de isolamento	PCR N	PCR G
80	Bovina	2004	+	+
169	Bovina	2004	+	+
212	Bovina	2004	+	+
256	Bovina	2004	+	+
340	Bovina	2004	+	+
157	Equídea	2005	+	+
204	Bovina	2005	+	+
721	Bovina	2005	+	+
723	Bovina	2005	+	+
129	Bubalina	2006	+	+
93	Bubalina	2006	+	+
2	Bovina	2006	+	+
56	Bovina	2006	+	+
158	Bovina	2006	+	+
168	Bovina	2006	+	+
175	Bovina	2006	+	+
186	Bovina	2006	+	+
118	Bovina	2007	+	+
146	Equídea	2007	+	+
177	Bovina	2007	+	+
184	Bovina	2007	+	+
186	Bovina	2007	+	+
204	Bovina	2007	+	+
266	Bovina	2007	+	+
68	Bovina	2008	+	+
110	Equídea	2008	+	+
243	Bovina	2008	+	+
251	Bovina	2008	+	+
276	Bovina	2008	+	+
19	Bovina	2009	+	+
346	Bovina	2004	+	-
347	Bovina	2004	+	-
66	Bovina	2005	+	-
81	Suína	2005	+	-
679	Suína	2005	+	-
286	Equídea	2005	+	-
568	Bovina	2005	+	-
611	Bovina	2005	+	-
615	Bovina	2005	+	-
640	Bovina	2005	+	-

(Conclusão)

N de registro	Espécie	Ano de isolamento	PCR N	PCR G
673	Bovina	2005	+	-
135	Bubalina	2006	+	-
18	Bovina	2006	+	-
79	Bovina	2006	+	-
169	Bovina	2007	+	-
239	Bovina	2007	+	-
114	Equídea	2008	+	-
234	Bovina	2008	+	-
266	Bovina	2008	+	-
59	Bovina	2009	+	-
367	Ovina	2005	-	-
509	Bovina	2005	-	-
138	Bovina	2006	-	-
142	Bovina	2006	-	-
60	Suína	2007	-	-
99	Suína	2007	-	-
181	Bovina	2007	-	-
222	Bovina	2007	-	-
214	Equídea	2008	-	-
244	Bovina	2008	-	-

+: positivo/ -: negativo

4.2 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Dos 50 isolados submetidos ao sequenciamento para o gene N, obtiveram-se sequências viáveis de 41 amostras. Entre as 30 amostras sequenciadas para o gene G, 17 resultaram sequências viáveis. Foi possível sequenciar 17 amostras dos genes N e G paralelamente (Quadro 5).

Quadro 5 – Resultado de sequenciamento de DNA para os genes N e G

(Continua)

N de registro	Espécie	Ano de isolamento	Sequência N	Sequência G
80	Bovina	2004	SEQ	SNV
169	Bovina	2004	SEQ	SEQ
212	Bovina	2004	SEQ	SNV
256	Bovina	2004	SEQ	SNV
340	Bovina	2004	SEQ	SNV
346	Bovina	2004	SEQ	NA
347	Bovina	2004	SNV	NA
66	Bovina	2005	SEQ	NA
81	Suína	2005	SEQ	SNV
367	Ovina	2005	NA	NA
679	Suína	2005	SEQ	SNV
157	Equídea	2005	SEQ	SEQ
204	Bovina	2005	SEQ	NA
286	Equídea	2005	SEQ	NA
509	Bovina	2005	NA	NA
568	Bovina	2005	SEQ	NA
611	Bovina	2005	SEQ	NA
615	Bovina	2005	SEQ	NA
640	Bovina	2005	SEQ	NA
673	Bovina	2005	SEQ	NA
721	Bovina	2005	SEQ	SNV
723	Bovina	2005	SEQ	SEQ
93	Bubalina	2006	SEQ	SEQ
129	Bubalina	2006	SEQ	SEQ
135	Bubalina	2006	SNV	NA
2	Bovina	2006	SEQ	SNV
18	Bovina	2006	SEQ	NA
56	Bovina	2006	SEQ	SNV
79	Bovina	2006	SEQ	NA
138	Bovina	2006	NA	NA
142	Bovina	2006	NA	NA
158	Bovina	2006	SEQ	SEQ
168	Bovina	2006	SEQ	SEQ
175	Bovina	2006	SEQ	SEQ
186	Bovina	2006	SEQ	SEQ
60	Suína	2007	NA	NA
99	Suína	2007	NA	NA
118	Bovina	2007	SNV	SNV
169	Bovina	2007	SNV	NA
146	Equídea	2007	SEQ	SEQ

(conclusão)

N de registro	Espécie	Ano de isolamento	Sequência N	Sequência G
177	Bovina	2007	SEQ	SEQ
181	Bovina	2007	NA	NA
184	Bovina	2007	SEQ	SEQ
186	Bovina	2007	SEQ	SEQ
204	Bovina	2007	SEQ	SEQ
222	Bovina	2007	NA	NA
239	Bovina	2007	SEQ	NA
266	Bovina	2007	SEQ	SEQ
68	Bovina	2008	SEQ	SEQ
110	Equídea	2008	SEQ	SEQ
114	Equídea	2008	SEQ	NA
214	Equídea	2008	NA	NA
234	Bovina	2008	SEQ	NA
243	Bovina	2008	SEQ	SNV
244	Bovina	2008	NA	NA
251	Bovina	2008	SNV	SNV
266	Bovina	2008	SNV	NA
276	Bovina	2008	SNV	SNV
19	Bovina	2009	SNV	NA
59	Bovina	2009	SNV	NA

SEQ: sequenciada / SNV : sequência não viável / NA: não se aplica

4.3 ANÁLISE GENEALÓGICA

4.3.1 Gene N

O sequenciamento do fragmento de 249 pares de bases resultou em sequências de 221 a 248 nucleotídeos. Quando as mesmas foram submetidas ao BLASTn, apenas sequências referentes ao vírus da raiva foram obtidas como homólogas às aqui estudadas.

Nestas sequências finais, foram mantidos, para análises subseqüentes apenas os 172 nucleotídeos referentes ao gene N, sendo descartados aqueles relacionados ao gene P.

A figura 9 mostra a árvore filogenética obtida com base no sequenciamento parcial do gene N. À lista das amostras com suas respectivas localidades, ano de isolamento e hospedeiro, encontra-se na tabela 2.

A análise filogenética das 41 sequencias obtidas no presente trabalho juntamente com outras retiradas do Genbank resultou na formação de 3 linhagens principais: linhagem genética principal I: geneticamente semelhantes a variante antigênica 3 (VAg-3), comumente encontrada no morcego hematófago *Desmodus Rotundus*, onde agrupou-se, a totalidade das amostras tipificadas no presente trabalho ficaram agrupadas aqui, linhagem genética principal II; correspondente a amostra de vírus fixo Pasteur, usada como grupo externo para o enraizamento da árvore; linhagem genética principal III; referente a isolados procedentes de cão (*Canis familiaris*), classificadas como pertencentes a variante antigênica 2 (VAg-2).

Dentro da linhagem genética principal I, foi possível discriminar três sublinhagens, identificadas aqui como A, B e C. Essas sublinhagens por sua vez foram, subdivididas em subgrupos genéticos, assim: sublinhagem genética A, composta pelos subgrupos denominados desde A1 até A6, sublinhagem genética B, composta pelos subgrupos B1 e B2 e sublinhagem genética C.

No subgrupo A1, agruparam-se as sequencias obtidas do genBank originárias de Tocantins no ano 1998 (número de acesso AB083809 e AB083811), dos municípios de Nova Olinda e Colinas respectivamente. Juntamente com as amostras do presente estudo identificadas com os números 212, 243, 234, 204, 340 de bovinos procedentes de Tocantins e a amostra 80 obtida de Rondônia. Além dessas duas amostras uma de Eldorado dos Carajás (amostra 175, bovino) e outra de Santa Maria das Barreiras (amostra 81, suíno), municípios da região Sudeste do Pará, também integraram o subgrupo A1.

O subgrupo A2 compreendeu um único isolado bovino (amostra 168) procedente de São Félix do Tocantins.

O subgrupo A3, por sua vez, incluiu as sequências do GenBank, provenientes do estado de Goiás, isoladas no ano 2006 (número de acesso AB297646.1 e AB297644.1), juntamente com sequências obtidas neste trabalho e numeradas como (286 obtida de equino), 204 e 186 (isoladas de bovinos), procedentes de Tocantins.

O subgrupo A4, agregou amostras unicamente de Tocantins, isoladas de bovinos (157, 66, 611, 158 e 679), suíno (679) e equino (157).

No subgrupo A5, agregaram-se amostras de Rondônia (169, 68, 615, 177, 110) e uma amostra de Ipixuna, município do Nordeste Paraense (amostra 673). Estas amostras mostraram similaridade genética com os isolados envolvidos em casos humanos de raiva ocorridos em Portel, no Estado do Pará (número de acesso no Genbank : EF363746.1 e EF3637481) e um isolado bovino de Morrinhos município de Goiás em 1999 (Genbank: AB083803.1).

O subgrupo A6 foi formado por dois isolados oriundos de Rondônia (amostra 18 e 56) pertencentes ao mesmo município (Ouro Preto do Oeste).

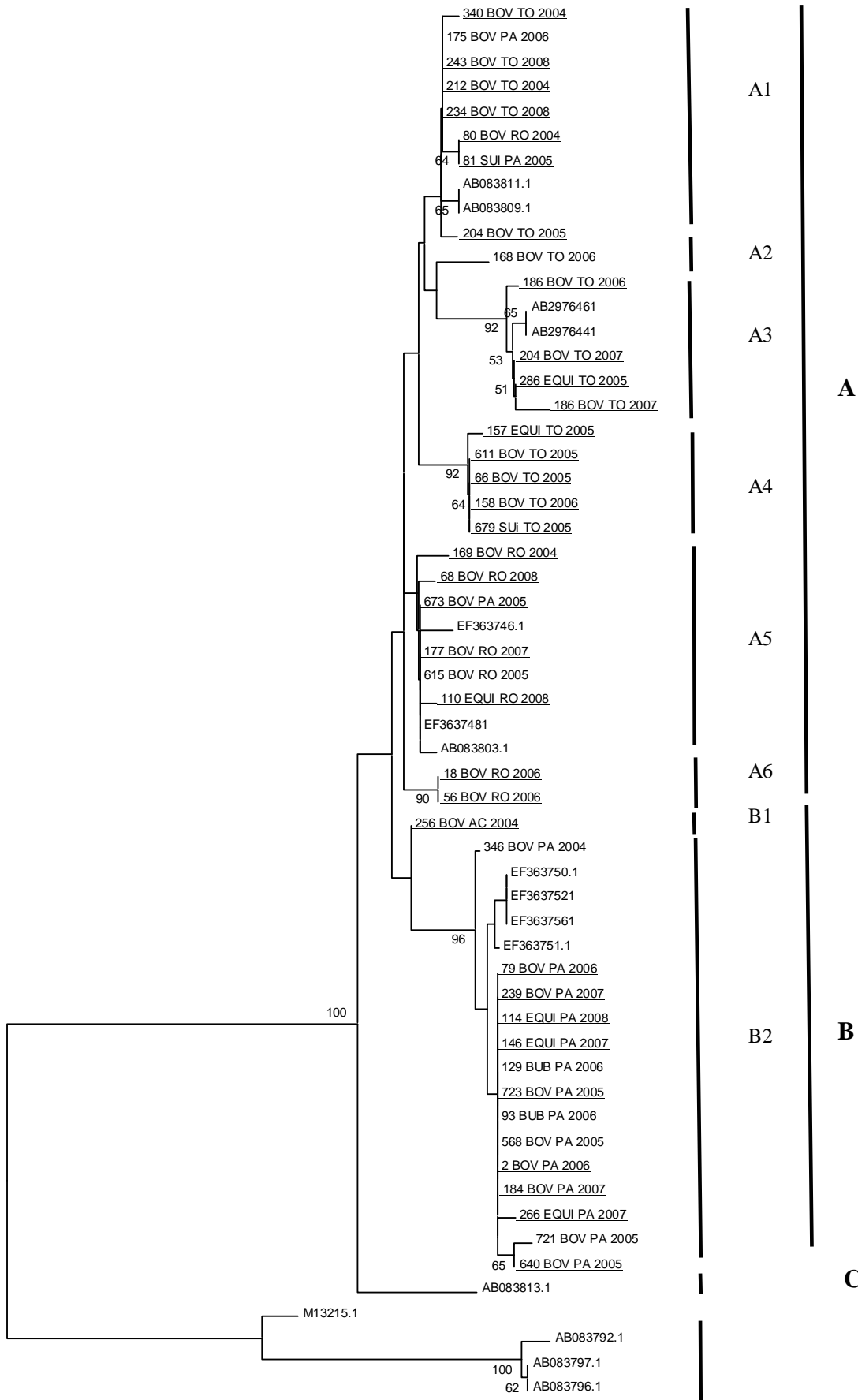
Na sublinhagem B estão os subgrupos B1 e B2. O subgrupo B1 é formado por um único isolado bovino (256) oriundo do Acre.

O subgrupo B2 é integrado pelas amostras 146, 114, 79, 2, 723, 93, 266, 184, 239, 568, 129, 721, 640, 346 isolados originários do Nordeste Paraense oriundo dos municípios de Viseu e Augusto Corrêa em 2004 e 2005 no Estado do Pará (Genbank: EF363750.1, EF 363751.1, EF363756.1, EF363752.1).

A sublinhagem genética C é composta por um único isolado procedente do Alto Taquari no Estado do Mato Grosso (Genbank: AB083813.1).

Na figura 10 estão demonstradas geograficamente as possíveis linhagens virais encontradas no presente estudo. Excetuando-se um isolado bovino procedente de Campo Novo de Rondônia (177), pertencente ao subgrupo A5, o referido município já havia sido identificado no subgrupo A1, uma vez que não é possível marcar com duas cores uma mesma localidade.

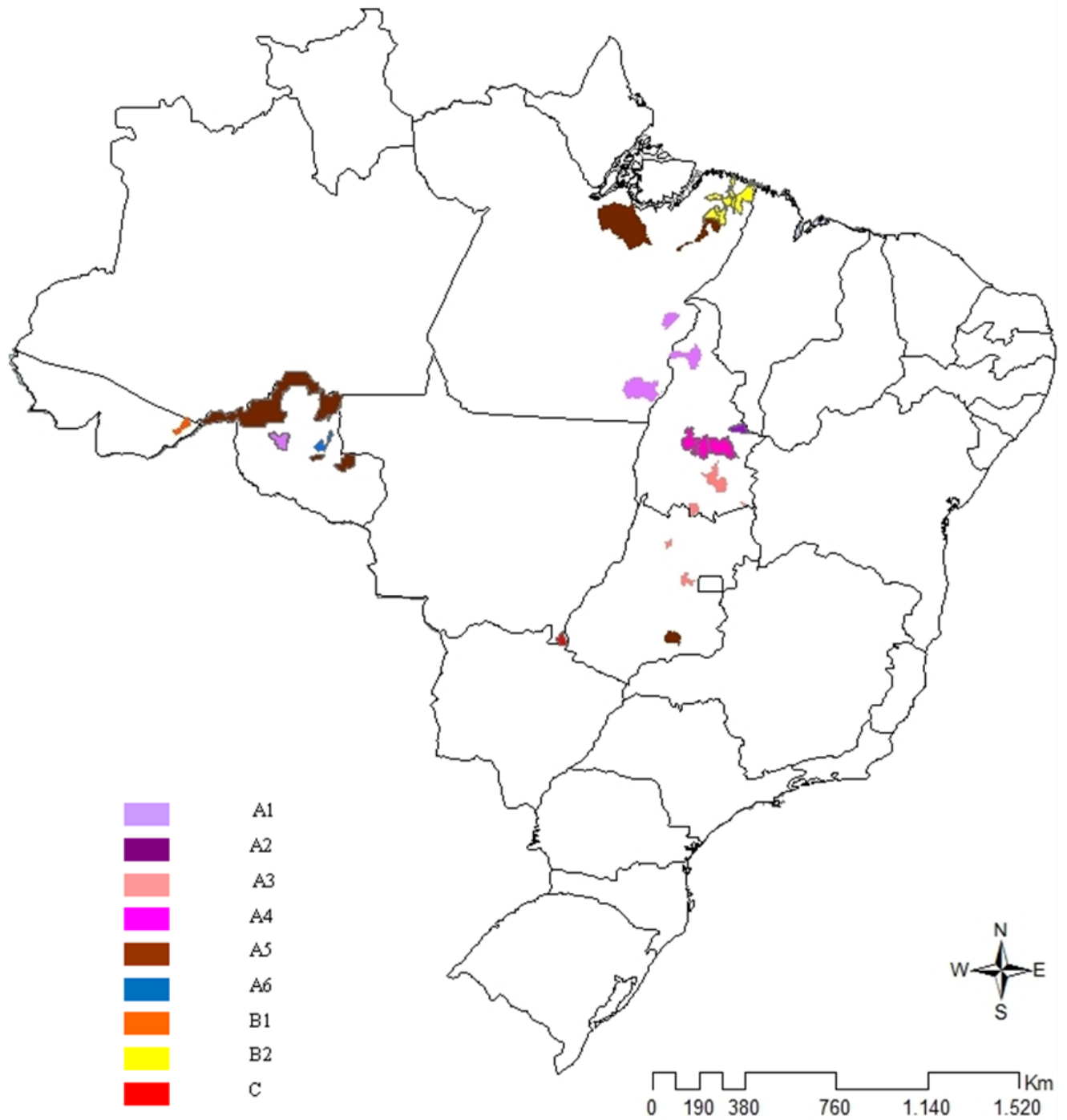
Figura 9 - Árvore filogenética de distância para uma região de alinhamento de 172 nucleotídeos do gene N do vírus da raiva. As amostras integrantes do presente estudo encontram-se sublinhadas identificadas pelo número de registro do LANAGRO, espécie, Estado de origem, ano de isolamento, as amostras extraídas do GenbankK estão apresentadas por seus números de acesso



VAg-3
Desmodus rotundus

Virus fixo
VAg-2
Canis familiaris

Figura 10 – Distribuição geográfica do vírus da raiva dos isolados obtidos do presente estudo as cores denotam os grupos formados no Dendograma com base no sequenciamento parcial do gene N



4.3.2 Gene G

O sequenciamento do fragmento de 914 nucleotídeos resultou em sequências de 627 a 887 nucleotídeos, tendo-se obtido alinhamento de 587 nucleotídeos, as mesmas foram submetidas ao BLASTn.

O padrão de agregação obtido na árvore filogenética, revelou dois *clusters* principais de amostras do vírus da raiva um relacionado à variante encontrada em morcego hematófago *Desmodus rotundus* (VAg3) e outro relacionado a variante comumente encontrada em cães (VAg2).

Na Figura 11 está ilustrado o dendrograma com base no sequenciamento parcial da proteína G.

As linhagens do presente estudo se agruparam em um cluster principal pertencente ao *Desmodus Rotundus*. Dentro desse cluster formaram dois grupos principais: grupo A, grupo B. O grupo A foi dividido em 5 subgrupos: subgrupo A1, inclui isolados bovinos (Genbank: AB247396.1, AB247385.1, e AB247382.1), sendo o primeiro isolado procedente de Nova Olinda e os demais de Araguaína, municípios do Estado de Tocantins. Nesse subgrupo agrupou-se também uma amostra obtida no presente estudo, procedente de Santa Maria das Barreiras, município da região sudeste do Pará. O referido subgrupo apresentou um valor de bootstrap de 94.

Dentro do subgrupo A2, a amostra 168 isolada de bovino oriundo de São Feliz do Tocantins agrupou-se com isolados obtidos de *Desmodus rotundus* e *Diphilla ecaudata* originários de São Miguel Tapuio no Piauí (Genbank: HM486903.1 e HM486902.1), sustentado por um valor de bootstrap de 98.

O subgrupo A3, é composto exclusivamente pelas amostras 186 (2007), 186 (2006) e 204 procedentes de diferentes localidades do Tocantins, sustentados por um valor de bootstrap de 99. Sendo que as amostras 186 (2006) e 204, segregaram dentro do referido subgrupo, com um valor de bootstrap de 85 e com uma identidade de nucleotídeos entre si de 100%. A amostra 186 (2007), proveniente de Natividade, possui uma identidade de nucleotídeos de 99,6, em relação às amostras 186 (2006) e 204.

Um quarto subgrupo aqui denominado denominado A4, sustentado por um valor de bootstrap de 91%, resultou do agrupamento das amostras 158 e 157, isoladas respectivamente de bovino e equídeo, procedentes do Estado do Tocantins, com um isolado bovino proveniente de Monte Alegre do Goiás (Genbank: AB247384.1).

O subgrupo A5, formado exclusivamente por dois isolados bovinos (Genbank: AB247394.1 e AB110667.1), provenientes do Mato Grosso, não inclui nenhuma amostra do presente estudo.

Dentro do subgrupo A6, inclui as amostras 110, 169, 177 e 168, procedentes de diversos municípios de Rondônia, as quais se relacionaram com isolados de equino, bovino, morcego hematófago *Desmodus Rotundus* (Genbank: AB110662.1, AB247383.1 e AB519642.1), sendo os dois primeiros isolados oriundos de Iporá e Mundo novo, municípios de Goiânia e o outro isolado originário de Águas de Lindóia do estado de São Paulo. O grupo está suportado por bootstrap de 80.

No grupo B, inclui as amostras 266, 93, 184, 723, 146, 129, referentes a esta pesquisa, procedentes de diversos municípios do Nordeste Paraense, agruparam-se com três isolados bovinos (Genbank: AB247399.1, AB247398.1 e AB247404.1), e um isolado humano (Genbank: AB247440.1), sustentado por valor 99 de bootstrap. No referido subgrupo houve a agregação, ainda, de dois isolados bovinos (Genbank: AB247391.1 e AB247402.1), esses isolados são originários de surtos de raiva ocorridos no Maranhão, esse subgrupo é suportado por um valor 94 de bootstrap.

O clusters 2 está relacionado à linhagem do vírus da raiva circulante em *Canis familiaris* (Genbank: AB110660.1, AB110658.1 e AB110659.1) e o cluster 3 está inserido o grupo externo (Genbank: EU293119.1).

Na Figura 12 estão demonstrados as linhagens virais encontradas no presente estudo, com exceção de um isolado originário de Águas de Lindóia do Estado de São Paulo (AB519642.1), pertencente ao subgrupo A6, em virtude do tamanho do município, que impediu sua visualização no mapa.

Figura 11 - Árvore filogenética de distância para uma região de alinhamento de 587 nucleotídeos do gene G do vírus da raiva. As amostras integrantes do presente estudo encontram-se sublinhadas identificadas pelo número de registro do LANAGRO, espécie, Estado de origem, ano de isolamento, enquanto que as amostras do GenbanK estão apresentadas por seus números de acesso

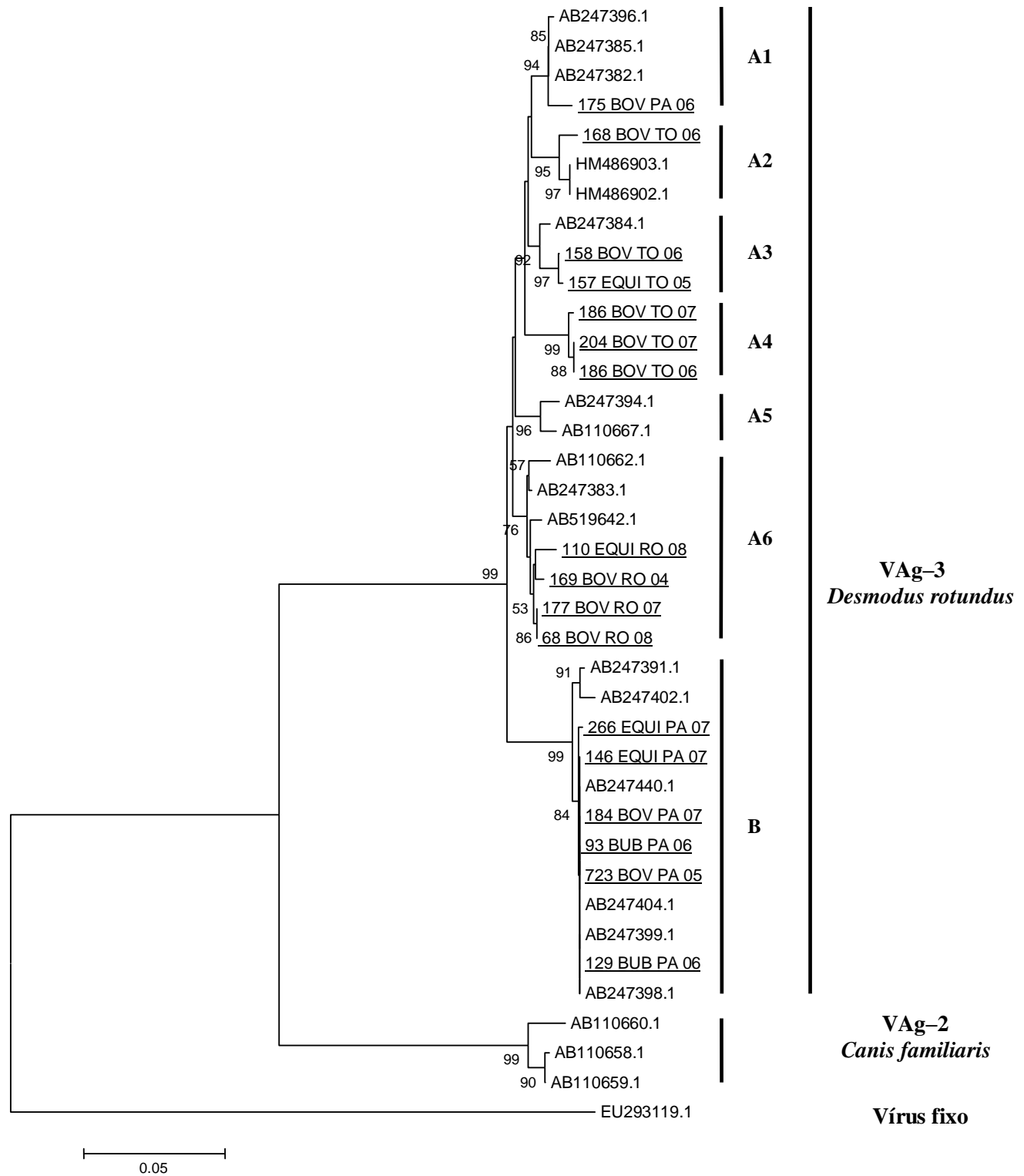
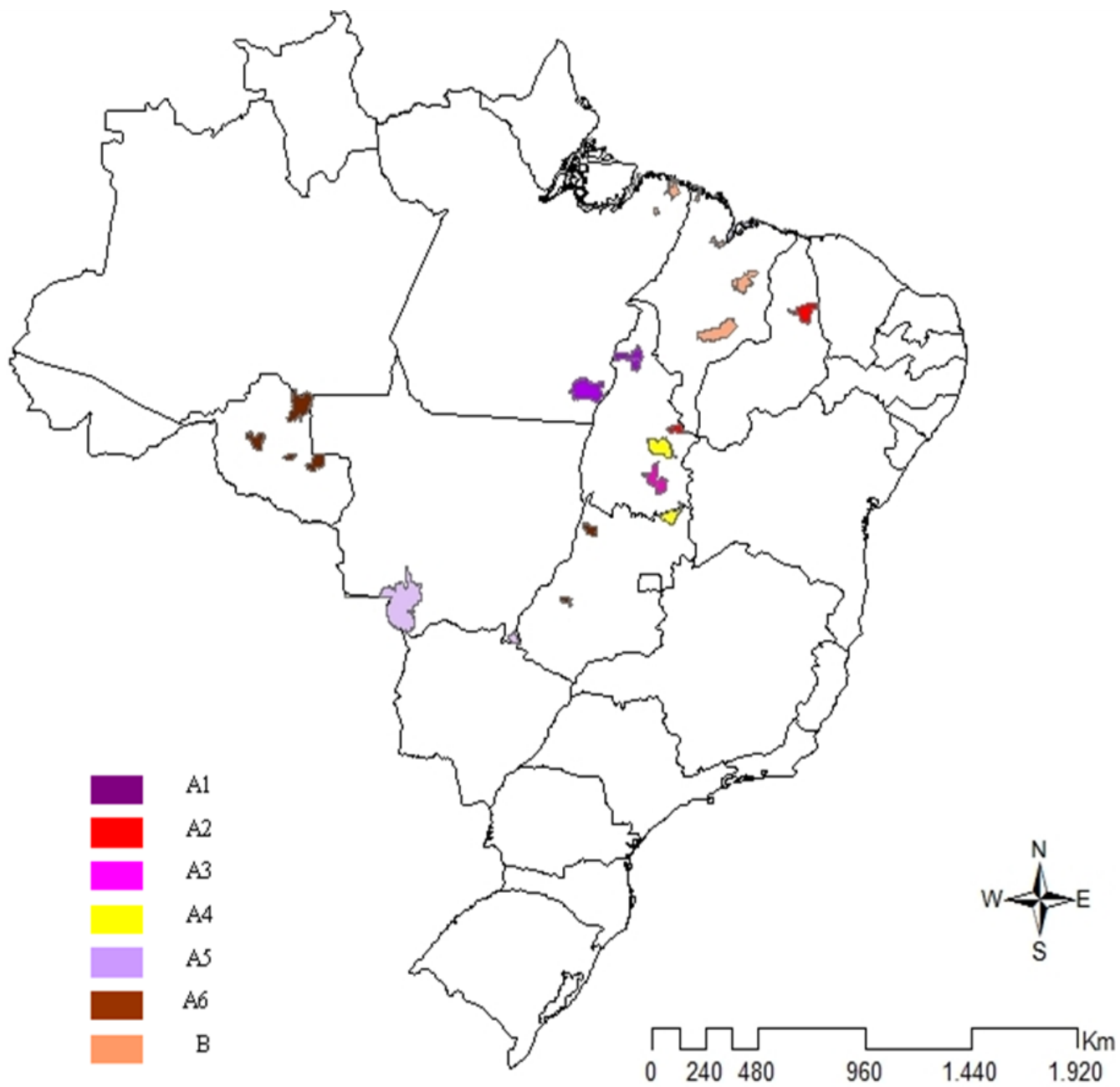


Figura 12 – Distribuição geográfica de vírus da raiva isolados do presente estudo. As cores denotam os grupos formados no Dendograma



4.4 CÁLCULO DE IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS

4.4.1 Gene N

As identidades em porcentagem entre nucleotídeos intergrupos encontrado para o gene N encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Identidade de nucleotídeos intragrupo obtidas no presente estudo

Grupos	Média (%)	Desvio Padrão (%)
A1	99,3	0,407
A2	NA	NA
A3	99,08	0,584
A4	99,76	0,302
A5	99,06	0,628
A6	100	0
B1	NA	NA
B2	99,38	0,534
C	NA	NA

NA: não se aplica

4.4.2 Gene G

As identidades em porcentagem entre nucleotídeos intergrupos encontrado para o gene G encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Identidade de nucleotídeos intragrupo obtidas no presente estudo

Grupos	Média (%)	Desvio Padrão (%)
A1	99,45	0,4461
A2	99,26	0,5680
A3	99,73	0,2065
A4	99,16	0,4926
A5	98,8	0
A6	99,05	0,4277
B	99,68	0,4252

4.5 ANÁLISE DE MUDANÇAS E MARCADORES MOLECULARES NAS SEQUÊNCIAS PUTATIVAS DE AMINOÁCIDOS

Quadro 6 – Nomenclatura, símbolos e abreviatura de 20 aminoácidos traduzidos a partir do código genético

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

Fonte: adaptado de Lodish et al., 2005 - São Paulo – 2012

4.5.1 Gene N

A análise foi realizada com dois alinhamentos diferentes. Em ambos foram alinhados 37 aminoácidos, sendo descartado a partir da cauda poli-A nos referidos alinhamentos. No primeiro alinhamento as sequências foram analisadas em relação ao vírus fixo PV (Genbank accession number M13215), encontrando-se quatro pontos variáveis e 33 pontos conservados (Figura 13 e Quadro 7).

No segundo alinhamento foram utilizados todos os isolados do referente estudo juntamente com as sequências retiradas do Genbank. Nesse segundo alinhamento os isolados foram agrupados de acordo com os grupos formados na filogenia.

Os isolados foram comparados em relação ao grupo B2, formado pelas amostras do Nordeste Paraense do presente estudo. Foram encontrados também quatro pontos variáveis e 33 pontos conservados (Figura 14, Quadro 8).

As substituições de aminoácidos observadas na região da nucleoproteína viral, não são descritos como sítios antigênicos na literatura.

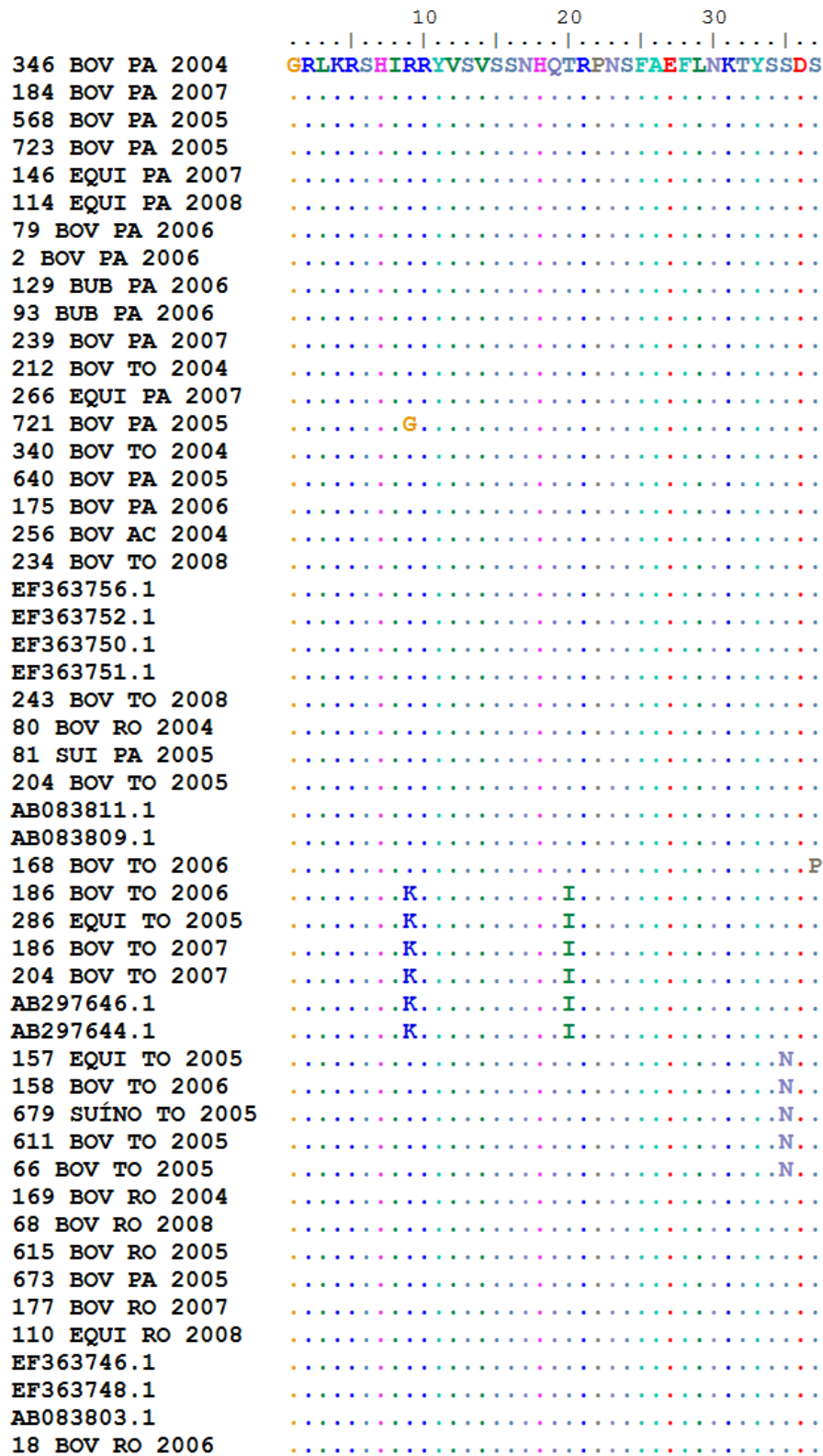
Figura 13 – Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene da proteína N dos isolados do presente estudo em relação ao vírus fixo PV (M13215)

	10	20	30
M13215	GRLKRS	HIRRYVSVSSNHQ	ARPNSEFLNKTYSSDS
212 BOV TO 2004	T.....
340 BOV TO 2004	T.....
175 BOV PA 2006	T.....
234 BOV TO 2008	T.....
243 BOV TO 2008	T.....
80 BOV RO 2004	T.....
81 SUI PA 2005	T.....
204 BOV TO 2005	T.....
168 BOV TO 2006	T.....P
186 BOV TO 2006K.....	I.....
286 EQUI TO 2005K.....	I.....
186 BOV TO 2007K.....	I.....
204 BOV TO 2007K.....	I.....
157 EQUI TO 2005	T.....N..
158 BOV TO 2006	T.....N..
679 SUÍNO TO 2005	T.....N..
611 BOV TO 2005	T.....N..
66 BOV TO 2005	T.....N..
169 BOV RO 2004	T.....
68 BOV RO 2008	T.....
615 BOV RO 2005	T.....
673 BOV PA 2005	T.....
177 BOV RO 2007	T.....
110 EQUI RO 2008	T.....
18 BOV RO 2006	T.....
56 BOV RO 2006	T.....
256 BOV AC 2004	T.....
346 BOV PA 2004	T.....
184 BOV PA 2007	T.....
568 BOV PA 2005	T.....
723 BOV PA 2005	T.....
146 EQUI PA 2007	T.....
114 EQUI PA 2008	T.....
79 BOV PA 2006	T.....
2 BOV PA 2006	T.....
129 BUB PA 2006	T.....
93 BUB PA 2006	T.....
239 BOV PA 2007	T.....
266 EQUI PA 2007	T.....
721 BOV PA 2005G.....	T.....
640 BOV PA 2005	T.....

Quadro 7 – Substituição de aminoácidos para a proteína N encontradas nos isolados obtidos no presente estudo em relação ao PV

Posição	PV	Mudança	Isolados	Classificação
10	R	R/K	186/06, 286, 186/07, 204/07	R: polar neutro
10	R	R/G	721	K: polar positivo
20	A	A/T	Todos os isolados exceto 186/06, 286, 186/07, 204/07	R: polar neutro
20	A	A/I	186/06, 286, 186/07, 204/07	G: polar neutro
35	S	S/N	157, 158, 679, 611, 66	A: apolar
37	S	S/P	168	T: polar neutro
				A: apolar
				I: apolar
				S: polar neutro
				N: polar neutro
				S: polar neutro
				P: apolar

Figura 14 - Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene N de todos os isolados utilizados na filogenia com exceção do grupo externo (M13215) e VAg – 2 (*Canis familiaris*)



Quadro 8 – Substituição de aminoácidos do gene N de todos os isolados utilizados na filogenia

Posição	PV	Mudança	Isolados	Classificação
9	R	R/G	721	R: polar neutro G: polar neutro
9	R	R/K	186/06, 286, 186/07, 204/07, AB297246.1, AB297244.1	R: polar neutro K: polar positivo
19	Q	Q/I	186/06, 286, 186/07, 204/07, AB297246.1, AB297244.1	Q: polar neutro I: apolar
35	S	S/N	157, 158, 679, 611, 66	S: polar neutro N: polar neutro
37	S	S/P	168	S: polar neutro P: apolar

4.5.2 Gene G

A análise foi baseada em dois alinhamentos diferentes, foram obtidas 17 sequências viáveis, tendo-se alinhados 587 nucleotídeos, correspondentes a 195 aminoácidos, abrangendo as posições 1 a 195 do gene G.

No primeiro alinhamento, em relação ao vírus fixo PV (Genbank accession number M13215), foram encontradas 23 mudanças em aminoácidos e 172 aminoácidos conservados, do total de 195 aminoácidos. Essas substituições encontradas foram não sinônimas (Figura 15 e Quadro 9).

No segundo alinhamento foram encontradas 13 mudanças em aminoácidos e 182 aminoácidos conservados, em relação aos 195 aminoácidos totais. Os isolados foram agrupados de acordo com os grupos formados na filogenia e comparados em relação ao grupo B, o qual é formado pelas amostras do Nordeste Paraense do presente estudo. Foi possível identificar nas posições dos aminoácidos assinaturas genéticas específicas para os grupos: grupo A2 (E137), grupo A3 (I6, V109), grupo A4 (I94) e grupo B (I48). Destaca-se que não foi possível identificar assinatura para o grupo A1 e A6. (Figura 16 e Quadro 10).

Não foram encontradas mudanças de aminoácidos nas sequências em regiões descritas como sítios antigênicos na literatura.

Figura 15 - Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene da proteína G dos isolados do presente estudo em relação ao vírus padrão PV (Genbank accession number : M13215)

(Continua)

```

      10      20      30      40      50      60      70
M13215.1  MVPQALLFVPLLVPPLCFGKFPPIYTIPTDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGFSYME LKVGYI
266 EQUI PA 07  .IL.....IS..L.....I.....
146 EQUI PA 07  .IL.....IS..L.....I.....
129 BUB PA 06   .IL.....IS..L.....I.....
93 BUB PA 06   .IL.....IS..L.....I.....
723 BOV PA 05  .IL.....IS..L.....I.....
184 BOV PA 07  .IL.....IS..L.....I.....
175 BOV PA 06  .IL.....F.ISS..L.....
186 BOV TO 07  .IL..I.....ISS..L.....
204 BOV TO 07  .IL..I..A...ISS..L.....
186 BOV TO 06  .IL..I..A...ISS..L.....
158 BOV TO 06  .IL.....ISS..L.....
157 EQUI TO 05 .IL.....ISS..L.....
168 BOV TO 06  .IL.....F.ISS..L.....
110 EQUI RO 08 .IL.....ISS..L.....
169 BOV RO 04  .IL.....ISS..L.....
177 BOV RO 07  .IL.....IS..L.....
68 BOV RO 08   .IL.....IS..L.....

```

```

      80      90      100     110     120     130     140
M13215.1  SAIKRNQFTCTGVVTEAETYTNEFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWKMAGDPRYEE SLHNPYPDYHW
266 EQUI PA 07  ...V.....I.....Q.....
146 EQUI PA 07  ...V.....I.....Q.....
129 BUB PA 06   ...V.....I.....Q.....
93 BUB PA 06   ...V.....I.....Q.....
723 BOV PA 05  ...V.....I.....Q.....
184 BOV PA 07  ...V.....I.....Q.....
175 BOV PA 06  ...V.....I.....Q.....
186 BOV TO 07  ...V.....V...T...Q.....
204 BOV TO 07  ...V.....V...T...Q.....
186 BOV TO 06  ...V.....V...T...Q.....
158 BOV TO 06  .S..V.....I.....I.....Q.....
157 EQUI TO 05 .S..V.....I.....I.....Q.....
168 BOV TO 06  ...V.....I.....Q...E...
110 EQUI RO 08  ...V.....I.....Q.....
169 BOV RO 04  ...V.....I.....Q.....
177 BOV RO 07  ...V.....I.....Q.....
68 BOV RO 08   ...V.....I.....Q.....

```

(Conclusão)

	150	160	170	180	190
M13215.1	LR	TVKTTKE	SLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPGGNC	SGVAVSSTYC	STNHDYT
266 EQUI PA 07		I	K	K.L.IT	
146 EQUI PA 07		I	K	K.L.IT	
129 BUB PA 06		I	K	K.L.IT	
93 BUB PA 06		I	K	K.L.IT	
723 BOV PA 05		I	K	K.L.IT	
184 BOV PA 07		I	K	K.L.IT	
175 BOV PA 06		I	K	K.L.IT	
186 BOV TO 07		I	K	K.L.IT	
204 BOV TO 07		I	K	K.L.IT	
186 BOV TO 06		I	K	K.L.IT	
158 BOV TO 06		I	K	K.L.IT	
157 EQUI TO 05		I	K	K.L.IT	
168 BOV TO 06		I	K	K.L.IT	
110 EQUI RO 08		I	K	K.L.IT	
169 BOV RO 04		I	K	K.L.IT	
177 BOV RO 07		I	K	K.L.IT	
68 BOV RO 08		I	K	K.L.IT	

Quadro 9 – Substituição de aminoácidos para a proteína G dos isolados do presente estudo em relação ao PV (Genbank accession number : M13215)

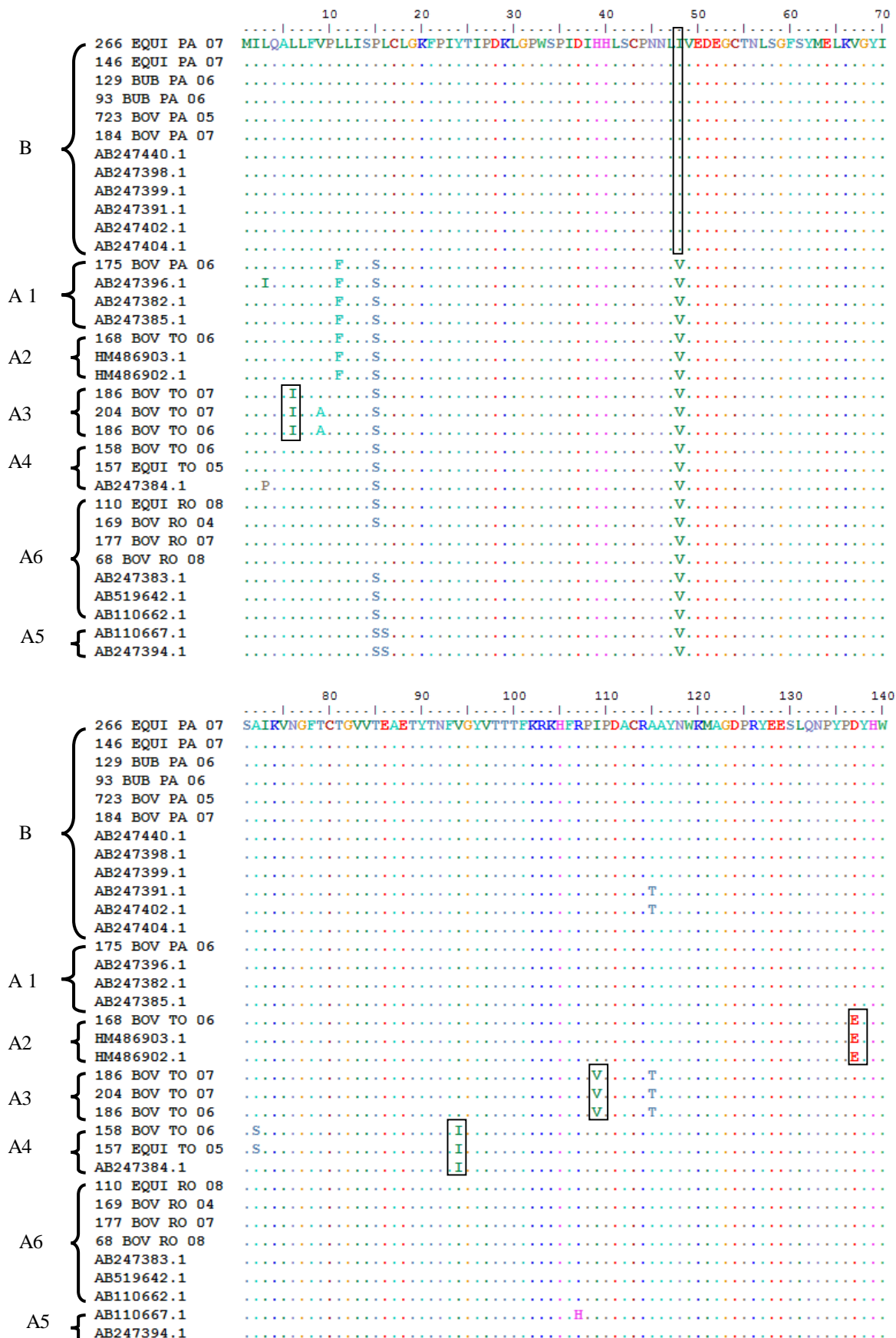
(Continua)

Posição	PV	Mudança	Isolados	Classificação
2	V	V/I	Todos os isolados	V: apolar I: apolar
3	P	P/L	Todos os isolados	P: apolar L: apolar
6	L	L/I	186/06, 186/07 e 204/07	L: apolar I: apolar
9	V	V/A	204,186/06	V: apolar A: apolar
11	L	L/F	175 e 168	L: apolar F: apolar
13	V	V/I	Todos os isolados	V: apolar I: apolar
14	F	F/S	Todos os isolados	F: apolar S: polar neutro
15	P	P/S	175, 186/07, 204, 186/06, 158, 157, 168, 110, 169	P: apolar S: polar neutro
18	F	F/L	Todos os isolados	F: apolar L: apolar
48	V	V/I	266, 146, 129, 93, 723, 184	V: apolar I: apolar
72	A	A/S	158, 157	A: apolar S: polar neutro
75	M	M/V	Todos os isolados	M: apolar V: apolar

(conclusão)

Posição	PV	Mudança	Isolados	Classificação
94	V	V/I	158, 157	I: apolar T: polar neutro
109	T	T/I	Todos os isolados exceto 186/07, 204/07, 186/07	I: apolar T: polar neutro
109	T	T/V	186/07, 204/07, 186/07	V: apolar A: apolar
115	A	A/T	186/07, 204/07, 186/07	T: polar neutro H: polar positivo
132	H	H/Q	Todos os isolados	Q: polar neutro D: polar negativo
136	D	D/E	168	E: polar negativo V: apolar
151	V	V/I	Todos os isolados	I: apolar R: polar neutro
166	R	R/Q	Todos os isolados	Q: polar neutro N: polar neutro
177	N	N/Q	Todos os isolados	Q: polar neutro S: polar neutro
179	S	S/L	Todos os isolados	L: apolar V: apolar
181	V	V/I	Todos os isolados	I: apolar A: apolar
182	A	A/T	Todos os isolados	T: polar neutro

Figura 16 - Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene G de todos os isolados utilizados na filogenia com exceção do grupo externo (EU293119.1) e VAg - 2 (*Canis familiaris*)



	150	160	170	180	190
266 EQUI PA 07	LRTVKTTRKESLIISPSVADLDPYDKSLH	SRVFPQOKCLGITVSSTYCS	TNEDYT		
146 EQUI PA 07					
129 BUB PA 06					
93 BUB PA 06					
723 BOV PA 05					
184 BOV PA 07					
AB247440.1					
AB247398.1					
AB247399.1					
AB247391.1					
AB247402.1					
AB247404.1					
175 BOV PA 06					
AB247396.1					
AB247382.1					
AB247385.1					
168 BOV TO 06					
HM486903.1					
HM486902.1					
186 BOV TO 07					
204 BOV TO 07					
186 BOV TO 06					
158 BOV TO 06					
157 EQUI TO 05					
AB247384.1					
110 EQUI RO 08					
169 BOV RO 04					
177 BOV RO 07					
68 BOV RO 08					
AB247383.1					
AB519642.1					
AB110662.1					
AB110667.1					
AB247394.1					

Quadro 10 - Substituições de aminoácidos do gene G de todos os isolados utilizados na filogenia

(Continua)

Posição	Grupo 1	Mudança	Isolados	Classificação
3	L	L/I	AB247396.1	L: apolar I: apolar
3	L	L/P	AB247384.1	L: apolar P: apolar
6	L	L/I	Grupo 4	L: apolar I: apolar
8	F	F/A	Grupo 4 exceto 186/07	F: apolar A: apolar
10	P	P/F	Grupo 2 e 3	P: apolar F: apolar
15	P	P/S	Todos os grupos exceto 177 e 168	P: apolar S: polar neutro
16	L	L/S	Grupo 7	L: apolar S: polar neutro
48	I	I/V	Todos os grupos	I: apolar V: apolar

(conclusão)

Posição	Grupo 1	Mudança	Isolados	Classificação
72	A	A/S	Grupo 5 exceto AB247384.1	A: apolar S: polar neutro
94	V	V/I	Grupo 5	V: apolar I: apolar
107	R	R/H	AB110667.1	R: polar neutro H: polar positivo
109	I	I/V	Grupo 4	I: apolar V: apolar
115	A	A/T	AB247402.1, AB247404.1, grupo 4	A: apolar T: polar neutro
137	D	D/E	Grupo 3	D: polar negativo E: polar negativo

5 DISCUSSÃO

As técnicas moleculares permitem a identificação do reservatório da doença, desempenhando dessa forma um importante papel no esclarecimento da epidemiologia da raiva (ITO et al., 2001, 2003).

Heaton et al. 1997, relata que o uso de primer específico para a região da nucleoproteína aumenta a possibilidade de sucesso para detecção do vírus da raiva. Pois esse gene é o mais conservado em relação aos outros genes que compõem o genoma.

Apesar da técnica de RT-PCR não ser preconizada pela OMS como instrumento para o diagnóstico de raiva, diversos autores afirmam sua alta sensibilidade (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKY, 1996; HEATON, 1997).

Nos últimos anos a técnica começou a ser utilizada no Brasil, com fins principalmente de pesquisa genética (ITO et al., 2001; SOARES et al., 2002; ROMIJN et al., 2003; DANTAS JUNIOR et al., 2004).

No presente estudo foi encontrado uma discrepância nos resultados obtidos pela RT-PCR, 83% positivos para a nucleoproteína e 50% positivos para a glicoproteína.

Macedo et al. (2006), utilizando os mesmos primers referente ao gene N, aqui estudados, trabalhando com 9 amostras de biópsia de pele procedentes de nove pacientes humanos do surto de raiva ocorrido em Augusto Corrêa no Pará, encontraram 77,7 % de positividade, similares com os resultados aqui apresentados.

Em contrapartida Carnieli et al. (2006), analisando amostras de animais silvestres e domésticos, procedentes do Nordeste do Brasil, utilizando os mesmos primers referente ao gene G do presente estudo, encontraram 100% de positividade.

Estudos realizados por Barbosa et al. (2007) e Castilho et al. (2010a), encontraram 100% de positividade na RT-PCR direcionado para um segmento do gene N. É válido ressaltar que o segmento utilizado por esses autores é diferente da região aqui trabalhada.

Embora as técnicas moleculares apresentem grandes vantagens, seu uso na rotina apresenta algumas dificuldades, relacionadas a fatores interferentes que comprometem seu bom desempenho diagnóstico, tais como qualidade e estado de conservação da amostra, presença de inibidores (como RNAses) e o tamanho de segmento do gene alvo (MACEDO et al., 2006; KRIEG; JONHSON, 1996).

Segundo Araújo et al. (2008) a temperatura ótima de conservação do RNA é de -80C e temperaturas superiores degradam o RNA viral. Esse autor sugere que amostras armazenadas a -20C, interfere nos resultados. É importante destacar que as amostras aqui analisadas foram armazenadas a -20C. Todavia esse fator é pouco relevante porque os resultados obtidos no segmento da nucleoproteína demonstram que o RNA não foi degradado (50 amostras positivas para o gene N). Ressalta-se que 10 amostras foram negativas em ambos os genes, portanto nestes resultados, esse fator referido acima poderá ter sido uma provável causa dos resultados obtidos de RT-PCR, nas referidas amostras.

Um fator adicional para considerar é a presença de RNAses, as quais podem conduzir a resultados falso-negativos (KRIEG; JONHSON, 1996), em decorrência da degradação de RNA. Entretanto as amostras aqui analisadas foram manipuladas nas mesmas condições dos controles positivos, os quais funcionaram corretamente com os pares de primers específicos para cada gene em cada reação realizada.

Em referência a disparidade de resultados negativos obtidos da RT-PCR do gene G em relação ao gene N, é importante assinalar que as amostras foram congeladas e descongeladas diversas vezes, para fins de repetição. É Sabido que o vírus RNA é bastante sensível as condições ambientais do que os vírus de DNA (BELÁK; BALLAGI-PORDÁNY, 1993). Portanto este fator pode ser um fato relevante para se considerar.

Destacar-se ainda que a glicoproteína está diretamente envolvida em ligação aos receptores celulares, é alvo para neutralização viral e importante para a patogenicidade do vírus da raiva apresentando uma maior taxa de mutação (KISS et al., 1999; WUNNER, 2007).

Dessa forma, divergências nos sítios de anelamento dos primers podem ser uma provável causa pela não amplificação das referidas amostras direcionadas para o gene da Glicoproteína.

Embora existam diversos estudos sobre epidemiologia da raiva, mediante sequenciamento nucleotídico dos genes N e G a partir de isolados de diferentes regiões do Brasil, existem poucas análises da região Norte do Brasil, principalmente de herbívoros e suínos.

No Brasil, se consideramos o número de casos notificados de raiva em herbívoros e suínos no período de 1996 a setembro de 2011, os Estados do Tocantins, Pará, Rondônia e Acre foram responsáveis por 4366, 750, 405 e 376 casos respectivamente (BRASIL, 2012). Esses dados demonstram a importância de estudos epidemiológicos na região Norte do Brasil.

Além disso acrescenta-se que o Brasil é dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo. A bubalinocultura está se desenvolvendo no país como uma alternativa rentável e saudável, sendo importante assinalar que a região norte é a maior produtora de búfalos do País, com destaque para o Pará. Esse Estado responde por 39% do rebanho nacional de bubalinos do País. A suinocultura do Brasil, por sua vez, ocupa o quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína (BRASIL, 2008).

A raiva dos herbívoros é, portanto, um problema de saúde pública e difícil de ser dimensionado (KOTAIT et al., 1998). Estudos moleculares nos permitem auxiliar na melhoria e desenvolvimento de medidas de controle mais eficazes.

No estado do Pará existem dois laboratórios responsáveis pelo diagnóstico de raiva, o Instituto Evandro Chagas (IEC) e o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO). O segundo laboratório recebe uma maior demanda de herbívoros e suínos do Estado referido, porém não são empregadas técnicas de biologia molecular no diagnóstico. Dessa forma existe pouco conhecimento sobre a atual situação da epidemiologia do vírus da raiva nesses animais sob o ponto de vista molecular. Ressalta-se ainda, que este estudo é o primeiro realizado com amostras provenientes do LANAGRO, e colabora no esclarecimento sobre as linhagens distintas circulantes na região Norte do País e a relação dessas linhagens com a origem geográfica.

A análise filogenética dos genes N e G demonstraram que todos os isolados estão relacionados à linhagem circulante em morcegos hematófagos.

Esses resultados corroboram com diversos estudos realizados em diferentes regiões geográficas do Brasil, de isolados bovinos e outros animais herbívoros e também humanos (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; CASTILHO et al. 2010a; MATTA et al., 2010; MOCHIZUKI et al., 2012).

É importante assinalar que, no Brasil e toda América Latina, o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é responsável pela grande maioria dos casos de transmissão do VR para o gado herbívoro e milhares de casos de raiva são diagnosticados (CARNIELI et al., 2009; CASTILHO et al., 2010a).

Em referência ao presente trabalho, a análise filogenética baseada no gene N sugere que os isolados de Pará e Rondônia estão relacionados, porém o valor de bootstrap obtido é abaixo de 50 e portanto a relação genética entre estes isolados ainda requer investigações.

A escassez de sequências disponíveis no Genbank, dificultou de certa forma a análise filogenética das amostras aqui estudadas e, provavelmente, se fosse possível incorporar mais sequências dessa região geográfica a filogenia ficaria melhor resolvida, com valores de bootstrap maiores para suportar as sublinhagens sugeridas.

A análise filogenética dos isolados desse estudo permitiu identificar linhagens distintas circulantes nos estados do Pará, Tocantins e Rondônia.

Em ambas as filogenias foi possível detectar duas linhagens distintas circulantes no Pará uma na região Nordeste e outra na região Sudeste. Essa diversidade encontrada deve ser provavelmente pela distância geográfica entre as duas mesorregiões, a qual permitiu a formação de grupos distintos. Conforme foi observado na filogenia.

Esses resultados condizem com os relatados por Travassos da Rosa et al. (2006), que realizaram uma análise de 6 isolados humanos (5 originários de Portel e um isolado originário de Viseu, municípios do Pará) e sugeriram a existência de linhagens de acordo com a região geográfica atribuindo essa diversidade à distância entre os dois municípios (530km).

Barbosa et al. (2007) trabalhando também com amostras originárias do Pará, sugerem que o VR relacionado a morcegos hematófagos tende a obedecer um padrão geográfico, pois a filogenia por eles obtida demonstrou 3 subclades distintas (I-a, I-b, I-c): duas delas (I-a e I-b) circulando nas regiões paraenses do Sudeste, Nordeste e Baixo Amazonas, enquanto a linhagem I-c restringia-se à ilha do Marajó.

Na filogenia do gene N, as linhagens encontradas na região Nordeste do Pará, agregaram no mesmo grupo de surto de isolados humanos e bovinos, ocorridos em 2004 e 2005, procedentes de Portel e Augusto Corrêa no Estado do Pará. Enquanto que na filogenia do gene G, as linhagens encontradas agregaram no mesmo grupo de isolados obtidos de humanos e bovinos ocorridos em 2004 e 2005 nos municípios de Goldofredo Viana, Capinzal do Norte e Viana oriundos no Maranhão (SATO et al., 2006; CASTILHO et al., 2010a).

Segundo Barbosa et al. (2007), há proximidade geográfica do Pará com Maranhão e o intenso fluxo de imigrantes e seus animais domésticos entre as duas regiões (Norte-Nordeste). Esse fato pode explicar a presença de linhagens similares nos Estados referidos acima.

De acordo com Gonçalves et al. (2002), no Nordeste do Brasil durante a estação seca é comum o transporte de bovinos para regiões diferentes, objetivando salvar esses animais da fome e seca. Pode-se sugerir que os animais transportados, estariam no período de incubação da doença, pois é sabido que o vírus da raiva possui um período de incubação muito variável e que muitos fatores estão associados a esse fato, tais como amostra do vírus envolvida, carga viral inoculada, imunidade do animal agredido (RODRIGUEZ et al., 2007).

Deve-se destacar principalmente que os morcegos hematófagos, apesar de formarem colônias relativamente estáveis, costumam visitar regularmente abrigos vizinhos, o que de certa forma promove uma comunicação indireta entre a maioria das colônias de uma determinada área (LORD, 1988). Em razão deste aspecto da ecologia do *D. rotundus*, a disseminação da raiva nesta espécie é mantida através do contato entre indivíduos infectados de uma colônia e indivíduos suscetíveis de outra (LORD, 1988; MCCOLL et al., 2000).

É válido ressaltar que o *D. rotundus* possui uma estrutura social baseada numa hierarquia de dominância, onde machos subordinados são expulsos ou obrigados a percorrer longas distâncias para se alimentar, de modo que sua área de alimentação pode coincidir com os de outra colônia (WILKINSON, 1998).

Destaca-se ainda que nos surtos de raiva humana que ocorreram no Brasil e Peru, as características mais comumente encontradas foram as mudanças ambientais induzidas pelo homem, essas mudanças alteram o habitat natural dos morcegos, fazendo com que eles se desloquem para áreas peri-urbanas (SCHNEIDER et al., 2001). Esses fatores podem explicar a presença da mesma linhagem nos dois estados.

Uma possível relação filogenética entre isolados de Rondônia e outras regiões geográficas distantes, ainda precisa de esclarecimento. A hipótese de que a semelhança genética entre isolados geograficamente distantes possa ser explicada pelo deslocamento do *D. rotundus*, perde força, pois de acordo com estudos sobre a biologia de quirópteros hematófagos, existem registros de que distância máxima que podem percorrer é de 20 km (CRESPO et al., 1961; GREENHALL; SCHMIDT, 1988; MEDINA et al., 2007), sendo a distância entre os estados superior ao parâmetro máximo de mobilidade desses animais.

Entretanto, sabe-se que o Brasil é dividido em circuitos pecuários, sendo os Estados do Pará e Rondônia pertencente ao mesmo circuito. Nos referidos circuitos ocorre comercialização entre os setores produtivos da pecuária (BRASIL, 2006). Fato que pode explicar os resultados aqui encontrados.

Em referência a filogenia proposta para a glicoproteína foi sugerido que as amostras 169, 177, 68 e 110 originárias de Rondônia têm similaridade genética com as amostras de Goiânia e São Paulo, com uma identidade nucleotídica entre eles acima de 98%.

Quando comparada a relação filogenética proposta para as amostras de Rondônia, se observam sutis diferenças entre o gene da glicoproteína e nucleoproteína. No primeiro caso as amostras desse estado ficaram relacionadas com amostras de Pará e no segundo, como já foi mencionado linhas acima com amostras de Goiânia e São Paulo.

No Estado do Tocantins a análise filogenética demonstrou 4 linhagens distintas circulantes. Essas linhagens foram geograficamente bem definidas e distribuídas de acordo com o município de origem.

Kobayashi et al. (2006, 2008), analisando também isolados originários do Tocantins, encontraram distintas linhagens, distribuídas entre diferentes bacias hidrográficas.

As linhagens estudadas de isolados bovinos obedecia a um padrão geográfico, sendo a distribuição dessas linhagens determinadas por barreiras geográficas, como rios e cadeias de montanhas.

Estudos realizados por Matta et al. (2010), sugerem que a presença de rios e refúgios adequados foram reconhecidos como importantes fatores no delineamento da incidência e disseminação da raiva dos bovinos transmitida por morcegos hematófagos. Grande parte das amostras analisadas no seu estudo foi isolada de áreas adjacentes ligadas por rios, estando de acordo com observações epizooticas da raiva bovina, sendo que muitas amostras caracterizadas como mesma linhagem estavam distribuídas ao longo do mesmo rio. Esses achados sugerem que a tendência de distribuição de linhagens esteja relacionada ao comportamento dos morcegos hematófagos, estando a disseminação do VR relacionada a sua migração (MATTA et al., 2010). Esses resultados foram semelhantes os aqui encontrados. Entretanto, no presente trabalho não foram feitas identificações de barreiras geográficas para explicar o isolamento das linhagens aqui encontradas.

Além disso, Kobayashi et al. (2006, 2008), sugeriram que as características epidemiológicas da raiva em bovinos não está só associada a características geográficas, e sim também a características topográficas onde os bovinos são mantidos e os aspectos relacionados à ecologia dos morcegos.

Carnieli et al. (2009), analisando amostras brasileiras, utilizando técnicas moleculares, demonstraram que os vírus isolados de bovinos foram também separados por barreiras geográficas.

Essa hipótese de Kobayashi foi confirmada também por Hirano et al. (2010), analisando 204 isolados de herbívoros e suínos, nos quais identificaram-se 2 linhagens

circulando, uma na região Sul e outra na região Norte do Estado de Goiás, sendo que cada linhagem foi encontrada ao lado de cadeias de montanhas.

Ressalta-se que a raiva transmitida por morcegos não ameaça só os herbívoros, mas também os seres humanos, conseqüentemente são necessários mais estudos epidemiológicos, principalmente na região nordeste do Brasil (SATO et al., 2006).

Destaca-se que o *Desmodus rotundus* possui uma distribuição generalizada, esta espécie tem sido a causa de perdas financeiras significativas no setor da pecuária (SCHNEIDER et al., 2009).

A raiva em morcegos hematófagos representa uma doença endêmica, dessa forma, o controle regional da raiva em morcegos é uma opção viável para a eliminação da raiva humana e animal (MOCHIZUKI et al., 2012).

Entretanto, a referida espécie vive em colônias e se refugia em ambientes naturais, que são de difícil acesso (ARELLANO SOTA, 1988). Em decorrência disso fica mais difícil fazer o controle dessa espécie.

Em referência aos resultados encontrados no presente trabalho, foi observado na filogenia do gene G, o agrupamento de isolado bovino procedente de São Félix do Tocantins em 2006, com isolados de *Diphylla ecaudata* e *Desmodus rotundus* oriundo de São Miguel Tapuío no Piauí em 2004 com uma identidade nucleotídica de 98,9 (CASTILHO et al., 2010b).

Deve salientar-se que existe uma interação interespecífica que permite que morcegos não hematófagos sejam infectados com a variante antigênica circulante em *Desmodus rotundus* (KOBAYASHI et al., 2007; CASTILHO et al., 2010b).

Acrescenta-se ainda que são necessários mais estudos para verificar o envolvimento dos morcegos não hematofágos no ciclo aéreo, e quais os riscos de infecção para seres humanos (KOBAYASHI et al., 2007; CASTILHO et al., 2010b).

Embora nenhum caso de raiva humana associado com morcegos insetívoros tenha sido relatado no Brasil até o presente momento, mais ocorreram casos nos EUA associados com as espécies insetívoras (MESSENGER et al., 2003; RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

Em referência para o polimorfismo da nucleoproteína, foram encontradas quatro mudanças de aminoácidos, essa região mostrou-se bem conservada. Isso é o esperado, já que essa proteína é a mais conservada dos *lissavírus*, está intimamente associada ao RNA viral é importante para o encapsidamento e proteção do genoma (TORDO, 1996; RODRIGUEZ, 2007; WUNNER, 2007).

Para o gene G como já foi explicado, foi possível identificar nas posições dos aminoácidos assinaturas moleculares específicas para os grupos: grupo A2 (E137), grupo A3 (I6, V109), grupo A4 (I94) e grupo B (I48). Destaca-se que não foi possível identificar assinatura para o grupo A1 e A6.

É interessante assinalar, no entanto, que estudos adicionais tornam-se necessários, incluindo a caracterização molecular completa dos genes N e G, com a finalidade de explicar a emergência de novas linhagens virais como resultado de fatores associados à região geográfica e fatores seletivos associados ao hospedeiro.

Estudos de epidemiologia molecular são de extrema importância, não só para conhecer os reservatórios envolvidos no ciclo da raiva, como para identificar possíveis agregações de linhagens e desvendar padrões geográficos e topográficos envolvidos na agregação dessas linhagens, e que influenciam nos padrões de disseminação do vírus em determinadas regiões.

A existência de numerosas espécies de morcegos, distribuídas amplamente no território brasileiro, torna a história natural da raiva em morcegos uma questão ainda a esclarecer, assim como a manutenção de linhagem do VR em determinadas espécies de morcegos insetívoros e determinando a transposição para outras espécies animais (*spill-over*) (ROMJIN et al., 2003).

Considerando o grande número de espécies de morcegos existentes no Brasil, é provável que existam linhagens do VR ainda desconhecidas (KOBAYASHI et al., 2006).

Destaca-se ainda que existe uma carência muito grande no banco de dados de sequências de isolados herbívoros e morcegos hematófagos provenientes da região Norte e Nordeste do Brasil, e que mais estudos são necessários para esclarecer a epidemiologia da raiva nessas regiões.

Os dados obtidos com esse estudo por meio da análise molecular corroboram com o perfil epidemiológico da raiva, visto que os resultados demonstraram que o morcego hematófago é o grande transmissor do vírus da raiva para os herbívoros e suínos.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados e discussões anteriores pode-se concluir que:

- Com base nos sequenciamentos parciais dos genes N e G, de isolados de vírus da raiva de herbívoros e suínos procedentes da Amazônia Brasileira observou-se a circulação da linhagem comumente encontrada em morcego hematófago *Desmodus rotundus*;
- As genealogias obtidas com os sequenciamentos parciais dos genes N e G, demonstraram diferentes sublinhagens, sendo essas relacionadas á região geográfica;
- Foram identificados marcadores moleculares específicos nas sequencias putativas de aminoácidos da glicoproteína para os grupos A2, A3, A4 e B que permite distinção de amostras virais de diferentes regiões geográficas.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Rabia. In: _____. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. v. 2, p. 351-383.
- ARAÚJO, D. B.; LANGONI, H.; ALMEIDA, M. F.; MEGID, J. Heminested reverse-transcriptase polymerase as a tool for rabies vírus detection in stored and decomposed samples. **BMC Research Notes**, v. 1, n. 17, p. 1-6, 2008.
- ARELLANO-SOTA, C. Biology, ecology and control of the vampire bat. **Reviews of Infections Diseases**, v. 10, p. 615-619, 1988. Suplemento 4.
- BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, O.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268-3276, 2001.
- BARBOSA, T. F. S.; MEDEIROS, D. B. A.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; CASSSEB, L. M. N.; MEDEIROS, R.; PEREIRA, A. S.; VALLINOTO, A. C. R.; VALLINOTO, M.; BEGOT, A. L.; LIMA, R. J. S.; VASCONCELOS, P. F. C.; NUNES, M. R. T. 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, p. 228–236, 2008.
- BARBOSA, T. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; MEDEIROS, D. B. A.; CASSSEB, L. M. N.; PEREIRA, A. S.; BEGOT, A. L.; LIMA, R. J. S.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Molecular epidemiology of rabies virus in Para state during 2000 to 2005: emergence and transmission by hematophagous bats (*Desmodus rotundus*). **Caderno Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 329-348, 2007.
- BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Rabies: a brief review. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.
- BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Veterinary Research Communications**, v. 17, p. 55-72, 1993.
- BELOTTO, A.; LEANES, L. F.; SCHNEIDER, M. C.; TAMAYO, H.; CORREA, E. Overview of rabies in the Americas. **Virus Research**, v. 111, p. 5-12, 2005.
- BRASIL. Tribunal de Contas da União. **Avaliação do Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa**. Brasília : TCU, Secretaria de Fiscalização e Avaliação de Programas de Governo, 2006, 40 p.
- _____. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de diagnóstico laboratorial de raiva**. Brasília: Editora do ministério da Saúde, 2008. 108 p.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Controle da Raiva dos Herbívoros**. Brasília: MAPA/ SDA / DAS, 2009. 122p.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. SITUACÃO EPIDEMIOLÓGICA DA RAIVA EM HERBÍVOROS E SUÍNOS NO PERÍODO DE 1996 A 2011. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em: 02 mar. 2012.

CARINI, A. Sur une grande epizootia de rage. **Annales de L' Institut Pasteur (Paris)**, v. 25, p. 843-846, 1911.

CARNIELI, P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; LINDENBERG, M. M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R. C.; CARVALHO, V. A.; MONTEBELO, L.; WADA, M.; KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 120, p. 113-120, 2006.

CARNIELI, J. P.; CASTILHO, J.G.; FAHLA, W.O.; VÉRAS, N.M.C.; 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, p. 215-224, 2009.

CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y.; KOTAIT, I.; GERMANO, P. M. L. Diagnóstico clínico-epidemiológico da raiva humana: dados do Instituto Pasteur de São Paulo do período de 1970-2002. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 3, n. 29, p. 2-8, 2006.

CASTILHO, J. G.; CARNIELI, J. P.; DURYMANOVA, E. A.; FAHL, W. O.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; MANTILLA, A.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Human rabies transmitted by vampire bats: Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from the Amazon region (Brazil and Ecuador). **Virus Research**, v. 153, p. 100–105, 2010a.

CASTILHO, J. G.; CARNIELI, J. P.; OLIVEIRA, R. N.; FAHL, W. O.; CAVALCANTE, R.; SANTANA, A. A.; ROSA, W. L. G. A.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. A Comparative Study of Rabies Virus Isolates from Hematophagous Bats in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 4, p. 1335-1339, 2010b.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Center for Infectious Diseases. Atlanta, USA. 2011. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/> >. Acesso em: 24 maio 2012.

CRESPO, J. A.; VANELLA, J. M.; BLOOD, B. D.; DE CARLO, J. M. Observaciones ecológicas del vampiro *Desmodus rotundus* en el norte de Córdoba. **Revista del Museo Argentino Ciencias Naturales**, v. 4, n. 6, p. 131-160, 1961.

DANTAS JUNIOR, J. V.; KIMURA, L. M. S.; FERREIRA, M. S. R.; FIALHO, A. M.; ALMEIDA, M. M. S.; GRÉGIO, C. R. V.; ROMIJIN, P. C.; LEITE, J. P. G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 56, p. 1- 5, 2004.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K. & ATANASIU P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN M. M. & KOPROWSKI H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p. 88-95.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. 8. ed. San Diego: Academic Press, 2005. p. 623-633.

FERNANDES, C. G. Raiva. In: RIET CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. v. 1, p. 149-162.

GERMANO, P. M. L. Advances in rabies research. **Revista Saúde Pública**, v. 28, p. 86-91, 1994.

GOMES, M. N.; UIEDA, W.; LATORRE, M. R. D. O. Influência do sexo de indivíduos da mesma colônia no controle químico das populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) no estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 38-43, 2006.

GONÇALVES, M.A.S.; SÁ-NETO, R. J.; BRAZIL, T. K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 461-464, 2002.

GREENHALL, A.M.; SCHMIDT, U. **Natural history of vampire bats**. Florida: Boca Raton, CRC Press, 1988, 247 p.

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.

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

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

HELLENBRAND, W.; MEYER, C.; RASCH, G.; STEFFENS, I.; AMMON, A. Cases of rabies in Germany following organ transplantation. **Eurosurveillance**, v. 10, p. 213-216, 2005.

HIPÓLITO, O. Raiva. In: **Doenças dos Animais Transmissíveis ao Homem**. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, Ministério da Agricultura, 1948. v. 90, p. 31-37.

HIRANO, S.; ITOU, T.; CARVALHO, A. A. B.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Epidemiology of vampire bat-transmitted rabies virus in Goiás, central Brazil: re-evaluation based on G-L intergenic region. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 288, p. 1-8, 2010

HURST, E. W.; PAWAN, J. L. An outbreak of rabies in Trinidad without history of bites and with symptoms of acute ascending myelitis. **Lancet**, v. 2, p. 622-628. 1931.

HURST, E. W.; PAWAN, J. L. A further account of the Trinidad outbreak of acute rabic myelitis. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 35, p. 301-321, 1932.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 março 2012.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org>>. Acesso em: 30 março 2012.

ITO, M.; ARAI, T. A.; ITOU, 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.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; ARAI, Y. T.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, n. 3, p. 317-330, 2003.

JOHNSON, N.; BROOKES, S. M.; FOOKS, A. R.; ROSS, R. S. Review of human rabies cases in the UK and in Germany. **The Veterinary Record**, v. 157, p. 715, 2005.

KIMURA, L. M. S.; DANTAS JUNIOR, J. V.; MOURA, W. C.; KOTAIT, I.; MARIN, V. A.; BRANDAO, P. E. Reação em cadeia da polimerase como recurso ao diagnóstico da raiva. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 28, p. 104-109, 2006.

KISSI, B.; BADRANE, H.; LAVENU, A.; TORDO, N.; BRAHIMI, M.; BOURHY, H. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 8, p. 2041-2050, 1999.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Rhabdoviridae*. In: LYLES, D. S.; RUPPRECHT, C. E. **Fields Virology**. 15.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2006, v.1, cap. 39, p. 1364-1409.

KOBAYASHI, Y.; OGAWA, A.; SATO, G.; SATO, T.; ITOU, T.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D.P.; ITO, F. M.; SAKAI, T. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n.10, p. 1097-1100, 2006.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; KATO, M.; ITOU, T.; CUNHA, E. M. S.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brasil. **Archives of Virology**, v.152, n.11, p.1995-2004, 2007.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; MOCHIZUKI, N.; HIRANO, S.; TAKUYA, I.; CARVALHO, A. A. B.; ALBAS, A.; SANTOS, H. P.; ITO, F. M.; SAKAI, T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 44, p. 1-9, 2008.

KOPROWSKY, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratories Techniques in Rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 80-87.

KOTAIT, I.; GONÇALVES, C. A.; PERES, N. F.; SOUZA, M. C. A. M.; TARQUETA, M.C. **Controle da raiva dos herbívoros**. São Paulo: Instituto Pasteur, 1998. 15 p. Manual técnico do Instituto Pasteur, n.1.

KOTAIT, I.; FILHO, V.S.N.; SOUZA, M.C.A.M.; CARRIERI, M.L.; GOMES, M .N.; PERES, N.F. **Manual de Controle de Raiva dos Herbívoros**. São Paulo, Instituto Pasteur, 2010, 58 p.

KRIEG, E. A.; JOHNSON, A. D. Invitro synthesis of mRNA. In: KRIEG, P. A. (Ed.). **A laboratory guide to RNA: isolation, analysis, and synthesis**. New York: Wiley-Liss. 1996. p. 146

LORD, R. D. An ecological strategy for controlling bovine rabies through elimination of vampire bats. **Proceedings of the 9th Vertebrate Pest Conference**, v. 170, p. 170-175, 1980.

LORD, R. D. Control of vampire bats. In: GREENHALL, A. M.; SCHIMIDT, U. (Ed.). **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press, 1988, p. 215-226.

MACEDO, C. I.; CARNIELI, P.; BRANDÃO, P. E.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; OLIVEIRA, R. N.; CASTILHO, J. G.; MEDEIROS, R.; MACHADO, R. R.; OLIVEIRA, R. C.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Diagnosis of Human Rabies Cases by Polymerase Chain Reaction of Neck-Skin Samples. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 341-345, 2006.

MATTA, G. C. A.; NOCITI, D. L. P.; CARVALHO, A. A. B.; SAMARA, S. I.; ITO, F. H.; SAKAI, T.; ITOU, T.; SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; MOCHIZUKI, N. Caracterização genética e distribuição geográfica do vírus rábico isolado de bovinos no Estado do Mato Grosso, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 19-24, 2010.

MAYEN, F. Haematophagous bats in Brazil, their role in Rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of Veterinary Medicine** , v. 50, p. 469–42, 2003.

MCCOLL, K.A.; TORDO, N.; SETIÉN, A.A. Bat lyssavirus infections. **Revue Scientifique et Technique OIE**, v. 19, n. 1, p.177-196, 2000.

MEDINA, A.; HARVEY, C. A.; MERLO, D. S.; VÍLCHEZ, S.; HERNÁNDEZ, B. Bat diversity and movement in an agricultural landscape in Matiguás, Nicaragua. **Biotropica**, v. 39, n. 1, p. 120-128, 2007.

MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratories techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: **Laboratories Techniques in Rabies**. MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). Geneva: World Health Organization, 1996, p. 9-27.

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

MOCHIZUKI, N.; KAWASAKI, H.; SILVA, M. L. C. R.; AFONSO, J. A. B.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of livestock rabies viruses isolated in the Northeastern Brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003-2009. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 32, p. 1-7, 2012.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEC, M.C.; STUDDERT, M.J. Rhabdoviridae. In: _____ **Veterinary Virology**. 3. ed. London: Academic press, 1999. cap. 27, p. 429-445.

NOVA, A. V.; RENGELL, F. S.; HINRICHSEN, S. L. Raiva. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. v. 2, cap. 33, p. 498-510.

ORCIARI, L. A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; SHADDOCK, J. H.; SANDERLIN, J. H.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v. 19, n. 31, p. 4511-4518, 2001.

PARREIRAS, H.; FIGUEIREDO, P. A epizootia de Biguaçu (nota preliminar). **Brasil Médico**, v. 25, n. 5, p.71-74, 1911.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. H. Rabies. In _____ **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed. London: W.B. Saunders, 2000, p. 1201-1208.

REZENDE, M. B; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; VASCONCELOS, P. F. C; RESENDE JÚNIOR, A. B. Raiva. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: CEJUP/UEPA/IEC, 1997. cap. 24, p. 377-395.

RODRIGUEZ, L.L.; ROEHE, P.M.; KURATH, H.B.G. Rhabdoviridae. In: FLORES, E. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. cap. 27, p. 689-719.

ROMIJIN, P. C., VAN DER HEIDE, R.; CATTANEO, C. A.; SILVA, R. C. VAN DER POEL, W. H. 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.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 327-343, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a Laboratory Manual. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *Journal veterinary and medical science*, v. 66, n. 7, p. 747- 753, 2004.

SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SANTOS, H. P.; BRITO, C. J. C.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of rabies from maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. *Archives of virology*, 151, p. 2243-2251, 2006.

SCHNEIDER, M. C.; ALMEIDA, G. A.; SOUZA, L. M.; MORARES, N.B.; DIAZ, R.C. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. *Revista de Saúde Pública*, 30, p. 196-203. 1996.

SCHNEIDER, M. C.; ARON, J.; SANTOS-BURGOA, C.; UIEDA, W.; RUIZ-VELAZCO, S. Common vampire bat attacks on humans in a village of the Amazon region of Brazil. *Caderno Saúde Pública*, v. 17, n. 6, p. 1531–1536, 2001.

SCHNEIDER, M. C.; ROMIJN, P. C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; SILVA, D. F.; BELOTTO, A.; SILVA, J. B.; LEANES, L. F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? *Pan American Journal of Public Health*, v. 25, n.3, p. 260–269, 2009.

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

SCHOEHN, G.; ISENI, F.; MAVRAKIS, M.; BLONDEL, D.; RUIGROK, R. W. H. Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site. *Journal Virology*, v. 75, n. 1, p. 490–498, 2001.

SMITH, B. P. Raiva. In: _____. **Tratado de medicina interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos**. São Paulo: Editora Manole, 1993, v. 2, p. 921-924.

SOARES, R. M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S. M.; HEINEMANN, M. B.; CORTEZ, A.; ALVES, L.M.; MEYER, A.D.; ITO, F.H.; RICHTZENHAIN, L.J. A Heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. *Memória Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 109-111, 2002.

SRINIVASAN, A.; BURTON, E. C.; KUEHNERT, M. J.; RUPPRECHT, C.; SUTKER, W. L.; KSIAZEK, T. G.; PADDOCK, C. D.; GUARNER, J.; SHIEH, W.; GOLDSMITH, C.; HANLON, C. A.; ZORETIC, J.; FISCHBACH, B.; NIEZGODA,

M.; EL-FEKY, W. H., ORCIARI, L.; SANCHEZ, E. Q.; LIKOS, A.; KLINTMALM, G. B.; CARDO, D.; LEDUC J.; CHAMBERLAND, M. E.; JERNIGAN, D. B.; ZAKI, S.R. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1103-1111, 2005.

TAKAOKA, N. Y. Raiva. In: MARCONDES, E.; VAZ, F. A. C.; RAMOS, J. L. A.; OKAY, Y. **Pediatria Básica**: pediatria clínica geral. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2003. cap. 16, v. 2, p. 167-177.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v 24, p. 1596-1599, 2007.

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: World Health Organization, p. 28-51. 1996.

TORRES, S.; QUEIROZ LIMA, E. A raiva e sua transmissão por morcegos hematófagos infectados naturalmente. **Revista do Departamento Nacional de Produção Animal**, v. 2, p. 1-55, 1935.

TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDAO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; DE OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; DA SILVA LIMA, R. J.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUZA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. C. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infection Disease**, v. 12, n. 8, p. 1197 - 1202, 2006.

WEBSTER, G. A.; CASEY, G. A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN F. X.; KAPLAN N.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 96-103.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZACION. **Expert Consultation on rabies**. (Technical Report Series, 931). Geneva: World Health Organization, 2004.

WILKINSON, G. S. Social organization and behavior. In: GRENHALL, A. M.; SCHIMIDT, U. (ed.). Natural history of vampire rabies. Florida: CRC press, 1998. p. 85-97.

WILLOUGHBY JR, R. E.; TIEVES, K. S.; HOFFMAN, J. M.; GHANAYEM, N. S.; AMLI LEFOND, C. M.; SCHWABE, M. J.; CHUSID, M. J.; RUPPRECHT, C. E. Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 24, p. 2508-2514, 2005.

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