CARLA DA SILVA MOTA

**Estudos biológico, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva
isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil**

**São Paulo
2008**

CARLA DA SILVA MOTA

**Estudos biológico, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva
isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1958
FMVZ

Mota, Carla da Silva

Estudos biológico, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil / Carla da Silva Mota. – São Paulo: C. S. Mota, 2008.
84 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fumio Honma Ito.

1. Raiva. 2. Vírus da raiva. 3. Vacina anti-rábica. 4. Morcegos. 5. Filogenia.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudos biológicos, genéticos e imunológicos de amostras de vírus da raiva isoladas de morcegos hematófagos *D. rotundus* da região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil", protocolo nº532/2004, utilizando 3.500 camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fumio Honma Ito, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Biologic, genetic and immunologic studies of the chiropteran (*D. rotundus*) rabies viruses isolated from a mountainous region of the State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil", protocol number 532/2004, utilizing 3.500 mice, under the responsibility of Prof. Dr. Fumio Honma Ito, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 16 de maio de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Mota, Carla da Silva

Título: Estudos biológico, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Aos meus pais Oswaldo Feliciano Mota e Jane da Silva Mota.

Ao meu esposo François Godin.

AGRADECIMENTOS

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

Ao amigo e Prof. Dr. Cláudio de Moraes Andrade, com quem dei os primeiros passos na Virologia, por toda ajuda e incentivo e pelo exemplo de integridade e dedicação inspiradoras.

Ao amigo e MSc. Marlon Vicente da Silva, por sua dedicação e fundamental colaboração na realização deste trabalho, enquanto chefe da Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”.

Aos parceiros japoneses Prof. Dr. Takeo Sakai e Prof. Takuya Itou, da *Nihon University*, e seus alunos Go Sato e Yuki Kobayashi, que viabilizaram o seqüenciamento dos genes da proteína N e da proteína G.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, pela amizade e sugestões valiosas para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antônio Jerez, pelo carinho e estímulo constantes.

Ao Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos, pelo apoio e sugestões, enquanto Coordenador da Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

A Wlamir Correa, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, que gentilmente cedeu a vacina anti-rábica referência utilizada neste trabalho.

A Meri Baran, Superintendente de Vigilância em Saúde do Município do Rio de Janeiro, que gentilmente forneceu a vacina anti-rábica de uso humano utilizada neste experimento.

A Tatiana Rezende, Diretora do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, por permitir a realização deste trabalho na Seção de Diagnóstico de Raiva deste Instituto.

A Marcelo Aragão, Médico-veterinário do Biotério do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, pela dedicação no fornecimento dos camundongos utilizados neste trabalho.

A Alexandre Abelardo Sanches e Maria Cecília Bacil, pela amizade inestimável, pelo apoio incansável e por sempre me proporcionarem muitos momentos felizes.

A Sheila de Matos Xavier, Beatriz Cristina Pereira dos Santos, Wildeberg Cál Moreira, Rebeca Wanderley, Marcelo França, João Júnior, Seu Mário e Dona Zenaide, pela amizade construída e por fazerem do ambiente de trabalho, um prazer.

A Rosana Cleide Paick Utiana, pelo auxílio e dedicação durante a fase inicial deste trabalho, no Laboratório de Raiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As secretárias da Pós-Graduação, Dayse Flexa, Cláudia Lima e Tânia Delonero, pela presteza e simpatia com que sempre me atenderam.

A Elza Faquim, bibliotecária da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela revisão deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

A CAPES, pela bolsa concedida.

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

“Se amas teu trabalho, não trabalharás nunca em tua vida”.

Confúcio

RESUMO

MOTA, C. S. **Estudos biológico, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil.** [Biological, immunological and genetic studies of rabies virus samples isolated from bats in Rio de Janeiro State – Southeast, Brazil]. 2008. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O presente trabalho visou estudar o comportamento biológico em camundongos de 10 amostras de vírus da raiva isoladas de morcegos hematófagos e não-hematófagos, no Estado do Rio de Janeiro, sua caracterização genética quanto aos genes N e G, além da resposta de camundongos vacinados com a vacina anti-rábica produzida pela replicação da amostra Pitman-Moore em cultivo celular, frente ao desafio com estas amostras virais. As passagens sucessivas em camundongos determinaram uma redução do período de incubação e a obtenção de amostras virais com altos títulos. A vacina anti-rábica utilizada na imunização dos camundongos ofereceu proteção em mais de 80% dos camundongos vacinados com a diluição 1:5 da vacina, frente à maioria das amostras. A análise filogenética do gene da proteína N apresentou um padrão de agregação dividido em variante de morcego hematófago e variante de morcego insetívoro, com diferenças filogenéticas entre as variantes de morcego hematófago isoladas na Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro e aquelas isoladas nas Regiões Metropolitana e Sul do Estado. A substituição do resíduo ácido aspártico por ácido glutâmico na posição 118, encontradas na caracterização genética da proteína G das amostras 704/97 e 151/98, permite inferir que esta posição esteja relacionada à antigenicidade viral. Não foram observadas diferenças genéticas temporais entre as amostras estudadas.

Palavras-chave: Raiva. Vírus da raiva. Vacina anti-rábica. Morcegos. Filogenia.

ABSTRACT

MOTA, C. S. Biological, immunological and genetic studies of rabies virus samples isolated from bats in Rio de Janeiro State – Southeast, Brazil. [Estudos biológico, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil]. 2008. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

In the present study we analyzed the biological behavior in mice of 10 rabies virus samples isolated from haematophagous and non-haematophagous bats in Rio de Janeiro State, its genetic characterization from genes N and G, and we also studied the response of mice vaccinated with cell culture rabies vaccine, produced with the Pitman-Moore strain, after viral challenge with bat rabies virus samples. Viral passages in mice resulted in reduced incubation period and high virus titers. The vaccine used conferred protection in more than 80% of the mice vaccinated with 1:15 vaccine dilution, after viral challenge. N gene genetic analysis divided the samples in haematophagous bat strains and insectivorous bat strains, with phylogenetic differences between samples isolated in Northeast Region and those isolated in the Metropolitan and South Regions of Rio de Janeiro State. The substitution of an aspartic acid to a glutamic acid found in the position 118 of G gene genetic characterization from samples 704/97 and 151/98 seems to be related to viral antigenicity. There were no time-related genetic differences between the studied samples.

Key words: Rabies, Rabies virus, Rabies vaccine, Bats, Phylogeny.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
cDNA	DNA complementar
CVS	<i>Challenge Standard Virus</i>
DE ₅₀	Dose Efetiva 50%
dil	Diluição
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP ₅₀	Dose Protetora 50%
et al.	E colaboradores
HDCV	<i>Human Diploid Cell Vaccine</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IMMVJV	Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”
LO	Latitude Oeste
log ₁₀	Logaritmo em base 10
LS	Latitude Sul
mg	Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
N/A	Não se aplica
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NR	Não Realizada
p/v	Peso por volume
pb	Pares de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCECV	<i>Purified Chick Embryo Cell Vaccine</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	<i>Pitman-Moore</i>
Proteína G	Glicoproteína
Proteína N	Nucleoproteína
PV	<i>Pasteur Virus</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNA-i	Ácido ribonucléico interferente
RNP	Ribonucleoproteína

RPC	<i>Rabies Peripheral Challenge</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i>
seg	Segundo
SP	<i>Signal Peptide</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
UI	Unidade Internacional
V-RG	<i>Vaccinia-Rabies Glycoprotein Recombinant Virus Vaccine</i>

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

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior
°C	graus Celsius
Φ	Phi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do vírus da raiva em secção longitudinal. Fonte: http://www.cdc.gov/rabies/virus.html . Acesso em: 15 Jan. 2008.....	21
Figura 2 -	Esquema do vírus da raiva em secção transversal. Fonte: http://www.cdc.gov/rabies/virus.html . Acesso em: 15 Jan. 2008.....	21
Figura 3 -	Esquema do genoma do vírus da raiva. Seqüência líder (seta preta), seguida pelos genes N, P, M, G e L, e as regiões intergênicas não-codificadoras (setas brancas). Adaptado de http://www.cdc.gov/rabies/virus.html . Acesso em: 15 jan. 2008.....	21
Figura 4 -	Distribuição, por municípios, dos casos diagnosticados positivos para a raiva no Estado do Rio de Janeiro, no período de 2001 a 2007, segundo dados dos livros de registro do Laboratório de Biologia Animal – Pesagro e do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” - Rio de Janeiro – 2007.....	32
Figura 5 -	Distribuição dos casos de raiva humana, de 1980 a 2005, por regiões geográficas do Brasil, de acordo com os dados do Ministério da Saúde (2008).....	33
Figura 6 -	Mapa do Estado do Rio de Janeiro, destacando os Municípios onde foram isoladas as amostras utilizadas deste trabalho (em vermelho).....	39
Figura 7 -	Dendograma da relação filogenética estabelecida entre as amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ (em vermelho) e de outras espécies isoladas no Brasil (Quadro 7), com base na seqüência de 1,353 bp do gene da proteína N – Rio de Janeiro - 2008.....	55
Figura 8 -	Dendograma da relação filogenética estabelecida entre as amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ e as amostras padrão CVS (<i>GenBank</i> – nº acesso AF406694), PM (<i>GenBank</i> – nº acesso AJ871962) e PV (<i>GenBank</i> – nº acesso M13215, com base na seqüência de 1,575 bp do gene da proteína G – Rio de Janeiro – 2008.....	56

Figura 9 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína G de amostras vírus da raiva isoladas de morcegos, com as amostras padrão CVS, PV e PM. Em destaque: substituição de uma citosina (C) por uma guanina (G), na posição 392, nas amostras 704/97 e 151/98 – Rio de Janeiro – 2008..... 61

Figura 10 - Alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína G das amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos e das amostras padrão CVS, PV e PM. Destaque em linha tracejada para a região do peptídio-sinal (ou **SP** – *Signal Peptide*) e para o domínio transmembrana. Caixas de linha contínua indicam os principais sítios antigênicos e epítomos. Phi (ϕ) indica os resíduos envolvidos na patogenicidade. Círculo destaca a substituição presente na posição 118 das amostras 704/97 e 151/98 – Rio de Janeiro - 2008..... 64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Dados descritivos das amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos na Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” – Rio de Janeiro - 1990 – 2004.....	39
Quadro 2 -	Relação dos <i>primers</i> utilizados para o RT-PCR das amostras quanto ao gene da proteína G.....	42
Quadro 3 -	Relação dos <i>primers</i> utilizados para o seqüenciamento genético das amostras quanto ao gene da proteína G.....	42
Quadro 4 -	Descrição dos <i>primers</i> utilizados para o RT-PCR e para o seqüenciamento genético das amostras quanto ao gene da proteína G.....	43
Quadro 5 -	Relação dos <i>primers</i> utilizados para o RT-PCR e para o seqüenciamento genético das amostras quanto ao gene da proteína N.....	44
Quadro 6 -	Descrição dos <i>primers</i> utilizados para o RT-PCR e para o seqüenciamento genético das amostras quanto ao gene da proteína N.....	44
Quadro 7 -	Relação das amostras de vírus da raiva disponíveis no <i>GenBank</i> que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética, quanto ao gene da proteína N, das amostras isoladas de morcegos – Rio de Janeiro – 2008.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Períodos médios de incubação, em dias, observados em sucessivas passagens em camundongos, das amostras de vírus da raiva isoladas em morcegos, na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ - Rio de Janeiro - 2005.....	50
Tabela 2 -	Resultados da titulação viral em camundongos das amostras do vírus da raiva padrão CVS e isoladas de morcegos, e sua variância, realizadas em triplicata na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ- Rio de Janeiro - 2005.....	51
Tabela 3 -	Resultados dos ensaios imunológicos em valores absolutos e percentuais dos camundongos sobreviventes, por diluição da vacina anti-rábica, de acordo com a amostra utilizada para o desafio viral, realizado na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ - Rio de Janeiro - 2005-2007.....	52
Tabela 4 -	Resultados das DE_{50} calculadas por Probit, e das DP_{50} calculadas pelo método Reed e Muench e obtidas a partir do desafio viral (DL_{50}) dos camundongos vacinados com a vacina anti-rábica de uso humano, utilizando-se a amostra do vírus da raiva padrão CVS e as amostras isoladas de morcego, realizado na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ - Rio de Janeiro - 2007-2008.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	MATERIAIS.....	38
3.1.1	Amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos.....	38
3.1.2	Amostra padrão CVS (<i>Challenge Virus Standard</i>).....	40
3.1.3	Animais.....	40
3.1.4	Diluyente.....	40
3.1.5	Conjugado anti-rábico imunofluorescente.....	41
3.1.6	Vacina anti-rábica de uso humano.....	41
3.1.7	Vacina anti-rábica referência.....	41
3.1.8	<i>Primers</i>	42
3.2	MÉTODOS.....	44
3.2.1	Imunofluorescência direta.....	44
3.2.2	Titulação das amostras padrão CVS e isoladas de morcegos.....	45
3.2.3	Ensaio imunológico em camundongos.....	46
3.2.4	Caracterização genética.....	47
3.2.5	Análise filogenética.....	48
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
4	RESULTADOS.....	50
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma antroponose à qual o ser humano torna-se exposto geralmente através da mordedura de animais infectados (ACHA; SZYFRES, 2003). Todos os mamíferos terrestres e especialmente os morcegos podem se infectar e transmitir a doença. Entretanto, a importância de cada espécie animal na epidemiologia da raiva varia de acordo com a região geográfica (BRASS, 1994).

A despeito de todos os avanços científicos desde sua descoberta na Antiguidade e da disponibilidade de vacinas efetivas para uso humano e animal, por sua evolução frequentemente fatal e pelo elevado número anual de casos humanos e animais, a raiva continua representando um importante problema de saúde pública em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Nas Américas, a falta de sistemas adequados de informação e vigilância epidemiológica, na maioria dos países, não permite conhecer a magnitude real do problema (BELOTTO et al., 2005).

Subestimar a raiva em termos de suas implicações em saúde leva as autoridades em saúde pública e em saúde animal ao equívoco de perceber a raiva como uma doença rara em humanos, resultante da mordida de um animal sem importância econômica (o cão). Desta forma, a raiva frequentemente se encontra entre duas jurisdições, não sendo tratada de modo adequado nem pelo Ministério da Saúde, nem pelo Ministério da Agricultura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

O agente etiológico da raiva é um vírus pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (do grego *lyssa*= fúria) (WUNNER, 2002). O vírus da raiva apresenta forma cilíndrica semelhante a de um projétil, com uma extremidade arredondada e outra mais plana e um tamanho médio de 180 nm de comprimento por 80 nm de diâmetro, variando de acordo com a amostra considerada. Seu nucleocapsídeo helicoidal é constituído de uma molécula de RNA unifilamentoso e uma estrutura protéica composta por três proteínas, L

(proteína RNA polimerase RNA dependente), P (fosfoproteína) e N (nucleoproteína), que formam o complexo ribonucleoproteína (RNP). No envelope viral, originário da célula hospedeira, estão inseridas as espículas de glicoproteína (**Figuras 1 e 2**) (GONÇALVES; VON HUBINGER; WERMELINGER, 2002; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

Figura 1 – Esquema do vírus da raiva em secção longitudinal
Fonte: <http://www.cdc.gov/rabies/virus.html>
Acesso em: 15 Jan. 2008.

Figura 2 – Esquema do vírus da raiva em secção transversal
Fonte: <http://www.cdc.gov/rabies/virus.html>
Acesso em: 15 Jan. 2008.

O genoma do vírus da raiva é composto por uma fita simples não segmentada de RNA não infeccioso, de polaridade negativa, cujo tamanho varia de 11 a 15 kb e peso molecular de $3,5$ a $4,6 \times 10^6$ daltons (KOPROWSKI, 1991; GONÇALVES; VON HUBINGER; WERMELINGER, 2002). O RNA genômico é transcrito em cinco RNAs mensageiros subgenômicos, os quais são traduzidos em cinco proteínas: N, P, proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e L (**Figura 3**) (FENNER et al., 1992).

Figura 3 - Esquema do genoma do vírus da raiva. Seqüência líder (seta preta), seguida pelos genes N, P, M, G e L, e as regiões intergênicas não-codificadoras (setas brancas). Adaptado de <http://www.cdc.gov/rabies/virus.html>. Acesso em: 15 jan. 2008

A proteína N ou núcleoproteína é um polipeptídeo de 450 aminoácidos, potencialmente imunogênica, produzida em abundância durante a infecção viral, a partir da expressão do gene N (TORDO, 1996). Apresenta menor variabilidade genética sendo caracterizada como mais adequada para a tipificação de amostras dentro do gênero *Lyssavirus* (BOURHY et al., 1992), para fins diagnósticos de amostras em decomposição (WOLDEHIWET, 2005) e no exame *ante-mortem* de amostras de tecido da pele da nuca (folículo piloso) em casos de suspeita de raiva humana (MACEDO et al., 2006).

A proteína G ou glicoproteína apresenta um ectodomínio amino-terminal glicosilado de 439 aminoácidos, um segmento transmembrana com 22 aminoácidos e um domínio citoplasmático de 44 aminoácidos (ANILIONIS; WUNNER; CURTIS, 1981). No domínio extracelular da glicoproteína da amostra padrão CVS (*Challenge Virus Standard*) existe dois sítios antigênicos principais, a saber: o sítio II, que se estende do aminoácido 34 ao 42, e do aminoácido 198 ao 200 (PREHAUD et al., 1988); o sítio III, localizado do aminoácido 330 ao 338 (SEIF et al., 1985) e um menor, o sítio “a”, representado pelos aminoácidos 342 e 343 (BENMANSOUR et al., 1991), todos definidos pela possibilidade de ligação com diferentes anticorpos monoclonais. O ectodomínio possui um papel fundamental na interação do vírus com a célula-alvo, pois está envolvido com o reconhecimento do receptor viral, com a fusão do vírus com a membrana celular, patogenicidade, além de ser o principal alvo para o qual o sistema imune do hospedeiro está voltado (TORDO et al., 2000).

Nas amostras de vírus clássico da raiva, a neurovirulência parece estar diretamente relacionada com a manutenção de um resíduo de arginina ou lisina na posição 333 (sítio III). Mutantes com substituição de outro aminoácido nesta posição não podem infectar certos tipos de neurônios, provavelmente porque não são capazes de reconhecer seu receptor celular (DIETZSCHOLD et al., 1983). Entretanto, o vírus Mokola, que é altamente neuropatogênico em camundongos, possui um resíduo de aspartato na posição 333 (TORDO, 1996). De fato, os mecanismos patogênicos da raiva são complexos, sendo improvável que sejam explicados somente por diferenças entre as variantes virais (HEMACHUDHA et al., 2003).

A proteína G é responsável pela indução da produção de anticorpos neutralizantes no hospedeiro e media a ligação do vírus a receptores específicos na superfície da célula-alvo e a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma, para permitir a liberação do complexo ribonucleoproteína no citoplasma da célula. A glicoproteína ainda está envolvida na patogênese da raiva e acredita-se que seja responsável por pelo menos parte do neurotropismo do vírus (TORDO, 1996).

A caracterização genética dos genes N, P e G permitiu o delineamento de sete genótipos, confirmando e expandindo a caracterização antigênica anterior, obtida com o uso de um painel de anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína viral (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Assim, o gênero *Lyssavirus* foi subdividido em: vírus clássico da raiva, genótipo I; vírus *Lagos bat*, genótipo II, isolado de morcegos frugívoros *Eidolon helvum*, na Nigéria, em 1956, em morcegos *Micropterus pusillus*, na República Central Africana, em 1974, e ainda, de 1980 a 1990 o vírus foi isolado em um cão, quatro morcegos e dois gatos; vírus Mokola, genótipo III, o lyssavírus mais distante geneticamente do genótipo I, isolado do musaranho *Crocidura* sp., em duas crianças na Nigéria, sendo uma em 1968 e outra em 1971, e em gatos na África do Sul, em 1995 e em 1998; vírus Duvenhage, genótipo IV, o mais raro dos lyssavírus, isolado originalmente de um humano que foi mordido por um morcego na África do Sul, em 1970, e em morcegos *Miniopterus* sp., em 1981 e em 1986; *European Bat Lyssavirus 1*, genótipo V, isolado de morcegos *Eptesicus serotinus*, na Europa; *European Bat Lyssavirus 2*, genótipo VI, isolado de morcegos *Myotis dasycneme* e *Myotis daubentonii*, na Europa; e *Australian Bat Lyssavirus*, genótipo VII,) isolado de cinco espécies de morcegos, com relatos de dois casos em humanos em 1996 (RUPPRECHT et al., 1991; TORDO, 1996; ARAI et al., 2003; NEL, 2003).

Durante um estudo investigativo da atividade dos lyssavírus em morcegos da região de Osh, no sudeste do Quirguistão, Ásia Central, foi isolada uma amostra viral cuja análise filogenética não se enquadrava nos padrões dos lyssavírus conhecidos e, por este motivo, os autores sugeriram a inclusão de um novo genótipo, denominado *Aravan Virus* (ARAI et al., 2003).

Outros vírus relacionados ao vírus rábico têm sido isolados de morcegos na Eurásia: *Khujand Virus*, isolado de um morcego *Myotis mystacinus*, no Norte do Tajiquistão, em 2001; *Irkut Virus*, isolado de um morcego *Murina leucogaster*, no Leste da Sibéria, em 2002; e *West Caucasian Bat Virus*, isolado de um morcego *Miniopterus schreibersi*, na parte ocidental das Montanhas do Cáucaso, a 150 Km da fronteira leste da Turquia, em 2002. O *Aravan Virus*, junto com o *Khujand Virus*, o *Irkut Virus* e os genótipos I, IV, V e VI, formam o filogruppo I, enquanto o filogruppo II é constituído pelos dois vírus africanos divergentes, genótipos II e III, e o mais divergente de todos eles, o *West Caucasian Bat Virus* (FOOKS, 2004).

Vários estudos filogenéticos utilizando o seqüenciamento parcial ou total dos genes N, G, P e M foram realizados com amostras do vírus da raiva isoladas no Brasil (ITO et al., 2001; ROMIJN, 2003; SCHAEFER et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007a). Ito et al. (2001), analisando 203 nucleotídeos do gene da proteína N de 50 amostras oriundas do Brasil, demonstraram que as amostras se dividiam em dois grupos: variante relacionada ao cão e variante relacionada ao morcego hematófago. Em um estudo posterior com as mesmas amostras, mas tendo o gene da proteína G como alvo, Sato et al. (2004) observaram o mesmo padrão de classificação. Em adição, Carnieli et al. (2006), realizando a análise do perfil genético de amostras brasileiras isoladas de carnívoros, revelaram a existência de dois grupos: variante relacionada a carnívoro doméstico e variante relacionada a carnívoro silvestre. Resultados semelhantes foram encontrados por Kobayashi et al. (2007b) e Shoji et al. (2006), estudando canídeos silvestres do Nordeste Brasileiro.

O vírus da raiva geralmente penetra no hospedeiro suscetível por lesões na pele provocadas, na maioria das vezes, pela mordedura de um animal infectado, que esteja eliminando o vírus pela saliva. A infecção também pode ocorrer por feridas ou soluções de continuidade da pele quando em contato com a saliva e tecidos de animais contaminados, a partir do contato com aerossóis (FISHBEIN, 1991), transplante de córnea (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1992) e de órgãos sólidos (TORDO, 1996; SRINIVASAN et al., 2005). A partir do sítio de entrada, o vírus pode alcançar diretamente os nervos periféricos. Entretanto, na maioria das vezes há primeiramente uma amplificação da quantidade de vírus por

replicação nas células musculares, por períodos que podem variar de dias a meses, ou até mesmo anos. A seguir, o vírus penetra nos terminais distais, invadindo o sistema nervoso periférico através das terminações motoras e sensoriais. A infecção neuronal é centrípeta, com a liberação do vírus no sistema nervoso central (SNC), geralmente a partir dos gânglios espinhais. Ao atingir o SNC, o curso do vírus ao cérebro é rápido, onde então causa uma encefalomielite aguda caracterizada por paralisia muscular progressiva, coma e parada respiratória seguida de morte (BAER; LENTZ, 1991; TORDO, 1996; GONÇALVES; VON HUBINGER; WERMELINGER, 2002).

Concomitantemente com a replicação viral no SNC, o vírus é disseminado de forma centrífuga, através dos nervos periféricos, para diversos órgãos, incluindo o coração, pulmão, rim, ureter, bexiga, pâncreas, fígado, pele, timo, ovário, útero, glândula adrenal, baço, estômago, intestinos, músculo, retina, córnea, gordura interescapular (nos morcegos) e, principalmente, as glândulas salivares (SILVA; SOUZA, 1966; GERMANO et al., 1988; BRASS, 1994; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002; SCHEFFER et al., 2007). A presença do vírus nas glândulas salivares, com sua eliminação pela saliva, torna possível a principal via de transmissão da doença, que é a mordedura por animais raivosos, especialmente os carnívoros.

Em humanos, após um período de incubação variável, a infecção pelo vírus da raiva determina o aparecimento de sinais clínicos inespecíficos, que duram de 2 a 4 dias. O paciente apresenta mal-estar geral, pequeno aumento de temperatura, anorexia, cefaléia, náuseas, dor de garganta, entorpecimento, irritabilidade, inquietude e sensação de angústia, podendo ocorrer ainda, hiperestesia e parestesia no trajeto dos nervos periféricos próximos ao local da mordedura e alterações de comportamento. Com a progressão da infecção, surgem manifestações de ansiedade e hiperexcitabilidade crescentes, febre e espasmos musculares involuntários generalizados, os quais evoluem para um quadro de paralisia. Observa-se, ainda, a presença de disfagia, aerofobia, hiperacusia e fotofobia. O paciente se mantém consciente, com períodos de alucinações, até o estabelecimento do estágio comatoso, após o qual advém o óbito (FISHBEIN, 1991).

Embora as proteínas do vírus da raiva sejam altamente imunogênicas, a resposta imune contra o vírus é muito débil para conferir proteção durante sua fase de movimentação desde o sítio de entrada até o SNC. Ao espalhar-se pelo SNC, o desenvolvimento de sinais clínicos ocorre com o mínimo de resposta imune, pois o vírus fica isolado dos anticorpos e células imunes pela barreira hemato-encefálica (GONÇALVES; VON HUBINGER; WERMELINGER, 2002).

Quando a resposta imune antiviral acontece, seja tardiamente na infecção pelo vírus da raiva, seja após a vacinação, observa-se uma mistura de resposta imunológica específica (humoral ou mediada por células) e não-específica (atuação dos macrófagos). A apresentação dos antígenos feita pelos macrófagos é crucial para a produção de anticorpos pelos linfócitos B e para a estimulação de linfócitos T-auxiliares que, por sua vez, produzirão diferentes citocinas envolvidas na eliminação direta do vírus ou das células infectadas. Entretanto, a estimulação de linfócitos B para a síntese de imunoglobulinas geralmente não ocorre até os sinais clínicos aparecerem e o título de anticorpos neutralizantes permanece baixo até a fase terminal da doença, atingindo seu pico próximo da morte do hospedeiro (ZANETTI, 2003).

A observação clínica permite levar somente à suspeição da raiva, pois os sinais da doença não são característicos e podem variar de um animal a outro ou entre indivíduos de uma mesma espécie. Não existe, até o momento, um teste diagnóstico laboratorial conclusivo antes da morte do hospedeiro infectado que expresse resultados absolutos. No entanto, existem procedimentos laboratoriais padronizados internacionalmente para que se realize o diagnóstico *post mortem* de amostras de animais ou humanos suspeitos de raiva (ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE, 2008). O diagnóstico laboratorial pode ser realizado utilizando-se principalmente dois tipos de procedimentos de rotina: o teste de imunofluorescência direta nos tecidos removidos do SNC, seguido do isolamento viral em camundongos ou em cultivo celular (BRASIL, 2008a).

Dois ciclos epidemiológicos da raiva podem ser identificados na natureza. A raiva silvestre é mantida em carnívoros e morcegos na América do Norte, Europa e

África. Na raiva urbana, a doença é mantida na população de cães e gatos domésticos na América Latina, África e Ásia. Na América Latina verifica-se ainda uma situação particular, onde prevalece um ciclo silvestre mantido por morcegos hematófagos, cujo principal transmissor é o morcego *Desmodus rotundus*, o qual determina grandes prejuízos à pecuária (ciclo rural) e sérios riscos à saúde pública devido à possibilidade de ataques a seres humanos (BRASS, 1994).

No mundo, 99% dos casos de raiva humana ocorrem nos países em desenvolvimento e o cão ainda é o principal reservatório do vírus, sendo responsável por 92% dos tratamentos anti-rábicos pós-exposição (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

O mais importante reservatório da raiva na Europa é a raposa (*Vulpes vulpes*), responsável por mais de 75% dos casos de raiva. Na América do Norte, onde a raiva em animais domésticos foi controlada através da vacinação, espécies silvestres como as raposas (*Urocyon cinereoargenteus* e *V. vulpes*), os *skunks* (*Mephites mephites* e *Spilogale gracilis*), os *raccoons* (*Procyon lotor*) e os morcegos insetívoros são responsáveis pela circulação do vírus da raiva na natureza (KING; TURNER, 1993; MESSENGER et al., 2003; WOLDEHIWET, 2005).

Na América Latina, a raiva ocorre principalmente em carnívoros silvestres e em morcegos hematófagos. Em 2004, foram registrados 975 casos de raiva canina em 14 países da região, tendo o maior número de casos ocorrido na Bolívia (355), seguido de El Salvador (194), Venezuela (142) e Brasil (104) (SCHNEIDER et al., 2005). Em nosso país, no ano de 2006, somente nas regiões Norte e Nordeste foram registrados 75 casos de raiva canina (BRASIL, 2007).

No Brasil, de 1990 a 2000, os cães domésticos foram os responsáveis por 76% dos casos notificados, seguido dos morcegos, com 11% de participação nas notificações (BRASIL, 2002). No país, identificações positivas de vírus da raiva já foram descritas em mamíferos silvestres pertencentes à ordem *Chiroptera* (morcegos hematófagos e não-hematófagos); *Carnivora*, nas famílias *Canidae* (cão, cachorro-do-mato e raposa), *Procyonidae* (guaxinim, quati), *Mustelidae* (furão) e

Felidae (felinos); *Marsupialia*, na família *Didelphidae* (gambá); da ordem *Primata*, nos primatas não-humanos das famílias *Callithricidae* (sagüi) e *Cebidae* (bugio, macaco-prego, macaco-aranha) (INSTITUTO PASTEUR, 2002).

Os reservatórios mais conhecidos e considerados eficientes na transmissão da raiva sempre foram espécies da ordem *Carnivora*, especialmente os canídeos, pelo seu comportamento, geralmente agressivo, quando afetados pelo vírus. Entretanto, no Brasil, espécies da ordem *Chiroptera* apresentam-se como transmissores emergentes, em função do aumento da ocorrência de casos de raiva humana transmitida por morcego hematófago (BRASIL, 2004). Em um estudo epidemiológico dos casos de raiva humana em Portel (Pará), em 2004, verificou-se que 1.558 pessoas da região do surto apresentaram histórico de agressão por morcego hematófago (ROSA et al., 2006).

Carini (1911) foi o primeiro pesquisador a realizar o diagnóstico da raiva bovina nas Américas, durante um surto em Santa Catarina, no sul do Brasil, tendo sido ainda o primeiro a considerar o papel dos morcegos hematófagos como transmissores da doença. Porém, sua assertiva só foi aceita após várias investigações realizadas na mesma área por Haupt e Rehaag¹ (1921 *apud* BAER, 1991).

Quirópteros não-hematófagos podem transmitir raiva a suas vítimas, no caso de mordeduras defensivas. Nos Estados Unidos, todos os estados, exceto o Havaí e o Alasca, já reportaram casos de raiva em morcegos insetívoros (*Lasiurus intermedius*, *L. cinereus*, *L. seminola*, *Lasionycteris noctivagans*, etc) e, embora a maior parte dos animais silvestres diagnosticados positivos para a raiva sejam de outras espécies, como os *skunks*, *raccoons* e raposas, quase todos os óbitos humanos por raiva são associados a morcegos insetívoros (BRASS, 1994; MESSENGER et al., 2003).

¹ HAUPT, H.; REHAAG, H. Durch Fledermaeuse verbreitete seuchenhafte. Tollwut unter Viehbeständen in Santa Catarina (Süd-Brasilien). *Zeitschrift. für. Infektionskrankh. Haustiere* v.22, p.76–88, p.104–127, 1921.

A raiva em morcegos hematófagos é um problema limitado à América Latina e a algumas ilhas do Caribe, com a infecção pelo vírus rábico tendo sido comprovada nas três espécies de morcegos hematófagos – *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii*, mas somente o *D. rotundus* é considerado de importância epidemiológica. Na América Latina, os quirópteros, em especial os hematófagos, representam o segundo maior grupo de animais responsável pela transmissão da raiva para humanos e o primeiro para herbívoros. Outros animais domésticos, como por exemplo, bovinos, eqüinos, caprinos, ovinos, suínos e bubalinos, apresentam potencial de transmissão ao homem em casos esporádicos (ACHA; SZYFRES, 2003).

O *D. rotundus* é a espécie de morcego hematófago com maior densidade populacional e versatilidade para a exploração diversificada e oportunista de abrigos e fonte de alimentos, possuindo ainda forte capacidade de se adaptar a novas situações. Tendem a constituir grupos concentrados e viver em grandes colônias, geralmente em locais de difícil acesso como covas, cavernas, ocos de árvores, tubulações, galerias de águas pluviais, casas abandonadas e outros locais úmidos e escuros (MÉNDEZ, 1972). Para se alimentar, o *D. rotundus* pode voar até 20 Km por noite à procura de alimentos (MÁLAGA-ALBA, 1954).

Os morcegos hematófagos, que necessitam se alimentar diariamente, embora tenham preferência por sangue de bovinos, eqüinos, suínos e aves, utilizam humanos, especialmente crianças, como sua principal fonte de alimentos. E este fato vem ocorrendo no Brasil em função da acentuada interferência do homem no meio ambiente por migrações para áreas inexploradas, alterando processos produtivos e provocando modificações no equilíbrio ecológico (KOTAIT, 2007).

A invasão crescente de morcegos hematófagos e não-hematófagos nas áreas urbanas resulta em grande problema à saúde pública, devido ao contato mais próximo com seres humanos provocado pela adaptação a abrigos artificiais. Na cidade do Rio de Janeiro, o refúgio de morcegos em forros de edificações é um problema freqüentemente relatado pelos moradores da cidade à Fundação RIOZOO (ESBÉRARD, 2003).

Acha e Szyfres (2003) estimam que na América Latina, a mortalidade anual devido à raiva é de 50.000 cabeças de gado, ao que somado a perdas indiretas de carne e leite, além da desvalorização de peles danificadas pela mordedura de morcegos hematófagos, representa um prejuízo anual de US\$ 44 milhões.

No período de 1995-2005, 34.044 casos de raiva em diferentes espécies animais foram notificados (BRASIL, 2008a). Em áreas rurais não é feita a cobertura vacinal adequada em herbívoros e, mesmo em animais ditos vacinados, há a ocorrência de casos de raiva (RODRIGUES DA SILVA et al., 2000). Com o funcionamento adequado de um programa de cobertura vacinal, mesmo com a presença de morcegos hematófagos, principais transmissores da raiva nessas áreas, seria possível manter uma ocorrência aceitável e plenamente controlada da doença (KOTAIT et al., 1998).

Entretanto, a vacinação apenas controla a ocorrência de casos clínicos. Para o controle efetivo da raiva, deve-se controlar a população de morcegos *D. rotundus* através de métodos seletivos, não causando danos ou transtornos a outras espécies de morcegos não-relacionadas à raiva, que são importantes na manutenção do equilíbrio ecológico na natureza. No método seletivo direto, há a necessidade da captura do morcego e posterior aplicação da “pasta vampiricida”, composta por warfarina, sobre o dorso do animal. Em função de seu hábito de higiene, outros morcegos *D. rotundus* irão ingerir o produto químico por lambedura, vindo a óbito em consequência de hemorragias internas. O método seletivo indireto consiste na aplicação tópica do mesmo produto químico ao redor das mordeduras recentes de morcegos hematófagos no herbívoro espoliado (NOGUEIRA, 2003; BRASIL, 2005).

Dado o sucesso no controle da raiva em algumas espécies silvestres, obtido em países como Canadá e Estados Unidos da América pelo uso de iscas de vacina anti-rábica recombinante (*Vaccinia-Rabies Glycoprotein Recombinant Virus Vaccine* – V-RG), de uso oral, Almeida et al. (2005) realizaram a imunização oral indireta de morcegos *D. rotundus*, através de sua captura e posterior aplicação, no dorso do animal, de uma pasta de veículo neutro contendo a vacina V-RG. Como Aguilar-Sétien et al. (1998), aqueles autores concluíram que seus resultados foram

promissores e, com o desenvolvimento de novos estudos a respeito, é possível que este método se torne uma opção futura para o controle da raiva na população do *D. rotundus*.

Um dos critérios importantes na definição de áreas epidêmicas de raiva é a topografia acidentada, com conseqüente manutenção da população de morcegos hematófagos e permanente circulação do vírus. Por este motivo, a atividade de controle populacional do *D. rotundus* não pode sofrer descontinuidade e o órgão oficial de Defesa Agropecuária deverá manter equipes, compostas de um médico veterinário e no mínimo três auxiliares, para o desenvolvimento destas atividades (KOTAIT et al., 1998).

No Estado do Rio de Janeiro, tem-se verificado o aumento do número de municípios com casos de animais diagnosticados positivos para a raiva, conforme os dados dos livros de registro do Laboratório de Biologia Animal da Pesagro (2007) e do Laboratório de Diagnóstico da Raiva - Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” (IMMVJV) (2007), ilustrados na **figura 4**. Somente no ano de 2006, foram registrados 99 casos de raiva em herbívoros, 8 casos em morcegos não-hematófagos e 2 casos em canídeos silvestres (BRASIL, 2007).

Devido à implementação maciça da campanha de vacinação anti-rábica animal, a cidade do Rio de Janeiro, apresentou uma drástica queda no número de casos de raiva em cães e gatos, passando de 531 cães e 58 gatos positivos em 1981 a apenas um cão positivo em 1986 e um gato positivo em 1992. Desde então, o ciclo urbano da raiva é considerado extinto nesta cidade (INSTITUTO MUNICIPAL DE MEDICINA VETERINÁRIA JORGE VAITSMAN, 2007).

Em uma série histórica publicada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008b), verifica-se uma maior concentração dos casos de raiva humana na Região Nordeste do país, com 768 casos de raiva notificados, no período de 1980 a 2005, conforme ilustra a **figura 5**.

Figura 4 – Distribuição, por municípios, dos casos diagnosticados positivos para a raiva no Estado do Rio de Janeiro, no período de 2001 a 2007, segundo dados dos livros de registro do Laboratório de Biologia Animal – Pesagro e do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” - Rio de Janeiro - 2007

Em 2004, uma situação atípica ocorreu às margens do rio Acuty Perera, no município de Portel, no Estado do Pará, com a detecção laboratorial de 15 casos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos no período de um mês, um evento que representou o maior surto de raiva transmitida por morcego registrado no país (BRASIL, 2004; ROSA et al., 2006). No ano seguinte a este surto foram registrados 42 casos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos na Região Amazônica (KOTAIT et al., 2007).

Figura 5 – Distribuição dos casos de raiva humana, de 1980 a 2005, por regiões geográficas do Brasil, de acordo com os dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008b)

A profilaxia pré-exposição da raiva pelo uso da vacina anti-rábica é indicada para pessoas em risco de exposição ao vírus devido a suas atividades profissionais, tais como veterinários, laboratoristas, vacinadores, laçadores, treinadores de cães, pesquisadores, espeleólogos, tratadores de animais domésticos de interesse econômico, etc (COSTA et al., 2000). Para estes indivíduos, recomenda-se ainda a avaliação laboratorial periódica dos níveis de anticorpos neutralizantes contra o vírus (ZANETTI, 2003).

A profilaxia pós-exposição consiste da limpeza criteriosa da lesão e da administração da vacina anti-rábica, isoladamente ou em associação com a imunoglobulina anti-rábica humana, de acordo com a natureza da exposição e espécie animal envolvida (COSTA et al., 2000).

Embora a raiva seja uma doença tida até então como fatal quando o tratamento pós-exposição não é realizado, no ano de 2004, foi descrito o primeiro caso de uma paciente recuperada da raiva clínica, sem administração de tratamento pré ou pós-exposição, mas que foi submetida a um regime terapêutico que incluiu os antivirais ribavirina e amantadina, além do anestésico dissociativo ketamina e do sedativo midazolam (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2004; WILLOUGHBY et al., 2005), mas a eficiência deste protocolo ainda não foi reproduzida (McDERNID et al., 2008). Neste sentido, Brandão et al. (2007), ao tratarem células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) infectadas pelo vírus da raiva com RNA interferente (RNAi), encontraram uma redução em cinco vezes do título viral e acreditam que este achado seja promissor para o desenvolvimento de antivirais para o tratamento da doença.

Por mais de 100 anos, a vacina anti-rábica originada de tecido nervoso, Fuenzalida-Palácios, foi utilizada para a vacinação de humanos após a exposição a animais raivosos. Estas vacinas são consideradas econômicas, mas possuem baixa potência por dose e aquelas produzidas em cérebro de ovino ou caprino são freqüentemente associadas a sérios efeitos adversos. A maioria da população dos países pobres em risco de contrair a raiva ainda depende das vacinas originadas de tecido nervoso, enquanto as vacinas produzidas com o vírus da raiva replicados em cultivos celulares, consideradas seguras e altamente eficazes, estão disponíveis há mais de 20 anos para as populações em menor risco de contrair a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

As vacinas anti-rábicas disponíveis para uso em humanos e animais são todas de vírus inativado. Atualmente, a vacina utilizada nos programas de saúde pública no Brasil é a vacina produzida em cultura de células Vero (*Purified Vero Cell Vaccine*) e, em casos de reação de hipersensibilidade, utiliza-se a vacina produzida

em cultura de células diplóides humanas (*Human Diploid Cell Vaccine* - HDCV). Ambas são bem toleradas e apresentam resposta e ocorrência de reações adversas semelhantes (COSTA et al., 2000).

Cada lote de vacina anti-rábica liberada para uso deve possuir uma potência adequada. O teste de potência recomendado pela Organização Mundial de Saúde para a vacina anti-rábica é o *National Institutes of Health* (NIH), baseado na vacinação de grupos de camundongos com múltiplas diluições da vacina, com posterior desafio viral com a amostra padrão CVS (WILBUR; AUBERT, 1999).

Zanetti et al. (1998) estudaram a eficácia da vacina Fuenzalida-Palácios em camundongos, utilizando os testes Habel e NIH, com a amostra padrão CVS, uma amostra isolada de um bovino e outra originária de um morcego, e verificaram que, nos ensaios NIH com as amostras de campo, este teste sempre apresentou resultados inferiores a 1.0 UI/mL, quando valor de liberação de um lote de vacina anti-rábica humana para este teste de potência é 2,5 UI/mL.

Barth, Diderrich e Weinemann (1988) investigaram as possíveis causas da baixa reprodutibilidade do teste NIH por ensaios com a vacina referência internacional produzida com a amostra padrão CVS, e a vacina anti-rábica humana produzida em células de embrião de galinha (PCECV – *Purified Chick Embryo Cell Vaccine*) com a amostra Flury LEP-C 26, e verificaram que ambas as vacinas apresentaram maior eficácia quando o vírus-desafio utilizado foi homólogo ao da produção da vacina.

Dietzschold e Hooper (1998) comparando a vacina HDCV com a vacina PCECV, usou uma amostra isolada de morcego insetívoro e outra isolada de cão como vírus-desafio no teste NIH e vírus de trabalho no teste sorológico de humanos vacinados e encontraram uma correlação direta entre a eficácia das vacinas utilizadas em camundongos e o título de anticorpos em humanos vacinados, considerando, então, ambas as vacinas como protetoras frente às amostras de campo. Piza et al. (2002) não encontraram a mesma correlação entre os resultados

do teste NIH realizado em seis lotes de uma vacina HDCV experimental e os resultados da sorologia de bovinos vacinados.

A eficácia de duas vacinas de uso veterinário, uma brasileira e outra importada, ambas produzidas pela replicação da amostra PV em células BHK-21, foi verificada por Bernardi et al. (2005), que não encontraram diferenças significativas entre os resultados para uma mesma amostra de vírus-desafio. Entretanto, para a vacina importada, quando o ensaio de potência do CDC (*Centers for Disease Control*) foi realizado com uma amostra isolada de morcego hematófago e outra canina, a dose efetiva foi inferior que a encontrada nos ensaios com as amostras isoladas de morcegos insetívoro, bovino e eqüino.

Apesar dos inúmeros ajustes realizados ao longo dos seus mais de 40 anos de existência, o teste de potência NIH permanece sendo alvo de muitas críticas, por apresentar desvantagens intrínsecas à sua metodologia, tais como: a via de administração da dose do vírus desafio em camundongos, que não mimetiza a infecção natural pelo vírus da raiva; a amostra do vírus da raiva padrão CVS apresenta patogenia e neurotropismo diferentes da maioria das amostras isoladas a campo; a via intra-peritoneal para a vacinação, com intervalo de sete dias, pode levar a uma resposta imune diferente daquela induzida pela vacinação intramuscular realizada; e ainda a baixa reprodutibilidade do método (BARTH; DIDERRICH; WEINMANN, 1988; WUNDERLI et al., 2006).

Considerando-se o potencial de casos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos e não-hematófagos em função de sua crescente proximidade ao ambiente urbano, estudos que visem analisar a eficiência da resposta imune humoral conferida pela vacina anti-rábica atualmente utilizada na profilaxia pré e pós-exposição da raiva frente a amostras oriundas de morcegos são necessários.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos:

- Estudar amostras do vírus da raiva oriundas de morcegos hematófagos e não-hematófagos diagnosticadas positivas no Estado do Rio de Janeiro, do ano de 1990 a 2004, verificando:
 - o comportamento biológico das amostras em camundongos;
 - o efeito do desafio de camundongos previamente vacinados com a vacina anti-rábica purificada produzida em cultura de células Vero, frente a amostras isoladas de morcegos;
 - a diversidade genética das amostras quanto ao gene da proteína N e ao gene da proteína G, comparando com outras amostras do Brasil através de dados disponíveis no *GenBank*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Nesta seção serão descritos os materiais utilizados neste trabalho de tese.

3.1.1 Amostras do vírus da raiva

Foram utilizadas 10 amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos hematófagos e não-hematófagos, no período 1990 a 2004, na Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, oriundas de seis Municípios do Estado do Rio de Janeiro, a saber: Valença, Paracambi, Mesquita, Rio de Janeiro, Itaperuna e Laje do Muriaé.

Todas as amostras foram diagnosticadas positivas para a raiva pela prova de imunofluorescência direta, em impressões do tecido cerebral dos morcegos suspeitos, verificando-se a presença de inclusões intracitoplasmáticas com fluorescência característica da raiva, pelo uso de conjugado policlonal anti-rábico imunofluorescente. Os resultados foram confirmados com o isolamento do vírus em camundongos, através da realização da prova de inoculação intracerebral (KOPROWSKI, 1996), pela presença de sinais clínicos característicos da raiva em camundongos, após passar por um período de incubação e período clínico variável e esperado para esta espécie, seguido de nova confirmação por imunofluorescência direta.

As amostras deste trabalho se encontravam congeladas a -20°C , liofilizadas e com no mínimo uma passagem em camundongos. Seus dados de origem se encontram no Livro de Registro da Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMIV e estão resumidos no **quadro 1** e ilustrados na **figura 5**.

CÓDIGO DA AMOSTRA	ANO	ESPÉCIE ANIMAL	MUNICÍPIO	PASSAGENS
222/90	1990	<i>Tadarida laticaudata</i>	Rio de Janeiro	Terceira
419/90	1990	<i>Tadarida laticaudata</i>	Rio de Janeiro	Primeira
704/97	1997	<i>Desmodus rotundus</i>	Itaperuna	Terceira
151/98	1998	<i>Desmodus rotundus</i>	Laje do Muriaé	Terceira
204/01	2001	<i>Artibeus lituratus</i>	Rio de Janeiro	Terceira
399/02	2002	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Rio de Janeiro	Segunda
624/02	2002	<i>Desmodus rotundus</i>	Valença	Segunda
755/02	2002	<i>Artibeus sp.</i>	Paracambi	Segunda
046/04	2004	<i>Nyctinomops laticaudata</i>	Rio de Janeiro	Primeira
384/04	2004	<i>Artibeus sp.</i>	Mesquita	Primeira

Quadro 1 - Dados descritivos das amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos na Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” – Rio de Janeiro - 1990 - 2004

Figura 6 - Mapa do Estado do Rio de Janeiro², destacando os Municípios onde foram isoladas as amostras utilizadas deste trabalho (em vermelho)

² Centro de Informações e Dados do Rio de Janeiro – CIDE.

3.1.2 Amostra padrão CVS (*Challenge Virus Standard*) do vírus da raiva

Foi utilizada a amostra padrão CVS, cedida pelo antigo Centro Pan-americano de Zoonoses, mantida por passagens em camundongos e acondicionada sob a forma liofilizada a – 20 °C, em sua trigésima oitava passagem na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ.

3.1.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) procedentes do Biotério do IMMJVJ para as provas de inoculação intracerebral, estudo do comportamento biológico das amostras de vírus rábico isoladas de morcegos, teste imunológico e reativação e titulação das amostras de vírus. Todos os animais sobreviventes ao final das provas foram submetidos à eutanásia por inalação do anestésico halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoretano).

3.1.4 Diluente

Para a preparação das suspensões de cérebros para a prova biológica e diluição das amostras de vírus rábico foi utilizado um diluente constituído de solução salina fisiológica esterilizada por autoclavagem, adicionada de penicilina (1000 UI/mL) e estreptomicina (2 mg/mL), no momento do uso, conforme Koprowski (1996), exceto pela ausência de soro eqüino.

Para a diluição da vacina para o teste imunológico foi utilizada apenas a solução salina tamponada com fosfatos, esterilizada por autoclavagem, segundo Wilbur e Aubert (1999).

3.1.5 Conjugado anti-rábico imunofluorescente

O conjugado anti-rábico imunofluorescente utilizado foi produzido pela Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ, a partir de soro de coelhos hiperimunizados com vacina preparada com vírus CVS. A imunoglobulina IgG foi marcada com o isotiocianato de fluoresceína e o conjugado obtido foi titulado, antes da sua utilização, para determinação da diluição de trabalho.

3.1.6 Vacina anti-rábica de uso humano

Para o ensaio imunológico com amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos foi utilizada a vacina anti-rábica purificada produzida a partir da replicação da amostra WISTAR PM/WI 38-1503M em cultura de células Vero, inativada pela beta-propiolactona, pelo laboratório *Aventis Pasteur* (Lyon, França), distribuída e envasada pelo Instituto Butantan (lote 04411167), usualmente empregada para a imunização pré e pós-exposição humana no Brasil, e gentilmente cedida pela Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro.

3.1.7 Vacina anti-rábica de referência

Para o teste de potência da vacina anti-rábica de uso humano, foi utilizada a vacina de referência padrão produzida a partir de cérebros de camundongos lactentes infectados com a amostra padrão CVS-32 do vírus da raiva, com posterior inativação por beta-propiolactona. A vacina contendo 1,9 UI/mL pertence ao lote BR008, tendo sido produzida e gentilmente cedida para este trabalho pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

3.1.8 Primers

Para a amplificação do RNA por RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) extraído das amostras e seqüenciamento genético, quando o alvo foi o gene da proteína G, foram utilizados os *primers* relacionados nos quadros 2 e 3, respectivamente, e descritos no quadro 4.

AMOSTRAS	PRIMERS USADOS PARA O RT-PCR
222/90	Ga3222-40, RVLa-1
046/04	Ga3222-40, RVLa-3
704/97	Ga3222-40, Gb4119-39, GS3994, G-antiBR2072
151/98	
204/01	
399/02	
624/04	
755/02	
384/04	

Quadro 2 - Relação dos *primers* utilizados para o RT-PCR das amostras quanto ao gene da proteína G

AMOSTRAS	PRIMERS USADOS PARA O SEQÜENCIAMENTO GENÉTICO
222/90	Ga3222-40, Gb4119-39, GS3994, RVLa-1, RVLa-5
046/04	Ga3222-40, Gb4119-39, VT1551, RVLa-3
704/97	Ga3222-40, Ga3222-40-1, Gb4119-39, Gb4119-39-1, VT129, VT1391
151/98	Ga3222-40, Ga3222-40-1, Gb4119-39, Gb4119-39-1, GS3994, VT129, VT1391
204/01	Ga3222-40, Ga3222-40-1, Gb4119-39, GS3994, VT1391, VT1551, RVLa-5, G-antiBR2072-1
399/02	Ga3222-40, Ga3222-40-1, Gb4119-39, GS3994, VT129, VT1391
624/04	Ga3222-40, Ga3222-40-1, Gb4119-39, Gb4119-39-1, GS3994, VT129, VT1551
755/02	Ga3222-40, Ga3222-40-1, Gb4119-39, VT129, VT1391, VT1551, G-antiBR2072-1
384/04	Ga3222-40, Ga3222-40-1, Gb4119-39-1, GS3994, VT129, VT1391

Quadro 3 - Relação dos *primers* utilizados para o seqüenciamento genético das amostras quanto ao gene da proteína G

PRIMERS	SENTIDO	POSIÇÃO¹	SEQÜÊNCIA
Ga3222-40	+	3221-3229	5'CGCTGCATTTT(A/G)TCA(A/G)AGT3'
VT129	-	3438-3419	5'GGTGATGTATATCGATGGGG3'
Ga3222-40-1	+	3518-3536	5'GGGATACATCTCTGCCATA3'
Gb4119-39-1	-	3819-3801	5'GGGATTTGTCGTATGGGTC3'
GS3994	+	3995-4019	5'CGG(A/C)TTTGTGGATGAAAG(A/G)GGC3'
Gb4119-39	-	4135-4116	5'GGAGGGCACCATTGTTGGT(A/C)TC3'
GS3994-1	+	4373-4392	5'GACTTGGAACGAGATCATCC3'
VT1391	-	4700-4681	5'CAGGAGATATTTCCCCCAAC3'
RVL _a -5	-	4857-4836	5'CCCA(C/G)GAAGATAT(A/G)ACTTTCCC3'
VT1551	+	4852-4859	5'GTCGTATCTTCATGGGAG3'
G-antiBR2072-1	-	4996-4978	5'CATGAAGTATGTGAAGGGC3'
RVL _a -3	-	5114-5091	5'GCACCATTGGT(C/T)ACTGATACTGTC3'
G-antiBR2072	-	5375-5356	5'TGCTGATTGC(A/G)CCTACATT3'
RVL _a -1	-	5435-5416	5'AT(A/G)GGGTCATCATAAACCTC3'

¹Numeração nucleotídica baseada na seqüência da amostra PV (*GenBank* n.M13215)

Quadro 4 - Descrição dos *primers* utilizados para o RT-PCR e para o seqüenciamento genético das amostras quanto ao gene da proteína G.

Para o RT-PCR, a área contendo o gene da proteína G foi dividida em região anterior (nucleotídeos 3221-4135) e região posterior (nucleotídeos 3995-5382). Assim, para a região anterior foram usados os pares de *primers* Ga3222-40 e Gb4119-39 e, para a região posterior foram utilizados os *primers* senso GS 3994 e anti-senso G-antiBR2072, com exceção para as amostras 222/90 e 046/04, visto que só foi possível obter-se o produto amplificado pelo RT-PCR utilizando-se o *primer* senso Ga3222-40 com os *primers* anti-senso RVL_a-1 e RVL_a-3, respectivamente.

Para a amplificação do RNA extraído das amostras e seqüenciamento genético, quando o alvo foi o gene da proteína N, foram utilizados os *primers* relacionados no **quadro 5** e descritos no **quadro 6**.

PRIMERS	USO
P1	RT-PCR / Seqüenciamento
N8	RT-PCR / Seqüenciamento
BRABN-S1	Seqüenciamento
BRABN-S3	Seqüenciamento
BRABN-C3	Seqüenciamento
P2	Seqüenciamento

Quadro 5 - Relação dos *primers* utilizados para o RT-PCR e para o seqüenciamento genético das amostras quanto ao gene da proteína N

PRIMERS	SENTIDO	POSIÇÃO¹	SEQÜÊNCIA
P1	+	66-86	5'CTACAATGGATGCCGACAAGA3'
N8	-	1585-1568	5'AGTTTCTTCAGCCATCTC3'
BRABN-S1	+	336-355	5'GGACTAGCTATGGAATCCTG3'
BRABN-S3	+	782-801	5'GGACTGGTGTTCATTTACAGG3'
BRABN-C3	-	537-519	5'TGTCCAGAGATTTTGCTCA3'
P2	-	1029-1007	5'CCCATATAACATCCAACAAAGTG3'

¹ Numeração nucleotídica baseada na seqüência da amostra PV (*GenBank* n. M13215)

Quadro 6 - Descrição dos *primers* utilizados para o RT-PCR e para o seqüenciamento genético das amostras quanto ao gene da proteína N.

3.2 MÉTODOS

Nesta seção será descrita a metodologia dos testes utilizados neste trabalho de tese.

3.2.1 Imunofluorescência Direta

Os fragmentos de cérebro obtidos dos camundongos que apresentaram sintomatologia compatível com a raiva durante o período de observação do ensaio biológico, do teste de NIH e do ensaio imunológico, foram pressionados em lâminas de microscopia para a obtenção da impressão do antígeno. As impressões foram delimitadas pelo uso de esmalte e fixadas pelo calor. As lâminas foram

acondicionadas em uma bandeja de inox com tampa contendo um fundo de espuma umedecida. O conjugado anti-rábico foi colocado em contato com a impressão, a caixa de inox foi tampada e acondicionada em estufa por 30 minutos à temperatura de 37 °C. Em seguida foram realizadas três lavagens com solução salina fosfatada (PBS, pH 7,8). Na leitura em microscópio de imunofluorescência, as lâminas com inclusões intracitoplasmáticas fluorescentes foram registradas como sendo positivas, de conformidade com o método descrito por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996).

3.1.2 Titulação das amostras padrão CVS e isoladas de morcegos

A amostra padrão CVS do vírus da raiva, após reativação por via intracerebral em camundongos, foi titulada em diluições seriadas em fator 10, com o diluente, partindo-se de uma suspensão inicial de cérebro de camundongos a 20% (p/v). Cada diluição do vírus foi inoculada por via intracerebral em 8 camundongos recém-desmamados, com um volume de 0,03 mL, nas diluições de 10^{-4} a 10^{-8} .

As amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos hematófagos e não-hematófagos foram inoculadas em diluições decimais seriadas, partindo-se de uma suspensão inicial de cérebro de morcego ou cérebro de camundongos previamente infectados com a amostra isolada de morcego, a 20% (p/v). Cada diluição do vírus foi inoculada por via intracerebral em 8 camundongos recém-desmamados, com um volume de 0,03 mL, nas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} .

Os camundongos inoculados foram observados por 21 dias à procura de sinais da raiva. Todos os camundongos mortos a partir do quinto dia pós-inoculação e manifestando sinais nervosos característicos da raiva foram considerados positivos. Nos casos de morte súbita ou morte com ausência de sinais clínicos foi realizada a confirmação por imunofluorescência direta do tecido cerebral. A presença ou ausência de sinais clínicos foi anotada diariamente e o título do vírus foi calculado de acordo com o método descrito por Reed e Muench (1938) expressos em $\log_{10}$ da DL_{50} .

3.2.3 Ensaio imunológico em camundongos

Camundongos previamente vacinados com a vacina anti-rábica purificada produzida em cultura de células Vero foram submetidos ao desafio viral com a amostra padrão CVS e com as amostras isoladas de morcegos, em um ensaio imunológico realizado à semelhança do teste NIH. Um grupo de camundongos foi vacinado com a vacina de referência, com posterior desafio com a amostra padrão CVS (WILBUR; AUBERT, 1999).

A vacina anti-rábica foi diluída a 1:5, 1:25 e 1:125. Para cada diluição foi vacinado um grupo de 16 camundongos, por via intra-peritoneal, com 0,5 mL da vacina diluída, perfazendo um total de duas doses, administradas com um intervalo de 7 dias.

O desafio viral foi realizado 14 dias após a primeira vacinação, por via intracerebral, com um volume de 0,03 mL da suspensão do vírus-desafio, para cada uma das dez amostras estudadas. O controle desta suspensão foi realizado através da sua titulação em camundongos não-vacinados, devendo a dose desafio se encontrar na faixa entre 12 a 50 DL_{50} para o ensaio ser considerado válido.

Os animais inoculados foram observados por 14 dias, à procura de sinais clínicos da raiva, tais como: excitação, pêlos eriçados, emagrecimento progressivo e paralisia. Os animais encontrados mortos, sem apresentar sinais clínicos previamente, tiveram seus cérebros submetidos ao teste de imunofluorescência direta para a detecção do vírus da raiva.

Para o ensaio imunológico utilizando-se as amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos foram realizados o cálculo da Dose Efetiva 50% ($DE_{50}/0,5\text{mL}$) com o teste de Probit, com o uso do programa *StatsDirect Statistical Software* versão 2.6.2 (2007), com intervalo de confiança de 95%; e o cálculo da Dose Protetora 50% ($DP_{50}/0,5\text{mL}$) com o método de Reed e Muench (1938).

3.2.4 Caracterização genética

A extração de RNA das amostras foi realizada a partir do sobrenadante da suspensão viral a 10%, de acordo com o método desenvolvido pela *Qiagen* e utilizado no kit *QIAamp Viral RNA* (QIAGEN, Hilden, Germany), onde o RNA é adsorvido em uma matriz de sílica e posteriormente eluído com tampão específico.

Um microlitro de cada RNA (0,2-0,4 µg) foi adicionado a 25µL do *mix 2x SUPERScript One-Step RT-PCR* (Invitrogen, CA, USA), 2µL do *primer* senso (10µM), 2µL do *primer* anti-senso (10µM), 1,8µL de MgSO₄ (50µM), 1µL do *mix RT-PCR/Platinum Taq* (Invitrogen) e 17,2 µL de água destilada autoclavada, para uma reação final de 50µL e submetidos a uma etapa inicial de transcrição reversa de 50°C por 60 min., seguidos de 40 ciclos de PCR a 94°C por 30 seg., 58°C por 20 seg. e 68°C por 2 min, no termociclador *PTC-0200 DNA Engine* (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) (SATO et al., 2004; SATO et al., 2005).

Os produtos da RT-PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Nesta etapa utilizou-se 1µL do produto amplificado, 1µL de tampão e 2µL de peso molecular (100bp). A banda contendo o fragmento de tamanho esperado foi extraída do gel. O DNA complementar (cDNA) foi eluído com o uso do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, USA) e submetido a reação de seqüenciamento de DNA com o uso dos kits *ABI Prism Dyedexoxy Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction version 2.0* (Applied Biosystems, CA, USA) e *BigDye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante. As seqüências foram resolvidas em seqüenciador automático *ABI Prism 3100* (Applied Biosystems) (SATO et al., 2004; SATO et al., 2005).

3.2.5 Análise filogenética

Para o gene da proteína N, as seqüências de nucleotídeos consensuais de cada amostra foram alinhadas pelo método CLUSTAL W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), com o uso do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.5.2 (HILLS, 1999). Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* – MEGA, versão 3.1 (TAMURA et al., 2004), com o algoritmo de *Neighbor-Joining*, modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e *bootstrap* com 1000 replicações. As amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos foram comparadas com amostras disponíveis no *GenBank* e listadas no **quadro 7**.

Para o gene da proteína G, cada seqüência nucleotídica foi traduzida em resíduos de aminoácidos e comparadas manualmente com o uso do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.5.2 (HILLS, 1999). A construção da árvore filogenética, com base nas seqüências de nucleotídeos, obedeceu ao mesmo critério usado para a análise das seqüências de nucleotídeos da proteína N, exceto por terem sido comparadas somente entre si.

NÚMERO DE ACESSO	ESTADO DE ORIGEM	CIDADE DE ORIGEM	VARIANTE VIRAL	ANO
AB201803.1	São Paulo	Lindóia	<i>Desmodus rotundus</i>	2000
AB201804.1	São Paulo	Lindóia	<i>Desmodus rotundus</i>	2000
AB083806.1	São Paulo	Taubaté	<i>Desmodus rotundus</i>	-
AB083807.1	São Paulo	Pindamonhangaba	<i>Desmodus rotundus</i>	1998
AB201805.1	São Paulo	S.José do Barreiro	<i>Desmodus rotundus</i>	2001
EF428576.1	Rio de Janeiro	Quissamã	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
EF428577.1	Rio de Janeiro	Quissamã	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
EF428578.1	Rio de Janeiro	Quissamã	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
CVS*	N/A	-	-	-

*Número de acesso AF406696; N/A = Não se aplica; (-) Dados não disponíveis.

Quadro 7 - Relação das amostras de vírus da raiva disponíveis no *GenBank* que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética, quanto ao gene da proteína N, das amostras isoladas de morcegos – Rio de Janeiro – 2008

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de morcegos hematófagos e não-hematófagos diagnosticadas positivas para a raiva pela Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ foram submetidas às seguintes etapas:

- Na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ foram realizados os estudos de comportamento biológico das amostras em camundongos através da inoculação intracerebral, avaliando-se o período de incubação e os sinais clínicos; a prova de NIH da vacina anti-rábica humana produzida em cultura de células Vero; e o ensaio imunológico, à semelhança do teste NIH, através do desafio viral dos camundongos vacinados com a vacina anti-rábica de uso humano, frente às amostras selecionadas de vírus rábico isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro.
- As amostras foram enviadas ao Laboratório de Raiva do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ-USP, onde foram realizados os procedimentos de extração do RNA viral.
- O material obtido na extração de RNA foi enviado ao *Veterinary Research Center* do *Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health*, da *Nihon University*, no Japão, onde foi realizado o RT-PCR e o seqüenciamento genético.

4 RESULTADOS

Os períodos médios de incubação das amostras isoladas de morcegos, observados nas passagens sucessivas realizadas em camundongos de 21 dias de idade, estão representados na **tabela 1**. Os valores foram obtidos mediante a soma individual dos dias ao longo das cinco passagens realizadas e, posteriormente, divididos pelo total de camundongos inoculados, usualmente oito por passagem. Pelos dados assim gerados observou-se a diminuição do período médio de incubação das amostras conforme o aumento do número de passagens.

Durante a fase clínica com sintomatologia da doença, os camundongos apresentaram pêlos arrepiados, prostração, convulsão, paralisia, seguida de morte. Os animais inoculados com a amostra 222/90 ainda apresentaram canibalismo e, alguns machos, priapismo.

Tabela 1- Períodos médios de incubação, em dias, observados em sucessivas passagens em camundongos, das amostras de vírus da raiva isoladas em morcegos, na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ – Rio de Janeiro – 2005

AMOSTRAS	PASSAGENS				
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	Quinta
222/90	-	-	-	8,0	7,0
419/90	-	8,0	10,0	7,3	7,9
704/97	-	-	-	8,0	7,0
151/98	-	-	-	8,0	7,0
204/01	-	-	-	8,0	7,0
399/02	-	-	8,0	7,0	6,0
624/02	-	-	7,0	10,0	6,6
755/02	-	-	11,0	10,0	8,2
046/04	-	8,0	8,1	6,3	6,6
384/04	-	8,0	7,0	6,0	6,3

(-) Passagens previamente realizadas pela Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ.

Os resultados dos títulos da amostra padrão CVS e das amostras de vírus isoladas de morcegos (em sua quinta passagem) foram calculados pelo método descrito por Reed e Muench (1938) e estão apresentados na **tabela 2**.

Tabela 2 - Resultados da titulação viral em camundongos das amostras do vírus da raiva padrão CVS e isoladas de morcegos, e sua variância, realizadas em triplicata na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ - Rio de Janeiro – 2005

AMOSTRA	TÍTULO DAS AMOSTRAS ($\log_{10} \text{dil}^{-1}$)/0,03 mL			VARIÂNCIA (%)
222/90 ¹	5,62	5,00	6,00	9,11
419/90	4,50	4,87	4,75	4,01
704/97	5,90	6,00	6,25	2,98
151/98	5,35	5,12	5,62	5,77
204/01	5,63	NR	NR	NR
399/02	4,75	4,50	4,75	3,09
624/02	4,87	4,50	4,12	8,34
755/02	4,25	4,25	4,25	0
046/04	4,87	4,25	4,75	7,11
384/04	4,25	4,00	4,25	3,46
CVS	7,01	7,18	7,01	1,39

¹ Titulação realizada em dias separados.

NR= não-realizada

Para reduzir a possibilidade de erro no desafio viral em função de uma variação inadequada da dose-desafio calculada para o ensaio imunológico, optou-se por realizar a titulação das amostras em triplicata e utilizar a média dos resultados obtidos para o cálculo da dose do vírus-desafio.

A menor variação entre os resultados das três titulações de cada amostra foi observada para amostra 755/02. A máxima variação foi observada para a amostra 222/90, cujas titulações não foram realizadas no mesmo dia.

A vacina anti-rábica purificada produzida em cultura de células Vero, utilizada neste trabalho, apresentou no ensaio de potência valor $>2,5$ UI/mL, sendo considerada aprovada para uso, com base no valor de potência estabelecido no teste NIH para a liberação de seu lote.

Os resultados dos ensaios imunológicos realizados com base no protocolo do teste de potência da vacina anti-rábica humana (NIH), com as amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos e padrão CVS, estão apresentados na **tabela 3**.

Tabela 3 - Resultados dos ensaios imunológicos em valores absolutos e percentuais dos camundongos sobreviventes, por diluição da vacina anti-rábica, de acordo com a amostra utilizada para o desafio viral, realizado na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ – Rio de Janeiro – 2005-2007

AMOSTRA VIRAL	DILUIÇÃO DA VACINA		
	1:5	1:25	1:125
222/90	15/16 ¹ 93.8% ²	8/16 50.0%	8/16 50.0%
419/90	15/16 93.8%	10/16 62.5%	5/16 31.3%
704/97	9/7 56.3%	2/14 12.5%	0/16 0.0%
151/98	7/16 43.8%	7/16 43.8%	4/16 25.0%
204/01	14/16 87.5%	12/16 75.0%	9/16 56.3%
399/02	11/16 68.8%	11/16 68.8%	8/16 50.0%
624/02	10/16 62.5%	6/16 37.5%	6/16 37.5%
755/02	14/16 87.5%	7/16 43.8%	5/16 31.3%
046/04	16/16 100.0%	11/16 68.8%	6/16 37.5%
384/04	15/16 93.8%	14/16 87.5%	10/16 62.5%
CVS	16/16 100.0%	15/16 93.8%	13/16 81.3%

¹Sobreviventes/Animais desafiados

²Percentual de sobreviventes

Dos camundongos vacinados com a vacina anti-rábica de uso humano diluída 1:5, a proteção conferida pela vacina foi maior que 80% para a maioria das amostras do vírus da raiva utilizadas no desafio viral dos ensaios imunológicos, à exceção das amostras 704/97, 151/98, 399/02 e 624/02.

No desafio viral realizado com a amostra padrão CVS, a proteção conferida pela vacina anti-rábica humana (teste) foi maior que 80%, nos três grupos de camundongos vacinados com diluições diferentes da vacina. Para a vacina anti-rábica de referência, cujo ensaio NIH foi realizado no mesmo momento do ensaio com a vacina teste e com a mesma suspensão de vírus-desafio, 81,25% dos

camundongos vacinados foram protegidos na diluição 1:5 da vacina, 68,75% na diluição 1:25 e 43,75% na diluição 1:125.

A **tabela 4** apresenta os resultados dos ensaios imunológicos em Dose Efetiva 50% por 0,5 mL de vacina, calculada através do teste de Probit; a Dose Protetora a 50% por 0,5mL de vacina e as Dose Letal 50% por 0,03mL do vírus-desafio, ambas calculadas pelo método de Reed e Muench (1938).

Tabela 4 - Resultados das DE_{50} calculadas por Probit, e das DP_{50} calculadas pelo método Reed e Muench e obtidas a partir do desafio viral (DL_{50}) dos camundongos vacinados com a vacina anti-rábica de uso humano, utilizando-se a amostra do vírus da raiva padrão CVS e as amostras isoladas de morcego, realizado na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMVJV – Rio de Janeiro – 2007-2008

AMOSTRAS	$DE_{50}/0,5\text{ mL}$ (PROBITO)	$DP_{50}/0,5\text{ mL}$ (REED E MÜENCH)	$DL_{50}/0,03\text{ mL}$ (REED E MÜENCH)
222/90	1:73	1:51	14,54
419/90	1:49	1:47	17,78
704/97	1:6	1:7	31,62
151/98	-	1:13	50,69
204/01	1:224	1:84	13,33
399/02	-	1:51	56,23
624/02	-	1:18	13,33
755/02	1:33	1:28	42,17
046/04	1:75	1:62	23,71
384/04	1:312	>1:125	36,30
CVS	-	>1:125	18,62

(-) O teste não forneceu resultados com intervalo de confiança de 95%.

Para as amostras 151/98, 399/02 e 624/02 o teste de Probit não foi capaz de fornecer resultados com intervalo de confiança de 95% porque o número de animais sobreviventes foi igual em diluições diferentes da vacina. Para a amostra padrão CVS, o teste também não produziu resultados em função do número de animais sobreviventes ter sido elevado e próximo entre diluições diferentes da vacina.

Os piores resultados da DP_{50} foram encontrados para as amostras 704/97, 151/98 e 624/02, isoladas de morcegos hematófagos. Para as amostras 384/04 e padrão CVS não foi possível calcular o valor exato da DP_{50} , pois o acumulado de camundongos sobreviventes foi superior a 50% para todas as diluições da vacina.

Para os ensaios imunológicos realizados com as amostras 204/01 e 624/02, para uma mesma dose-desafio, a vacina apresentou resultado 4,6 vezes superior frente à amostra 204/01. De modo semelhante, o ensaio com a amostra padrão CVS apresentou resultado pelo menos 2 vezes superior ao realizado com a amostra 419/90. Por outro lado, com a amostra 704/97, geneticamente relacionada à amostra 151/98, a vacina apresentou resultado inferior, frente uma dose menor do vírus-desafio.

Excetuando-se duas amostras, para todas as outras foram realizados de 1 a 2 repetições do ensaio, até que se atingisse a dose do vírus-desafio dentro ou próximo da faixa 12 a 50 DL_{50} preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Assim, a maior DL_{50} obtida foi de 56,23 para a amostra 399/02 e a menor foi de 13,33 para as amostras 204/01 e 624/02.

Comparando-se o gene N das amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos estudadas neste trabalho com outras amostras isoladas no Brasil, a relação filogenética estabelecida segregou as amostras em dois grupos distintos: variante de morcego hematófago e variante de morcego insetívoro, conforme ilustrado na **figura 7**.

Em relação ao gene da proteína N, as amostras 704/97 e 151/98, isoladas na Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, formaram um agrupamento junto com outras amostras originárias de morcegos *D. rotundus*, isoladas no Município de Quissamã, Região Norte do estado, em 2006. As amostras 384/04, 755/02 e 399/02, isoladas de morcegos *Artibeus* sp. na região Metropolitana do Rio de Janeiro e Municípios adjacentes formaram um agrupamento relacionado com uma amostra do Sul do Estado de São Paulo. De forma semelhante, a amostra 624/02 agrupou com amostras do Município de Lindóia (São Paulo).

Ainda em relação ao gene da proteína N, a amostra 222/90, isolada de um morcego insetívoro *T. laticaudata*, em 1990, no Município do Rio de Janeiro, e a amostra 046/04, isolada de um morcego insetívoro *N. laticaudata*, em 2004, no mesmo Município, agregaram-se na árvore filogenética com um valor de *bootstrap* de 88.

Figura 7 - Dendograma da relação filogenética estabelecida entre as amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ (em vermelho) e de outras espécies isoladas no Brasil (**Quadro 7**), com base na sequência de 1,353 bp do gene da proteína N – Rio de Janeiro – 2007-2008

A árvore filogenética obtida a partir das amostras seqüenciadas quanto ao gene da proteína G, seguiu o mesmo padrão de agregação estabelecido na análise do gene da proteína N, conforme ilustrado na **figura 8**.

Figura 8 -. Dendograma da relação filogenética estabelecida entre as amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ e as amostras padrão CVS (*GenBank* – nº acesso AF406694), PM (*GenBank* – nº acesso AJ871962) e PV (*GenBank* – nº acesso M13215, com base na seqüência de 1,575 bp do gene da proteína G - Rio de Janeiro – 2007-2008

As amostras 704/97 e 151/98, isoladas de morcegos *D. rotundus* na Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro e que apresentaram resultados semelhantes no ensaio imunológico formaram um agrupamento isolado sustentado por um valor de *bootstrap* de 100, com base na seqüência de 1,575 bp do gene da proteína G.

Os resultados dos alinhamentos das seqüências nucleotídicas do gene da proteína G das amostras do vírus da raiva e sua tradução em resíduos de aminoácidos encontram-se apresentados nas figuras 9 e 10, respectivamente.

AMOSTRAS

SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS

PV	-19	ATGGTGGCCG AGGCGCTGCT GTTGTGCGG CTGCTGGTGT TTCCGCTGTG CTTTGGCAA TTTCCGATTT	51
Pitman Moore	-19	...T..T. ...T..C.A..C ..T...GT. ...T..T... T..C..G..G ..C..C....	51
222/90	-19	...A..C..T. ...T..T.. AC..G....T ..TG..A..C CCT..AT... TC..C..G... ..C..C..C.	51
419/90	-19	...A..C..T. ...T..T.. AC..G....T ..TG..A..C CCT..AT... TC..C..G... ..C..C..C.	51
704/97	-19	...A..C..TT. ...C..C..T... ..C..AA..C C..T..T... TC..C..G... ..C..C..C.	51
151/98	-19	...A..C..TT. ...C..C..T... ..C..AA..C C..T..T... TC..C..G... ..C..C..C.	51
204/01	-19	...A..C..TT. ...C..C..T... ..C..AA..C C..T..T... TC..C..G... ..C..C..C.	51
399/02	-19	...A..T..TT. ...C..T..T... ..C..AA..C C..T..AT... TC..C..G... ..C..C..C.	51
624/02	-19	...A..C..TT. ...C..T..T... ..C..AA..C C..T..T... ..C..C..G... ..C..C..C.	51
755/02	-19	...A..T..TT. ...C..T..T... ..C..AA..C C..T..AT... TC..C..G... ..C..C..C.	51
046/04	-19	...A..C..T. ...T..T.. AC..G....T ..TG..A..C CCT..AT... TC..C..G... ..C..C..C.	51
384/04	-19	...A..T..TT. ...C..T..T... ..C..AA..C C..T..AT... TC..C..G... ..C..C..C.	51
CVS	-19	...T..T. ...T..C.A..C ..T...T. ...AT... T...G... ..C..T...	51

PV	52	ATACCATTCC GGATAAAGTG GGCCCGTGGA GCCCGATTGA TATTCATCAT CTGAGCTGCC CGAACACCTT	121
Pitman Moore	52	..C..G..A.. A..CG...T ..T..C.... ..T...C... C..A..C... ..C....T. .A..T....	121
222/90	52	..C..G..A.. A..C..G..C ..T...T... ..T..C... ..A...C... ..C....T. .T..T..TT.	121
419/90	52	..C..G..A.. A..C..G..C ..T...T... ..T..C... ..A...C... ..C....T. .T..T..TT.	121
704/97	52	..C..A..A.. ..C..G..T ..T..T... ..C..C... ..A...C... ..C....T. .A..T..TT.	121
151/98	52	..C..A..A.. ..C..G..T ..T..T... ..C..C... ..A...C... ..C....T. .A..T..TT.	121
204/01	52	..C..A..A.. ..C..G..T ..T..T... ..C..C... ..A...C... ..C....T. .A..T..TT.	121
399/02	52	..A..A..A.. A...G..T ..T..T... ..C..C... ..A...C... ..C....T. .A..T..TT.	121
624/02	52	..C..A..A.. A..C..G..T ..T..C... ..C..C... ..A...C... ..C....T. .A..T..TT.	121
755/02	52	..A..A..A.. ..G..T ..T..T... ..C..C... ..A...C... ..C....T. .A..T..TT.	121
046/04	52	..C..G..A.. C..C..G..C ..T...T... ..T..C..C... ..A...C... ..C....T. .T..T..TT.	121
384/04	52	..A..A..A.. A...G..T ..T..T... ..C..C... ..A...C... ..C....T. .A..T..TT.	121
CVS	52	..C..G..A.. A..C..G..T ..T..C.... ..T...C... C..A...C... ..C....T. .A...TT.	121

PV	122	GGTGGTGGAA GATGAAGGCT GCACCAACCT GAGCGGCTTT AGCTATATGG AACTGAAAGT GGGCTATATT	191
Pitman Moore	122	...T...G ...G...A. .T... ..TC..AG..C TC...C... ..C.... ..A..C..C	191
222/90	122	...T...G ..C..G..G.T.GT. .TCA..G... TCT..C... ..G...A..A..C..C	191
419/90	122	...T...G ..C..G..G.T.GT. .TCA..G... TCT..C... ..G...A..A..C..C	191
704/97	122	A..T...G ...G..G.. .T...T... ATCA..G..C TC...C... ..A..G... ..A..C..C	191
151/98	122	A..T...G ...G..G.. .T...T... ATCA..G..C TC...C... ..A..G... ..A..C..C	191
204/01	122	A..T...G ..C..G..G. .T...T... ATCA..G..C TCT..C... ..C..G... ..A..C..C	191
399/02	122	A..T...G ..C..G..G.T... ATCA..G..C TCT..C... ..A..G... ..A..C..C	191
624/02	122	A..T...G ..C..G..G.T... ATCA..G..C TCT..C... ..A..G... ..A..C..C	191
755/02	122	A..T...G ..C..G..G.T... ATCA..G..C TCT..C... ..A..G... ..A..C..C	191
046/04	122	...T...G ..C..G..G.T.GT. .TCA..G... TCT..C... ..G...A..A..C..C	191
384/04	122	A..T...G ..C..G..G.T... ATCA..G..C TCT..C... ..A..G... ..A..C..C	191
CVS	122	...A...G ..C...A.T... .TCA..G..C TC...C... ..T...T... T..A..C..C	191

PV	192	AGCGCGATTA AAATGAACGG CTTTACCTGC ACCGGCGTGG TGACCGAAGC GGAAACCTAT ACCAACTTTG	261
Pitman Moore	192	TCA..C..C. ..G... ..G..C..T... ..A..T..T. ...A..G.. A..G....C	261
222/90	192	TCT..C..A. ..G... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A... T..G....	261
419/90	192	TCT..C..A. ..G... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A... T..G....	261
704/97	192	TCT..C..A. .GG... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A..G.. T.....	261
151/98	192	TCT..C..A. .GG... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A..G.. T.....	261
204/01	192	TCT..C..A. .GG... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A..G.. T..G....	261
399/02	192	TCT..C..A. .GG... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A..G.. T.....	261
624/02	192	TCT..C..A. .GG... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A..G.. T.....	261
755/02	192	TCT..C..A. .GG... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A..G.. T.....	261
046/04	192	TCT..T..A. ..G... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A... T..G....	261
384/04	192	TCT..C..A. .GG... ..G..C..T..T ..T...T..T. ...A..G.. T.....	261
CVS	192	TTA..C..A.G..C..T... ..A...T.G..G.. T.....C ..T...C.	261

(continua)

(continuação)

PV	262	TGGGCTATGT	GACCAACCACC	TTTAAACGTA	AACATTTTCG	TCCGACCCCG	GATGCGTGCC	GTGCGGCGTA	331
Pitman Moore	262	.T..T....	C..A....A	..C..GA.A.	.G.....C..	C..C....A	..C..A..TA	.A..C....	331
222/90	262	.T..T....	C..T....A	..C..GA.A.	C....	C..A.TGT.A	A...A	.A..T..C..	331
419/90	262	.T..T....	C..T....A	..C..GA.A.	C....	C..A.TGT.A	A...A	.A..T..C..	331
704/97	262	.T..T....	C.....A	..C..GA.G.	C....	C..T.TA...	A...A	.G..T..A..	331
151/98	262	.T..T....	C.....A	..C..GA.G.	C....	C..T.TA...	A...A	.G..T..A..	331
204/01	262	.T..T....	C.....A	..C..GA.G.	C....	C..T.TA...	A...A	.G..T..A..	331
399/02	262	.T..T....	C.....A	..C..GA.G.	C....	C..T.TG...	A...A	.G..T..A..	331
624/02	262	.T..T....	C.....A	..C..GA.G.	C....	C..T.TA...	A...A	.G..T..A..	331
755/02	262	.T..T....	C.....A	..C..GA.G.	C....	C..TGTA...	A...A	.G..T..A..	331
046/04	262	.T..T....	C..T....A	..C..GA.A.	C....	C..A.TGT..	A...A	.A..T..C..	331
384/04	262	.T..T....	C.....A	..C..GA.G.	C....	C..TGTA...	A...A	.G..T..A..	331
CVS	262	.T..T....	C..A....G	..C..A.A.	.G.....C..	C..A..A..A	A..TA	.A..C....	331

PV	332	TAACTGGAAA	ATGGCGGGCG	ATCCGCGTTA	TGAAGAAAGC	CTGCATAACC	CGTATCCGGA	TTATCATTTGG	401
Pitman Moore	332	G	C..T.	..C..CA.A.	GTC.	..A..C..T.	..A..C..C.	..C..C..C..	401
222/90	332	C.....G	G....C..T.	..C..TA.A.	C.....GTCT	..T..A..T.	T....	..C.....	401
419/90	332	C.....G	G....C..T.	..C..TA.A.	GTCT	..T..A..T.	T....	..C.....	401
704/97	332	C.....G	T..T.	TA.A.	..G..GTCT	..T..A..T.	..T....T..	G..C..C..	401
151/98	332	C.....G	T..T.	TA.A.	..G..GTCT	..T..A..T.	..T....T..	G..C..C..	401
204/01	332	C.....G	T..T.	TA.A.	..G..GTCT	..T..A..T.	..T....T..	..C..C..	401
399/02	332	C.....G	A..T..	..C..TA.A.	..G..GTCT	..T..A..T.	..T....T..	..C..C..	401
624/02	332	C.....G	T..T.	TA.A.	..G..GTCT	..T..A..T.	..T....T..	..C..C..	401
755/02	332	C.....G	T..T.	..C..TA.A.	..G..GTCT	..T..A..T.	..T....T..	..C..C..	401
046/04	332	C.....G	G....C..T.	..C..TA.A.	GTCT	..T..A..T.	T....	..C.....	401
384/04	332	C.....G	..TA..T..	..C..TA.A.	..G..GTCT	..T..A..T.	..T....T..	..C..C..	401
CVS	332	C.....G	C..T.	..C..CA.A.	GTCT	..A..C..T.	C..T.	..C..C..C..	401

PV	402	CTGCGTACCG	TGAAAACCAC	CAAAGAAAGC	CTGGTGATTA	TTAGCCCGAG	CGTGGCGGAT	CTGGATCCGT	471
Pitman Moore	402	..T..A..T.	..A..G....	GTC.	..CA..T..C.	..ATC...A.	..T...A..A.	..T...C..A.	471
222/90	402	..T..G..T.	G....	GTCT	..TA..T..C.	..ATCT..A.	..T....T...	C....	471
419/90	402	..T..G..T.	G....	GTCT	..TA..T..C.	..ATCT..A.	..T....T...	C....	471
704/97	402	..A..G....	..A..G....	..T..G..GTCT	..TA..C..C.	..ATCT..A.	..T....T...	..A..C..A.	471
151/98	402	..A..G....	..A..G....	..T..G..GTCT	..TA..C..C.	..ATCT..A.	..T....T...	..A..C..A.	471
204/01	402	..A..G....	..A..G....	..T..G..GTCT	..TA..C..C.	..ATCT..A.	..T....T...	..A..C..A.	471
399/02	402	..A..G....	..A..G....	..T..G..GTCT	..TA..C..C.	..ATCT..A.	..T....T...	..A..C..A.	471
624/02	402	..A..G....	..A..G....	..T..G..GTCT	..TA..C..C.	..ATCT..A.	..T....T...	..A..C..A.	471
755/02	402	..A..G....	..A..G....	..T..G..GTCT	..TA..C..C.	..ATCT..A.	..T....T...	..A..C..A.	471
046/04	402	..T..G..T.	G....	GTCT	..TA..T..C.	..ATCT..A.	..T....T...	C....	471
384/04	402	..A..G....	..C..G....	..T..G..GTCT	..TA..C..C.	..ATCT..A.	..T....T...	..A..C..A.	471
CVS	402	..T..A..T.	..A..G....	GTCT	..C..T..C.	..ATCT..A.	..T....A...	..T...C..A.	471

PV	472	ATGATCGTAG	CCTGCATAGC	CGTGTGTTTC	CGGGCGGCAA	CTGCAGCGGC	GTGGCGGTGA	GCAGCACCTA	541
Pitman Moore	472	...CAAATC	...T..CTCA	A..G..C..C.	..T....A..	G...TCA..A	A..AA...T	C..TCT....	541
222/90	472	..C..CAAATC	GGTCA	A..AA..T..C.	..T..A..G..	G...TTG..A	A..AA..A..CT	CTTCT....	541
419/90	472	..C..CAAATC	GGTCA	A..AA..T..C.	..T..A..G..	G...TTG..A	A..AA..A..CT	CTTCT....	541
704/97	472	..C..AAATC	...T...TCT	A..G....C..	..T....G..	G...TTTG..A	A..AA...TT	CTTC....	541
151/98	472	..C...AAATC	...T...TCT	A..G....C..	..T....G..	G...TTTG..A	A..AA...TT	CTTC....	541
204/01	472	..C...AAATC	...T...TCT	A..G....C..	..T..T..G..	G...TTTG..A	A..AA...TT	CTTC....	541
399/02	472	..C..CAAATC	...C...TCT	A..G....C..	..T..T..G..	G...TCTG..A	A..AA...TT	CTTC....	541
624/02	472	..C..CAAATC	...T...TCT	A..G....C..	..T..T..G..	A...TTTG..A	A..AA...TT	CTTC....	541
755/02	472	..C..CAAATC	...C...TCT	A..G....C..	..T..T..G..	G...TTTG..A	A..AA...TT	CTTC....	541
046/04	472	..C..CAAATC	GGTCA	A..AA..T..C.	..T..A..G..	G...TTG..A	A..AA..A..CT	CTTCT....	541
384/04	472	..C..CAAATC	...C...TCT	A..G....C..	..T..T..G..	G...TTTG..A	A..AA...TT	CTTC....	541
CVS	472	...CA..ATC	...T..CTCG	A..G..C..C.	..TA...G..	G...CCA..A	..A...T	CTTCT....	541

PV	542	TTGCAGCACC	AACCATGATT	ATACCATTTG	GATGCCGGAA	AACCCGCGTC	TGGGCATGAG	CTGCGATATT	611
Pitman Moore	542	C...TCA..T	C..	C..G	..T...A..A	CAA..G..CACC	T..T..C...		611
222/90	542	C...TCA..T	C..	A..	G..AG..AA..A	..C..G..CATC	T..T..C...		611
419/90	542	C...TCA..T	C..	A..	G..AG..AA..A	..C..G..CATC	T..T..C...		611
704/97	542	...TCA...	C..	C..G	G..A..AA..A	..C..G..CATC	T...C...		611
151/98	542	...TCA...	C..	C..G	G..A..AA..A	..C..G..CATC	T...C...		611
204/01	542	...TCA...	C..	C..G	G..A..AA..A	..C..G..CATC	T...C...		611
399/02	542	C...TCA...	C..	C..G	G..A..AA..A	..C..G..CATC	T...C...		611
624/02	542	C...TCA...	C..	C..G	G..A..AA..A	..C..G..CATC	T...C...		611
755/02	542	C...TCA...	C..	C..G	G..A..AA..A	..C..G..CATC	T...C...		611
046/04	542	C...TCA..T	C..	A..	G..AG..AA..A	..C..G..CATC	T..T..C...		611
384/04	542	...TCA...	C..	C..G	G..A..AA..A	..C..G..CATC	T...C...		611
CVS	542	C...TC...T	C..	C..G	..T...A..A	..A..G...TC	T..T..C...		611

(continua)

(continuação)

PV	612	TTTACCAACA	GCCGTGGCAA	ACGTGCGAGC	AAAGGCAGCG	AAACCTGCGG	CTTTGTGGAT	GAACGTGGCC	681
Pitman Moore	612	T	..A.A..G..	GA.A..ATC.	G.A.A	G..T.....		..A.A....	681
222/90	612	T	..AAA..G..	GA.A..TTCT	..G..AG..A	G..TT....	A..C.....	..A.G...AT	681
419/90	612		..AAA..G..	GA.A..TTCT	..G..AG..A	G..TT....	A..C.....	..A.G...AT	681
704/97	612	G..	..AAA..G..	..AAG..ATCT	..G..AG..A	G..T.....	A.....	..A.G...T	681
151/98	612	G..	..AAA..G..	..AAG..ATCT	..G..AG..A	G..T.....	A.....	..A.G...T	681
204/01	612	G..	..AAA..G..	..AAG..ATCT	..G..AG..A	G..T.....	A.....	..A.G...T	681
399/02	612	G..	..TAAA..G..	GAAG..ATCT	..G..AG..A	G..T.....	A.....	..A.G...T	681
624/02	612	..C....G..	..TAAA..G..	..AAG..ATCT	AG..A	G..T..T..	A.....	..A.G...T	681
755/02	612	G..	..TAAA..G..	GAAG..TTCT	..G..AG..A	G..T.....	A.....	..A.G...T	681
046/04	612		..AAA..G..	GA.A..TTCT	..G..AG..A	G..TT....	A..C.....	..A.G...AT	681
384/04	612	G..	..TAAA..G..	GAAG..TTCT	..G..AG..A	G..T.....	A.....	..A.G...T	681
CVS	612	T	..TA.A..G..	GA.A..ATC.	G..T	G..T.....	A...	..A.A....	681

PV	682	TGTATAAAAG	CCTGAAAGGC	GCGTGCAAAAC	TGAAACTGTG	CGGCGTGCTG	GGCCTGCGTC	TGATGGATGG	751
Pitman Moore	682	GTC	T..A.....A	..A.....GG.	..C..GT..A..	T..A..T..T	..A..TA.A..	..T.....	751
222/90	682	GTC	T..A.....A	..A..T.GG.	..T..GT....	..A..TTCT	..A..TA.A..	..T.....	751
419/90	682	GTC	T..A.....A	..A..T.GG.	..T..GT....	..A..TTCT	..A..TA.A..	..T.....	751
704/97	682	C..GTC	T..A.....A	..A..T....	..C..GT....	..A..T..C	..A..TA.A..	..T.....	751
151/98	682	C..GTC	T..A.....A	..A..T....	..C..GT....	..A..T..C	..A..TA.A..	..T.....	751
204/01	682	C..GTC	T..A.....A	..A..T....	..C..GT....	..A..T..C	..A..TA.A..	..T.....	751
399/02	682	C..GTC	T..A.....A	..A..T....	..C..GT....	..A..T..C	..A..TA.A..	..T.....C	751
624/02	682	C..GTC	T..A.....G	..A..T....	..C..G....	..A..T..C	..A..TA.A..	..T.....	751
755/02	682	C..GTC	T..A.....G	..A..T....	..C..G....	..A..T..C	..A..TA.A..	..T.....C	751
046/04	682	C..GTC	T..A.....A	..A..T.GG.	..T..GT....	..A..TTCT	..A..TA.A..	..T.....	751
384/04	682	C..GTC	T..A.....A	..A..T....	..C..G....	..A..T..C	..A..TA.A..	..T.....C	751
CVS	682	..A.....GTC	TT..A.....A	..A.....	..C..GT..A..	T..A..T..A	..A..TA.A..	..T.....	751

PV	752	CACCTGGGTG	GCGATGCAGA	CCAGCAACGA	AACCAATGG	TGCCCGCCGG	GCCAGCTGGT	GAACCTGCAT	821
Pitman Moore	752	A..A.....C	A..	..ATCAG..T.	G.....	T..A	AT..T....	..TT...C	821
222/90	752	A.....C	T....	..GTCAG..G.	G.T.....	TT.T	AT..AT....	..T..A...	821
419/90	752	A.....C	T....	..GTCAG..G.	G.....	TT.T	AT..AT....	..T..A...	821
704/97	752	A.....T	T..A..T..A.	..TCAG..G.	C.....	T....	AT..AT....	..T..A...	821
151/98	752	A.....T	T..A..T..A.	..TCAG..G.	C.....	T....	AT..AT....	..T..A...	821
204/01	752	A.....T	T..A..T..A.	..TCAG..G.	T.....	T....	AT..AT....	..T..A...	821
399/02	752	A.....T	T..A..T..A.	..ATCAG..G.	T.....	T....	AT..AT....	..T..A...	821
624/02	752	A.....T	T..A..T..A.	..ATCAG..G.	T.....	T....	AT..AT....	..T..A...	821
755/02	752	A.....T	T..A..T..A.	..ATCAG..G.	T.....	T....	AT..AT....	..T..A...	821
046/04	752	A.....T	T....	..GTCAG..G.	G.....	TT.T	AT..AT....	..T..A...	821
384/04	752	A.....T	T..A..T..A.	..ATCAG..G.	T.....	T....	AT..AT....	..T..A...	821
CVS	752	A..A.....C	A..	..ATCA..T.		T..C	AT..T....	..TT...C	821

PV	822	GATTTTCGTA	GCGATGAAAT	TGAACATCTG	GTGGTGGAAG	AACTGGTGAA	AAAACGTGAA	GAATGCCTGG	891
Pitman Moore	822	..C.....CT	CA..C..G..	..G.....C	..T.....G	..GT..A..C	G..A.A..G	T...	891
222/90	822	..C.....ACT	CA..C..G..	A.....T	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	T...	891
419/90	822	..C.....ACT	CA..C..G..	A.....T	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	T...	891
704/97	822	..C.....ACT	CA..C.....	A..G...C	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	TT...	891
151/98	822	..C.....ACT	CA..C.....	A..G...C	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	TT...	891
204/01	822	..C.....ACT	CA..C.....	A..G...C	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	TT...	891
399/02	822	..C.....ACT	CA..C.....	A..G...C	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	TT...	891
624/02	822	..C.....ACT	CA..C.....	A..G...C	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	TT...	891
755/02	822	..C.....ACT	CA..C.....	A..G...C	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	TT...	891
046/04	822	..C.....ACT	CA..C..G..	A.....T	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	T...	891
384/04	822	..C.....ACT	CA..C.....	A..G...C	..C.....G	..GT...C	G..GA.G..	TT...	891
CVS	822	..C.....CT	CA..C.....	..G..C..T	..T..A..G	..GT...C	G..GA.A..G	T...	891

PV	892	ATGCGCTGGA	AAGCATTATG	ACCACCAAAA	GCGTGAGCTT	TCGTCGCTCTG	AGCCATCTGC	GTAACCTGGT	961
Pitman Moore	892	...AT..A..	GTC...C...	GT	CA..A..T..	CA..A...C	..T..C...A	..A...T..	961
222/90	892	..CA..A....	GTC...C...	T	CA..A..T..	CA..A...C	CT..A	..A...T..	961
419/90	892	..CA..A....	GTC...C...	T	CA..A..T..	CA..A...C	CT..A	..A...T..	961
704/97	892	..C..AT....	GTC...C...	T	CT.....T..	..A.A...C	..T...A..A	..A...T..	961
151/98	892	..C..AT....	GTC...C...	T	CT..A..T..	..A.A...C	..T...A..A	..A...T..	961
204/01	892	..C..AT....	GTC...C...	GT	CT..A..T..	..A.A...C	..T..T..A	..A...T..	961
399/02	892	..C..AT....	GTC...C...	T	CT..A..T..	..A.A...C	..T..CT..A	..A...T..	961
624/02	892	..C..AT....	GTC...C...	..A.....T	CT..A..T..	..A.A...C	..T..T..A	..A...T..	961
755/02	892	..C..AT....	GTC...C...	T	CT..A..T..	..A.A...C	..T..T..A	..A...T..	961
046/04	892	..CA..A....	GTC...C...	T	CA..A..T..	..C..A...C	CT..A	..A...T..	961
384/04	892	..C..AT....	GTC...A...	T	CT.....T..	..A.A...C	..T..T..A	..A...T..	961
CVS	892	...A..A..	GTC...C...	..A.....GT	CA.....T..	CA..A...C	..T...T..AA	..A...T..	961

(continua)

(continuação)

PV	962	GCCGGGCTTT	GGCAAAGCGT	ATACCATTTT	TAACAAAACC	CTGATGGAAG	CGGATGCGCA	TTATAAAAGC	1031
Pitman Moore	962	C..A..G...	..A....A.	A..C.	T.	G.	..T....T.	C..C..GTCA	1031
222/90	962	T..A..A...	..G..G..T.	T..A..	C.....G..T	T..A.....	..T....T.	C.....CTCA	1031
419/90	962	T..A..A...	..G..G..T.	T..A..	C.....G..T	T..A.....	..T....T.	C.....CTCA	1031
704/97	962	C..T..G...	..A..G..A.	C..T..A..	C.....G..T	T.....G.	..T..C..C.	C..C..GTCA	1031
151/98	962	C..T..G...	..A..G..A.	C..T..A..	C.....G..T	T.....G.	..T..C..C.	C..C..GTCA	1031
204/01	962	C..T..G...	..A..G..A.	C..T..A..	C.....G..T	T.....G.	..T..C..C.	C..C..GTCA	1031
399/02	962	C..T..G...	..A..G..A.	C..T..A..	C.....G..T	T.....G.	..T..C..C.	C..C..GTCA	1031
624/02	962	C..T..G...	..A..G..A.	C..T..A..	C.....G..T	T.....G.	..T..C..C.	C..C..GTCA	1031
755/02	962	C..T..G...	..A..G..A.	C..T..A..	C.....G..T	T.....G.	..T..C..C.	C..C..GTCA	1031
046/04	962	T..A..A...	..G..G..T.	T..A..	C.....G..T	T..A.....	..T....T.	C.....CTCA	1031
384/04	962	C..T..G...	..A..G..A.	C..T..A..	C.....G..T	T.....G.	..T..C..C.	C..C..GTCA	1031
CVS	962	C..T..G...	..A....A.	A..C.	G..T	T.....G.	..C....T.	C..C..GTCA	1031

PV	1032	GTGCGTACCT	GGAACGAAAT	TATTCGAGC	AAAGGCTGCC	TGCGTGTGGG	CGGCCGTTGC	CATCCGCATG	1101
Pitman Moore	1032	..C..G....	T..G..	C..C..CTCA	G..TT	..AAA..T..	A..AA..G..	T....	1101
222/90	1032	..T..A..T.	T..G..	C..C..CTCA	G..T.	..AAAA..C.	A..GA..A..T	T....	1101
419/90	1032	..T..A..T.	T..G..	C..C..CTCA	G..T.	..AAAA..C.	A..GA..A..T	T....	1101
704/97	1032	..T..G..T.	G....	C..C..CTCA	G..TT	..AAA..CA.	A..AGA..G..T	T..C..	1101
151/98	1032	..T..G..T.	G....	C..C..CTCA	G..TT	..AAA..CA.	A..AGA..G..T	T..C..	1101
204/01	1032	..T..G..T.	G....	C..C..CTCA	G..TT	..AAA..CA.	A..AGA..G..T	T..C..	1101
399/02	1032	..T..G..T.	G....	C..C..CTCA	G..TT	..AAA..CA.	A..AGA..G..T	T..C..	1101
624/02	1032	..T..G..T.	G....	C..C..CTCA	G..TT	..AAA..CA.	A..AGA..G..T	T..C..	1101
755/02	1032	..T..G..T.	G....	C..C..CTCA	G..TT	..AAA..CA.	A..AGA..G..T	T..C..	1101
046/04	1032	..T..A..T.	T..G..	C..C..CTCA	G..T.	..AAAA..C.	A..GA..A..T	T....	1101
384/04	1032	..T..G..T.	G....	C..C..CTCA	G..TT	..AAA..CA.	A..AGA..G..T	T..C..	1101
CVS	1032	..CA..A..T.	T..G..	CC..C..TTCA	G..TT	..AA..A..T..	G..GA..G..T	T....	1101

PV	1102	TGAACGGCGT	GTTTTTTAAC	GGCATTATTC	TGGGCCCGGA	TGGCAACGTG	CTGATTCCGG	AAATGCAGAG	1171
Pitman Moore	1102	G..	C..T	..T..A..AT	..A..G..T.	C...C..T..C	..A..C..A.	..G....ATC	1171
222/90	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
419/90	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
704/97	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
151/98	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
204/01	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
399/02	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
624/02	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
755/02	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
046/04	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
384/04	1102	..G....A..	C..T	..T..A..AT	..T..T..A.	C...G..T..C	..T....C..	..G....ATC	1171
CVS	1102	G..	C..T	..T..A..AT	..A..A..T.	C...T..T..C	..T..A..C..A.	..G....ATC	1171

PV	1172	CAGCCTGCTG	CAGCAGCATA	TGGAAGTCTG	GGTGAAGCAG	GTGATTCCGC	TGATGCATCC	GCTGGCGGAT	1241
Pitman Moore	1172	ATC...C..C	A....	...GT..T.	..AAATCTTCA	..T..C..C.	C....	C....A..C	1241
222/90	1172	GTC...A..C	..A..A....	...GT..T.	..A..TC..TCT	..A..C..C.	..A.....	CT...A..C	1241
419/90	1172	GTC...A..C	..A..A....	...GT..T.	..A..TC..TCT	..A..C..C.	..A.....	CT...A..C	1241
704/97	1172	GTCT..A..T	..A..A....	...G..T.	..A..TCTTCT	..A..C..CT	..A.....	CT.....C	1241
151/98	1172	GTCT..A..T	..A..A....	...G..T.	..A..TCTTCT	..A..C..CT	..A.....	CT.....C	1241
204/01	1172	GTCT..A..T	..A..A....	...G..T.	..A..TCTTCT	..A..C..CT	..A.....	CT.....C	1241
399/02	1172	GTCT..A..T	..A..A....	...G..T.	..A..TCTTCT	..A..C..CT	..A.....	CT.....C	1241
624/02	1172	GTCT..A..T	..A..A....	...G..AT.	..A..TCTTCT	..A..C..CT	..A.....	CT.....C	1241
755/02	1172	GTCT..A..T	..A..A....	...G..T.	..A..TCTTCT	..A..C..CT	..A.....	CT.....C	1241
046/04	1172	GTC...A..C	..A..A....	...GT..T.	..A..TC..TCT	..A..C..C.	..A.....	CT...A..C	1241
384/04	1172	GTCT..A..T	..A..A....	...GT..T.	..AATCTTCT	..A..C..CT	..A.....	CT.....C	1241
CVS	1172	ATC...C..C	A....	...GT..T.	..AATC..TCG	..T..C..C.	..TG....C..	C....A..C	1241

PV	1242	CCGAGCACC	TGTTTAAAAA	CGGCGATGAA	GCGGAAGATT	TTGTGGAAGT	GCATCTGCCG	GATGTGCATG	1311
Pitman Moore	1242	..TTCT..A.	..T..C..G.	A..T....G	..T..G....	T....	T..C..C..C	T..CA	1311
222/90	1242	..ATCA..T.	..C..C..GG	A....G....	..A..GA..C.	T..G.	T..CT....	..A..T..CA	1311
419/90	1242	..ATCA..T.	..C..C..GG	A....G....	..A..GA..C.	T..G.	T..CT....	..A..T..CA	1311
704/97	1242	..TCA..A.	..C..C..GG	A..G....	G....	T....	T..C..C..A	T..CA	1311
151/98	1242	..TCA..A.	..C..C..GG	A..G....	G....	T....	T..C..C..A	T..CA	1311
204/01	1242	..TCA..A.	..C..C..GG	A..G....	G....	T....	T..C..C..A	T..CA	1311
399/02	1242	..TCA..A.	..C..C..GG	A..G....	G..C.	T....	T..C..C..A	T..CA	1311
624/02	1242	..TCA..A.	..C..C..GG	A..G....	G....	T....	T..C..C..A	T..CA	1311
755/02	1242	..TCA..A.	..C..C..GG	A..G....	G..C.	T....	T..C..C..A	T..CA	1311
046/04	1242	..ATCA..T.	..C..C..GG	A....G....	..A..GA..C.	T..G.	T..CT....	..A..T..CA	1311
384/04	1242	..TCA..A.	..C..C..GG	A..G....	G..C.	T....	T..C..C..A	T..CA	1311
CVS	1242	..TCT....	..T..C..GG	T..C..G	..T..G....	T....	T..C..T..C	T..CA	1311

(continua)

(continuação)

PV	1312	AACGTATTAG	CGGCCGTGGAT	CTGGGCCTGC	CGAAGTGGGG	CAAAATATGTG	CTGCTGAGCG	CGGGCGCGCT	1381
Pitman Moore	1312	..AG..CTC	A..G..T..C	...T..C.	A..G....A	T..A...CT.	A..G..CA.		1381
222/90	1312	..AGG.CTC	...GA..T..C	..T..T..C.	A.....G.....T...	..A...T.	A..T..T..		1381
419/90	1312	..AGG.CTC	...GA..T..C	..T..T..C.	A.....G.....T...	..A...T.	A..T..T..		1381
704/97	1312	..AG..CTC	...G..T..C	..T..T..C.	..GT.....G.....C.C	..A...TT.	A..T.GT..		1381
151/98	1312	..AG..CTC	...G..T..C	..T..T..C.	..GT.....G.....C.C	..A...TT.	A..T.GT..		1381
204/01	1312	..AG..CTC	...G..T..C	..T..T..C.	..GT.....G.....C.C	..A...TT.	A..T.GT..		1381
399/02	1312	..AG..CTC	T..G..T..C	..T..T..C.	..GT.....G.....C.C	..A...TT.	A..T.GT..		1381
624/02	1312	..AG..CTC	A..G..T...	..T..T..C.	..GT.....G.....C.C	..A...TT.	A..T.GT..		1381
755/02	1312	..AG..CTC	T..G..T..C	..T..T..C.	..GT.....G.....C.C	..A...TT.	A..T.GT..		1381
046/04	1312	..AGG.CTC	...GA..T..C	..T..T..C.	A.....G.....C...	..A...T.	A..T..T..		1381
384/04	1312	..AG..CTC	T..G..T..C	..T..T..C.	..GT.....G.....C.C	..A...TT.	A..T.GT..		1381
CVS	1312	T..AGG.CTC	A..A..T..C	...T..T..C.	G..G....A	T..A....T.	A..G..C..		1381

PV	1382	GACCGCGCTG	ATGCTGATTA	TTTTTCTGAT	GACCTGCTGG	CGTCGTGTGA	ACCGTAGCGA	ACCGACCCAG	1451
Pitman Moore	1382	..TT.GC...	G..T...AT	...CC..A..	...A..G..C	A..AA..A..CC.	T..ACCA..	T...AA..A	1451
222/90	1382	G..A..A..A	T...CA.	C..CT..A..	T..A..T..C	A..AA..G..C.	TA..A..CA..	T..A..TAA..	1451
419/90	1382	G..A..A..A	T...CA.	C..CT..A..	T..A..T..C	A..AA..G..C.	TA..A..CA..	T..A..TAA..	1451
704/97	1382	G..GA...A	G..T...A.	C..GCTCT..	G..A...T	A..AA..AACC.	G..A..CA..	GT..A..GAAGA	1451
151/98	1382	G..GA...A	G..T...A.	C..GCTCT..	G..A...T	A..AA..AACC.	G..A..CA..	GT..A..GAAGA	1451
204/01	1382	G..GA...A	G..T...A.	C..GCTCT..	G..A...T	A..AA..AACC.	G..A..CA..	GT..A..GAAGA	1451
399/02	1382	G..G..A..A	G..T...A.	C..GCTCT..	G..A...T	A..AA..AACC.	G..A..CA..	GT..A..GAAGA	1451
624/02	1382	G..GA...A	GCT...A.	C..GCTCT..	G..A...T	A..AA..AACC.	G..A..CA..	GT..A..GAAGA	1451
755/02	1382	G..G..A..A	G..T...A.	C..GCTCT..	G..A...T	A..AA..AACC.	G..A..CA..	GT..A..GAAGA	1451
046/04	1382	G..A..A..A	G..T...CA.	C..CT..A..	T...T..C	A..AA..G..C.	TA..A..CA..	T..A..TAA..	1451
384/04	1382	G..G..A..A	G..T...A.	C..GCTCT..	G..A...T	A..AA..AACC.	G..A..CA..	GT..A..GAAGA	1451
CVS	1382	...T..CT..	...T...A.	...C.....	...A..T..T	A..AA..A..C.	T..ATCA..	...T..G..A	1451

PV	1452	CATAAACCCTGC	GTGGCACC GG	CCGTGAAGTG	AGCGTGACCC	CGCAGACGGG	CAAAATTATT	AGCAGCTGGG	1521
Pitman Moore	1452	.GC.GTT.TG	.A..G..A..	GA.GA.T...	TCA..C..TT	.C..A.....	A...G..C..A	CCTTCA....	1521
222/90	1452	..AGGT..CTG	AG.AGT.AA.	AA.GA...A	TCT..A..T.	.C..A..A...	G...G..C..A	TCTTCA....	1521
419/90	1452	..AGGT..CTG	AG.AGT.AA.	AA.GA...A	TCT..A..T.	.C..A..A...	G...G..C..A	TCTTCA....	1521
704/97	1452	.GAGG.TCTG	.A.AGT.A.A	GAAAA..T...	.CG.CA....	.C...CTA.	G...G..CG.A	TCTTCA....	1521
151/98	1452	.GAGG.TCTG	.A.AGT.A.A	GAAAA..T...	.CG.CA....	.C...CTA.	G...G..CG.A	TCTTCA....	1521
204/01	1452	.GAGG.TCTG	.A.AGT.A.A	GAAAA..G..A	.CG.CA....	.C...CTA.	G...G..CG.A	TCTTCA....	1521
399/02	1452	.GAGG.TCTG	.A.AGT.A.A	AAAGA..G..A	.CG.CA....	.C...CTA.	G...G..CG.A	TCTTCA....	1521
624/02	1452	.GAGG.TCT	.A.AGT.A.A	GAAAA..G..A	.CG.CA....	.C...CTA.	G...G..CG.A	TCTTCA....	1521
755/02	1452	.GAGG.TCTG	.A.AGT.A.A	AAAGA..G..A	GCG.CA....	.C..A.CTA.	G...G..C..A	TCTTCA....	1521
046/04	1452	..AGGT..CTG	AG.AGT.AA.	AA.GA...A	TCT..A..T.	.C..A..A...	G...G..C..A	TCTTCA....	1521
384/04	1452	.GAGG.TCTG	.A.AGT.A.A	AAAGA..G..A	.CG.CA....	.C..A.CTA.	G...G..CG.A	TCTTCA....	1521
CVS	1452	..C..T..CA	.A..G..A..	GA.G..G...	TCA..C..T.	.C..A.....	G..G..C..A	TCTTCA....	1521

PV	1522	AAAGCTATAA	AAGCGGCGGC	GAAACCGGCC	TG---	1553
Pitman Moore	1522	..TCA.....	G..T..G..T	C.G...A.A.	..TGA	1556
222/90	1522	.GCTG..C..	..AT..A...	..G...AAG.	..TGA	1556
419/90	1522	.GCTG..C..	..AT..A...	..G...AAG.	..TGA	1556
704/97	1522	.GTTG..C..	G..T.AA...	..TG..A.G.	..TGA	1556
151/98	1522	.GTTG..C..	G..T.AA...	..TG..A.G.	..TGA	1556
204/01	1522	.GTTG..C..	G..T.AA...	..TG..A.G.	..TGA	1556
399/02	1522	.GTTG..C..	G..T.AA...	..TG..A.GT	..TGA	1556
624/02	1522	.GTTA..C..	G..T.AA...	..TG..A.T.	..TGA	1556
755/02	1522	.GTTG..C..	G..T.AA...	..TG..A.GT	..TGA	1556
046/04	1522	.GTTG..C..	..AT..A...	..G...AAG.	..TGA	1556
384/04	1522	.GTTG..C..	G..T.AA...	..TG..A.GT	..TGA	1556
CVS	1522	..TCAC..C..	G..T..G..T	C.G...A.A.	..TGA	1556

Figura 9 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína G de amostras vírus da raiva isoladas de morcegos, com as amostras padrão CVS, PV e PM. Em destaque: substituição de uma citosina (C) por uma guanina (G), na posição 392, nas amostras 704/97 e 151/98 – Rio de Janeiro – 2007-2008

Amostras

Peptídeo-sinal

Ectodomínio→

II b

PV	-19	MVPQALLFVP	LLVFPLCFGK	FPIYTIPDKL	GPWSPIDIHH	LSCPNNLVVE	DEGCTNLSGF	SYMELKVGVI	
Pitman Moore	-19		..G.S.....	E.....			E.....		51
222/90	-19	..I.....L..	..VISS..L..				S.....		51
419/90	-19	..I.....L..	..VISS..L..				S.....		51
704/97	-19	..IL.....	..ISS..L..						51
151/98	-19	..IL.....	..ISS..L..						51
204/01	-19	..IL.....	..ISS..L..						51
399/02	-19	..IL.....	..ISS..L..						51
624/02	-19	..IL.....	..ISS..L..						51
755/02	-19	..IL.....	..ISS..L..						51
046/04	-19	..I.....L..	..VISS..L..				S.....		51
384/04	-19	..IL.....	..ISS..L..						51
CVS	-19								51

φ

PV	52	SAIKMNGFTC	TGVVTEAETY	TNFVGVTITT	FKRKHFRTPT	DACRAAYNWK	MAGDPRYEES	LHNPYPDYHW	121
Pitman Moore	52	...V.....							121
222/90	52	...V.....			MS.....		V.....	Q.....	121
419/90	52	...V.....			MS.....		V.....	Q.....	121
704/97	52	...V.....			I.....			Q.....E.....	121
151/98	52	...V.....			I.....			Q.....E.....	121
204/01	52	...V.....			I.....			Q.....	121
399/02	52	...V.....			M.....		T.....	Q.....	121
624/02	52	...V.....			I.....			Q.....	121
755/02	52	...V.....			V.....			Q.....	121
046/04	52	...V.....			MS.....		V.....	Q.....	121
384/04	52	...V.....			V.....		IT.....	Q.....	121
CVS	52	L.....							121

II

II

PV	122	LRTVKTTKES	LVIISSPSVAD	LDPYDRSLHS	RVFPGGNCSSG	VAVSSTYCST	NHDYTIWMP	NERLGMSCDI	191
Pitman Moore	122	...R.....	..I.....T..	..K.....	..K.....	IT.....		...PRTPT...	191
222/90	122		..I.....	..K.....R..	..I.....K.L..	IT.....		EA.....T...	191
419/90	122		..I.....	..K.....R..	..I.....K.L..	IT.....		EA.....T...	191
704/97	122		..I.....	..K.....	..K.L.....	IT.....		E.....T...	191
151/98	122		..I.....	..K.....	..K.L.....	IT.....		E.....T...	191
204/01	122		..I.....	..K.....	..K.L.....	IT.....		E.....T...	191
399/02	122		..I.....	..K.....	..K.L.....	IT.....		E.....T...	191
624/02	122		..I.....	..K.....	..K.L.....	IT.....		E.....T...	191
755/02	122		..I.....	..K.....	..K.L.....	IT.....		E.....T...	191
046/04	122		..I.....	..K.....R..	..I.....K.L..	IT.....		EA.....T...	191
384/04	122		..I.....	..K.....	..K.L.....	IT.....		E.....T...	191
CVS	122				S.K.P.....				191

φ

φ

II a

PV	192	FTNSRGKRAS	KGSETCGFVD	ERGLYKSLKG	ACKLKLCGVL	GLRLMDGTWV	AMQTSNETKW	CPPGQLVNLH	261
Pitman Moore	192		..NK.....		..R.....		D.....	D.....	261
222/90	192	...K.....	..GKI.....		..R.....S..		..I.....E.I..	..SD.....	261
419/90	192	...K.....	..GKI.....		..R.....S..		..I.....E.....	..SD.....	261
704/97	192	..S.K..K..	..GK.....				SI.....DD..	..D.....	261
151/98	192	..S.K..K..	..GK.....				SI.....DD..	..D.....	261
204/01	192	..S.K..K..	..GK.....				SI.....DD..	..D.....	261
399/02	192	..S.K..K..	..GK.....				SI.....DD..	..D.....	261
624/02	192	..S.K..K..	..GK.....				SI.....DD..	..D.....	261
755/02	192	..S.K..K..	..GK.....				SI.....DD..	..D.....	261
046/04	192	...K.....	..GKI.....		..R.....S..		..I.....E.....	..SD.....	261
384/04	192	..S.K..K..	..GK.....				SI.....DD..	..D.....	261
CVS	192							..D.....	261

φ

(continua)

		IV		III						
PV	262	DERSDEIEHL	VVEELVKKRE	ECLDALESIM	TTKSVSFRRL	SHLRKLVPGF	GKAYTIFNKT	LMEADAHYKS	331	
Pitman Moore	262	.	.	.	.	.	.	.	331	
222/90	262	H	.	.	T	.	.	.	N	331
419/90	262	H	.	.	T	.	.	.	N	331
704/97	262	H	.	.	.	Y	.	.	.	331
151/98	262	H	.	.	.	Y	.	.	.	331
204/01	262	H	.	.	.	Y	.	.	.	331
399/02	262	H	.	.	.	Y	.	.	.	331
624/02	262	H	.	.	.	Y	.	.	.	331
755/02	262	H	.	.	.	Y	.	.	.	331
046/04	262	H	.	.	T	.	.	.	N	331
384/04	262	H	.	.	.	Y	.	.	.	331
CVS	262	.	.	R	.	.	.	.	.	331

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

755/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

046/04

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

384/04

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

CVS

332

.....L.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

.....V.....

401

III

a

III

Ψ

PV

332

VRTWNEIIPS

KGCLRVGGRC

HPHVNGVFFN

GIILGPDGNV

LIPEMQSSLL

QQHMELLVSS

VIPLMHPLAD

401

Pitman Moore

332

.....K.....

.....K.....

.....H.....

.....K.....

.....K.....

401

222/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

419/90

332

.....K.....

.....D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.F.....

401

704/97

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

151/98

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

204/01

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

399/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

624/02

332

.....K.RE.....

.....P.D.....

.....D.....

.....D.....

.....E.....

401

←Ectodomínio Transmembrana Endodomínio→

PV	402	PSTVFKN GDE AEDFVEV HLP DVHERISGVD LGLPNWGKYV LLSAGALTAL MLIIFLMTCW RRVNRSEPTQ	471
Pitman Moore	402	 E YKQ MT . . . MIG. V. FS . . WC . . A . P SK.	471
222/90	402	 E . . N . . I KQV . I L M . . . A . I T . . I C T SIK	471
419/90	402	 E . . N . . I KQV . I L M . . . A . I T . . I C T SIK	471
704/97	402	 E KQ S . . L MI . G AT . V . CS A C . TK T SRR	471
151/98	402	 E KQ S . . L MI . G AT . V . CS A C . TK T SRR	471
204/01	402	 E KQ S . . L MI . G AT . V . CS A C . TK T SRR	471
399/02	402	 E KQ S . . L MI . G AT . V . CS A C . TK T SRR	471
624/02	402	 E KQ S . . L MI . G AT . A . CS A C . TK T SRR	471
755/02	402	 E KQ S . . L MI . G A . V . CS A C . TK T SRR	471
046/04	402	 E . . N . . I KQV . I L M . . . A . I T . . I C T SIK	471
384/04	402	 E KQ S . . L MI . G A . V . CS A C . TK T SRR	471
CVS	402	. . D NOV C	471

(continua)

(continuação)

PV	472	HNLRGTGREV	SVTPQSGKII	SSWESYKSGG	ETGL	505
Pitman Moore	472	RSFG....N.	...S....V.	P.....	Q.R.*	505
222/90	472	QGPEESR.K.	N..V.	...L..N..	..K.*	505
419/90	472	QGPEESR.K.	N..V.	...L..N..	..K.*	505
704/97	472	RSGGESEKN.	TA...TR.VV	...L...E.	DAR.*	505
151/98	472	RSGGESEKN.	TA...TR.VV	...L...E.	DAR.*	505
204/01	472	RSGGESE.K.	TA...TR.VV	...L...E.	DAR.*	505
399/02	472	RSGGESEKK.	TA...TR.VV	...L...E.	DAR.*	505
624/02	472	RGS.ESEKK.	TA...TR.VV	...L...E.	DAS.*	505
755/02	472	RSGGESEKK.	AA...TR.V.	...L...E.	DAR.*	505
046/04	472	QGPEESR.K.	N..V.	...L..N..	..K.*	505
384/04	472	RSGGESEKK.	TA...TR.VV	...L...E.	DAR.*	505
CVS	472			H....	Q.R.*	505

Figura 10. Alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína G das amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos e das amostras padrão CVS, PV e PM. Destaque em linha tracejada para a região do peptídio-sinal (ou **SP** – *Signal Peptide*) e para o domínio transmembrana. Caixas de linha contínua indicam os principais sítios antigênicos e epítomos. Phi (ϕ) indica os resíduos envolvidos na patogenicidade. Círculo destaca a substituição presente na posição 118 das amostras 704/97 e 151/98 – Rio de Janeiro – 2007-2008

A região do ectodomínio do gene da proteína G das amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos apresenta-se mais conservada, com 89,75% de identidade entre os aminoácidos, enquanto a região do peptídeo de sinal apresenta 63,15% de identidade, seguida da região do endodomínio com 38,63% e o domínio transmembrana com 33,33%, quando comparado à amostra vacinal Pitman-Moore.

As três amostras isoladas de morcegos insetívoros (222/90, 419/90 e 046/04) apresentaram o mesmo padrão de substituições de aminoácidos, à exceção de uma substituição de uma serina por uma fenilalanina na posição 391 da amostra 419/90. Algumas destas substituições estão presentes nas regiões II b (posição 37), II (posição 147), II a (posição 199), “a” (posição 264) e III (posição 330), que são sítios antigênicos e epítomos.

A substituição de uma citosina (amostras PM e CVS)/timina (amostra PV) por uma guanina na posição 392 da seqüência de nucleotídeos das amostras 704/97 e 158/98, determinou a substituição do aminoácido ácido aspártico pelo ácido glutâmico.

5 DISCUSSÃO

O período de incubação da raiva é longo e variável em humanos e animais, geralmente de 20 a 90 dias, podendo ser superior a um ano, em alguns casos (SMITH et al., 1991). Entretanto, uma característica biológica do vírus da raiva relaciona-se à diminuição e fixação deste período quando são realizadas passagens seriadas em laboratório (KING; TURNER, 1993). No presente estudo, nas passagens realizadas com as amostras isoladas de morcegos, pôde-se verificar a redução do período médio de incubação, após o qual se observou a ocorrência dos sinais clínicos característicos da infecção pelo genótipo 1 do vírus da raiva em camundogos (WINKLER, 1991).

Na fase inicial deste experimento, verificou-se que a dose do vírus-desafio do ensaio imunológico, calculada com base em apenas uma titulação das amostras de quinta passagem, freqüentemente não apresentou o resultado esperado e tampouco se manteve na faixa de validação do teste. Ainda que tenhamos utilizado a média de três titulações para o cálculo da dose do vírus-desafio e sua variância tenha sido inferior a 10%, enfrentamos as mesmas dificuldades nos ensaios posteriores.

Para o cálculo da potência relativa da vacina anti-rábica de uso humano produzida em células Vero, considerou-se que: quando a DE_{50} da vacina teste excede a última diluição, mas os critérios de validação da dose do vírus-desafio e da DE_{50} da vacina referência forem alcançados, o ensaio deve ser considerado válido e o título da vacina teste deve ser expresso como $>2,5$ UI/dose (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2004). Assim, a vacina utilizada neste experimento atingiu a potência mínima estabelecida para a liberação de um lote de vacina de uso humano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

Wilbur e Aubert (1999) recomendam o uso do teste estatístico de Probit para a determinação da DE_{50} . Entretanto, quando o número de animais sobreviventes em uma diluição é igual ou próximo ao número de animais sobreviventes na diluição anterior ou posterior, os dados não se ajustam ao modelo

matemático, que, então, não produz dados significativos ou gera dados aberrantes. Por este motivo, optamos por calcular a DP_{50} pelo método de Reed e Muench (1938), à semelhança de outros autores (ZANETTI et al., 1998).

Um dos critérios de validação do teste NIH é a proteção de mais de 70% dos camundongos vacinados com a diluição 1:5 (WILBUR; AUBERT, 1999) - valor este que não foi alcançado nos ensaios imunológicos realizados com as amostras 704/97, 151/98, 399/02 e 624/02, isoladas de morcegos hematófagos. Este resultado está em conformidade com o achado de Bernardi et al. (2005) para uma vacina anti-rábica de uso veterinário importada, que não apresentou resultado satisfatório no teste CDC, quando este foi realizado com uma amostra de morcego hematófago.

Zanetti et al. (1998) avaliaram a atividade protetora da vacina Fuenzalida-Palácios modificada, utilizando como vírus-desafio (30 a 50 $DL_{50}/0,03$ mL) as amostras padrão CVS e outra isolada de morcego hematófago, nos testes de Habel e NIH, e verificaram que 94,4% dos camundongos foram protegidos pela vacina diluída a 1:5, no desafio com a amostra CVS e apenas 36,2% dos camundongos foram protegidos quando o desafio foi realizado com a variante de morcego hematófago. Utilizando a vacina anti-rábica de uso humano produzida em células Vero, encontramos 100% de proteção dos camundongos para o teste NIH realizado com a amostra CVS e, dentre os desafios realizados com as amostras de morcego, o pior resultado encontrado foi 43,8% de proteção na diluição 1:5 da vacina, quando a amostra utilizada foi a 151/98.

Dietzschold e Hooper (1998) estudaram a imunidade conferida pela vacina anti-rábica produzida em célula diplóide humana, vacinando os camundongos nos dias 0 e 10 (100 μ L por via intra-peritoneal), com posterior desafio no dia 20, por via intracerebral, utilizando como vírus-desafio (100 DL_{50}) uma amostra de vírus da raiva isolada de morcego insetívoro (*Silver-haired bat*) e observaram que 100% dos camundongos foram protegidos com a diluição 1:5 da vacina e 30% com a diluição 1:125, tendo a vacina utilizada apresentado uma DE_{50} de 1:54,7. Em nosso trabalho, a dose de vacina aplicada nos camundogogs foi 5 vezes maior que a

utilizada por estes autores e a dose do vírus-desafio foi cerca de um quinto inferior para as amostras isoladas de morcegos insetívoros, as quais apresentaram um percentual de proteção de 93,8% (222/90), 93,8% (419/90) e 100% (046/04), donde se pode concluir que as diferenças de proteção observadas em nosso trabalho estão relacionadas com a amostra viral utilizada, em conformidade com a assertiva de Barth, Diderrich e Weineman (1988) e Zaneti et al. (1998). Em adição, para o ensaio imunológico realizado com as amostras 704/97 e 151/98, relacionadas quanto ao gene G e as únicas a apresentarem uma substituição de aminoácido em comum na posição 118 deste gene, verificou-se que, para o desafio com 31,62 DL₅₀ da amostra 704/97, a DP₅₀ foi inferior à obtida com 50,69 DL₅₀ da amostra 151/98.

Vários trabalhos que estudaram a proteção conferida pela vacina anti-rábica frente a amostras de campo do vírus da raiva, em camundongo, (ZANETTI et al., 1998; PIZA et al., 2002; BERNARDI et al., 2005; WUNDERLI et al., 2006), relatam apenas o intervalo da dose do vírus-desafio utilizada no ensaio, e não o seu valor exato, obtido na sua titulação-controle, realizada em concomitância ao desafio dos animais vacinados.

Uma das grandes dificuldades deste trabalho foi o estabelecimento da dose do vírus-desafio dentro dos limites estabelecidos pelo teste NIH, não só para as amostras isoladas de morcegos, como também para a amostra padrão CVS do vírus da raiva. Desta forma, para cada ensaio imunológico realizado à semelhança do teste NIH, cerca de uma a duas repetições se fizeram necessárias para a padronização da dose de desafio viral entre 12 e 50 DL₅₀ – uma dificuldade não relatada em outros trabalhos.

Wunderli et al. (2006) propuseram uma nova metodologia, chamada de RPC (*Rabies Peripheral Challenge*), para testar a potência da vacina anti-rábica. O método, baseado na vacinação de camundongos por via intramuscular, em uma única dose (0,1 mL), com desafio viral após 28 dias, utilizando a amostra do vírus da raiva padrão CVS, por via intramuscular (50-200 DL₅₀/0.03mL) apresentou valores de potência relativa quase três vezes maiores do que o teste NIH, para a vacina de uso humano, e valores similares para a vacina de uso veterinário,

sugerindo que o teste RPC apresenta-se como um modelo que oferece uma melhor sensibilidade analítica e está mais próximo de refletir a realidade da vacinação rotineiramente aplicada.

Dada a existência de amostras antigenicamente distintas do vírus da raiva, o teste de potência da vacina anti-rábica deveria ter, como vírus-desafio, uma amostra circulante em uma dada região geográfica, onde a vacina é utilizada. Assim, se uma vacina não oferecesse resultados satisfatórios, a amostra vacinal poderia ser substituída por outra capaz de oferecer proteção contra a amostra de campo local (WIKTOR; KOPROWSKI, 1980).

A árvore filogenética das amostras isoladas de morcego, quanto ao gene da proteína N, apresentou o padrão de agregação esperado, com a formação de dois grupos distintos denominados variante de morcego hematófago e variante de morcego insetívoro, em concordância com os resultados de Kobayashi et al. (2005) e Kobayashi et al. (2007c). O mesmo padrão de agregação das amostras foi observado na árvore filogenética contruída com base nas seqüências obtidas do gene da proteína G.

Em relação ao gene N, as amostras 704/97 e 151/98, isoladas na Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, formaram um agrupamento com amostras isoladas do Município de Quissamã, Norte do Estado, isoladas de morcegos *D. rotundus*, em 2006. Romijn et al. (2003) relatam diferenças no agrupamento de amostras das mesmas regiões, por estarem em bacias hidrográficas distintas, mas este padrão não foi observado em nosso estudo, nem por aquele realizado por Vieira (2007). O contraste entre os agrupamentos da árvore filogenética construída foi observado entre as amostras das Regiões Noroeste e Sul, visto que a amostra 624/02 está agrupada com amostras do Município de Lindóia, na Região Norte do Estado de São Paulo.

No presente estudo não foram encontradas diferenças temporais entre as amostras estudadas, visto que a amostra 046/04, de 2004, se relaciona com o agrupamento formado pelas amostras 222/90 e 419/90, de 1990, sustentada por um

valor de *bootstrap* de 100, quanto aos genes da proteína G e da proteína N, em conformidade com o achado de Heinemann (2000) que estudou o polimorfismo da proteína N. Em adição, a substituição do aminoácido lisina (posição 330), envolvido na patogenicidade, por um resíduo de asparagina, foi encontrado nas seqüências do gene da proteína G das três amostras.

Uma correlação entre os dados imunológicos, genéticos e geográficos foi notada entre as amostras 704/97 e 151/98, pois seus resultados no ensaio imunológico foram semelhantes e as mesmas estão intimamente relacionadas quanto às suas seqüências da proteína G e quanto à sua localização espacial, a noroeste do Estado do Rio de Janeiro e são, provavelmente, pertencentes ao mesmo surto. Estas amostras foram as únicas a apresentar a substituição de um ácido aspártico por um ácido glutâmico na posição 118 e as únicas em cujos ensaios imunológicos a vacina anti-rábica de uso humano apresentou o mais baixo desempenho, podendo-se inferir que esta substituição pode ter alterado a antigenicidade das amostras.

O gene que codifica a proteína G é composto das regiões: peptídeo de sinal, ectodomínio, região transmembrana e endodomínio. Na região do ectodomínio estão localizados os sítios antigênicos II e III e epítomos (aminoácidos 33-42, 147, 183, 198-202, 264, 330-338 e 357) e resíduos envolvidos na patogenicidade (aminoácidos 33, 132, 147, 198, 330 e 333) (BADRANE et al., 2001).

Entre as variantes de morcego hematófago e as variantes de morcegos insetívoros o alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene da proteína G apresentou 3 diferenças em sítios antigênicos e muitas diferenças nas regiões do peptídeo de sinal, transmembrana e endodomínio. Como Badrane et al. (2001), verificamos que a região mais conservada é do ectodomínio, com 89,75% de identidade entre os aminoácidos, quando a comparação é realizada com a amostra vacinal Pitman-Moore.

A proteína G não é somente o principal antígeno responsável pela indução da produção de anticorpos neutralizantes (WIKTOR et al., 1973), mas também é a

principal proteína envolvida na patogenicidade do vírus da raiva. A presença do resíduo arginina na posição 333 do gene da proteína G é descrita como sendo necessária para infecção viral (DIETZSCHOLD et al., 1983; SEIF et al., 1985), pois sua substituição pode afetar a disseminação do vírus célula-célula, tornando a amostra menos patogênica ou apatogênica (WUNNER, 2002).

Em nosso estudo, a única substituição encontrada em um resíduo envolvido na patogenicidade viral está relacionada às três variantes de morcegos insetívoros e foi mesma substituição da amostra mutante desenvolvida por Coulon et al. (1998) que, estudando um vírus mutante da amostra CVS (RK-4), com a substituição do resíduo lisina (posição 330) por uma asparagina, verificaram que a amostra mutante apresentou-se altamente patogênica para camundongos adultos. No ensaio biológico, verificou-se que a inoculação intracerebral dos camundongos com a amostra 222/90 determinava sintomatologia clínica com quadro exacerbado de excitação e canibalismo, diferente das outras amostras. Entretanto, em todos os ensaios imunológicos realizados com estas amostras (222/90, 419/90 e 046/04), o percentual de proteção dos camundongos vacinados com a vacina diluída a 1:5 foi superior a 90%, ressaltando a eficiência da neutralização viral conferida pelos anticorpos induzidos pela vacinação.

A divergência observada no dendograma da relação filogenética entre as amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos e padrão PV, CVS e PM não é uma surpresa, visto que a maioria dos vírus-fixo são originários da amostra isolada por Pasteur, após muitas passagens em cérebro de coelhos e adaptação a diferentes sistemas hospedeiros *in vivo* e *in vitro* (SACRAMENTO et al., 1992).

No Brasil, a raiva humana transmitida por morcegos hematófagos atingiu seu número máximo de casos nos anos de 2004 e 2005, na Região Amazônica (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2006). No Estado do Rio de Janeiro, há mais de 20 anos a raiva permanece esporádica no ambiente urbano, mas continuam ocorrendo casos de raiva transmitida por morcegos hematófagos a herbívoros, no ambiente rural, principalmente em bovinos e eqüinos.

Nos conglomerados urbanos uma atenção especial deve ser dada para a raiva em morcegos não-hematófagos, já detectada em várias espécies (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995; MARTORELLI et al., 1995; BERNARDI et al., 1998; UIEDA, 1998; SILVA et al., 2007).

Atualmente existe uma grande população de cães de rua e, embora o ciclo urbano da raiva com a variante canina seja considerado extinto na cidade do Rio de Janeiro, nada impede que um *spillover* ocorra e, um morcego infectado pelo vírus da raiva entre em contato com estes animais e disto resulte um aumento do risco de transmissão da raiva a humanos.

Neste contexto, encontramos que a vacina anti-rábica de uso humano utilizada na imunização pré e pós-exposição no Brasil protegeu mais de 80% dos camundongos na diluição 1:5 frente ao desafio com maioria das amostras isoladas de morcegos do Estado do Rio de Janeiro. Entretanto, dada a alteração genética e resultados inferiores do ensaio imunológico com as amostras 704/97 e 151/98, novos estudos moleculares acerca das amostras do vírus da raiva isoladas da Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, associados a ensaios imunobiológicos, devem ser realizados para que se possa conhecer a extensão da importância deste achado para humanos e animais vacinados frente ao risco de exposição às amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos.

6 CONCLUSÕES

- As amostras de vírus estudadas apresentaram comportamento biológico em camundongos compatíveis com aqueles descritos para o vírus clássico da raiva, genótipo 1.
- O desafio viral de camundongos previamente vacinados com a vacina anti-rábica de uso humano apresentou resultados satisfatórios, com mais de 80% dos camundongos protegidos, para a maioria das amostras estudadas.
- A análise genética do gene da proteína N permitiu segregar as amostras em variante de morcego hematófago e variante de morcego insetívoro, com diferenças filogenéticas entre as variantes de morcego hematófago isoladas na Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro e aquelas isoladas nas Regiões Metropolitana e Sul do Estado.
- A substituição do resíduo ácido aspartico por ácido glutâmico na posição 118, encontradas na caracterização genética da proteína G das amostras 704/97 e 151/98, permite inferir que esta posição esteja relacionada à antigenicidade viral.

REFERÊNCIAS³

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**, 3 ed. v. II. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003, v. II, p. 351-383.
- AGUILAR-SÉTIEN, A.; BROCHIER, B.; TORDO, N.; DE PAZ, O.; DESMETTRE, P.; PÉHARPRÉ, D.; PASTORET, P-P. Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). **Vaccine**, v. 16, n. 11/12, p. 1122-1126, 1998.
- ALMEIDA, M. F.; MARTORELLI, L. F. A.; AIRES, C. C.; SALLUM, P. C.; MASSAD, E. Indirect oral immunization of captive of vampires, *Desmodus rotundus*. **Virus Research**, v. 111, p. 77-82, 2005.
- ANILIONIS, A.; WUNNER, W. H.; CURTIS, P. J. Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. **Nature**, v. 294, p. 275-278, 1981.
- ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A. D. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 333-337, 2003.
- BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two *Lyssavirus* with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268-3276, 2001.
- BAER, G. M. Vampire bat and bovine paralytic rabies. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**, 2nd ed. Florida: CRC Press, 1991. p. 390-400.
- BAER, G. M.; LENTZ, T. L. Rabies pathogenesis to the central nervous system. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**, 2nd ed. Florida: CRC Press, 1991. p. 106-118.
- BARTH, R.; DIDERRICH, G.; WEINMANN, E. NIH test: a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. **Vaccine**, v. 6, p. 369-377, 1988.

³ De acordo com as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (2003) e sua errata. Disponível em: <<http://www.fmvz.usp.br/index.php/site/content/download/2888/15125/file/diretrizes.pdf>> Acesso em: 15 jan. 2008.

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.

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.

BENMANSOUR, A.; LEBOIS, H.; COULON, P.; TUFFEREAU, C.; GAUDIN, Y.; FLAMAND, A.; LAFAY, F. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 65, n. 8, p. 4198-4203, 1991.

BERNARDI, F.; GOMES, A. A. B.; ITO, F. H.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; CORTEZ, A.; SAKAMOTO, S. M.; MAIORKA, P. C. Biological and immunological studies of five Brazilian rabies virus isolates. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 4, p.307-312, 2005.

BERNARDI, F.; GOMES, A. A. B.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Raiva em morcego não hematófago. **Ars Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 186-192, 1998.

BOURHY, H.; KISSI, B.; LAFON, M.; SACRAMENTO, D.; TORDO, N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, 1992, 2479-2426.

BRANDÃO, P. E.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W.; CARNIELI JR., P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Short-interfering RNAs as antiviral against rabies. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 224-225, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Controle da raiva dos herbívoros. **Manual técnico 2005**, Brasília: MAPA/DSA/DAS, 2005, 104 p. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/38246EEC79C9D501E040A8C075021DB0>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Controle da raiva dos herbívoros. **Revisão sobre a raiva**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/2B2AA967F37A7C23E040A8C075027DFF>>. Acesso em: 15 jan. 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. **Norma técnica para tratamento anti-rábico humano**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Raiva Humana – Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva_2006.pdf>. Acesso em 15 jan. 2008b.

BRASIL.Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva no Brasil (2007)**. Disponível em: <www.ribeiraopreto.sp.gov.br/SSAUDE/Vigilancia/zoonoses/raiva/raivabrasil.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no município de Portel-Pará, Março/Abril de 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 4, n. 6, p.5, 2004. Disponível em: < portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_06_ano04.pdf >. Acesso em: 15 jan. 2008.

BRASS, D. A. **Rabies in bats**: natural history and public health implications. 1st ed. Connecticut: Livia Press, 1994. p. 131-147.

CARINI, A. Sur une grande epizootie de rage. **Annales de L’Institute Pasteur**, v. 25, p. 843-846, 1911.

CARNIELI, P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; MACHADO, L. M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R. C.; CARVALHO, V. A. C.; MONTEBELLO, L.; WADA, M. KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 120, Issues 1-2, p. 113-120, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Imported human rabies – France, 1992. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 41, n. 51, p. 953-955, 1992.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recovery of a patient from clinical rabies – Wisconsin, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, n. 50, p. 1171-1173, 2004.

COSTA, W. A.; ÁVILA, C. A.; VALENTINE, E. J. G.; REICHMANN, M. L. A. B.; PANACHÃO, M. R. I.; CUNHA, R. S.; GUIDOLIN, R.; OMOTO, T. M.; BOLZAN, V. L. Profilaxia da raiva humana. **Manual Técnico do Instituto Pasteur**. 2 ed. São Paulo: Instituto Pasteur, n. 4, p. 43, 2000. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/manual_04.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2008.

COULON, P.; TERNAUX, J-P.; FLAMAND, A.; TUFFEREAU, C. An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 273-278, 1998.

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**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-95.

DIETZSCHOLD, B.; HOOPER, C. Human diploid cell culture rabies vaccine (HDCV) and purified chicken embryo cell culture rabies vaccine (PCECV) both confer protective immunity against infection with the silver-haired bat rabies virus strain (SHBRV). **Vaccine**, v. 16, n. 17, p. 1656-1659, 1998.

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

ÉSBERARD, C. Morcegos Urbanos no Rio de Janeiro. In: KOTAIT et al., Manejo de quirópteros em áreas urbanas. **Manual técnico do Instituto Pasteur**, São Paulo: Instituto Pasteur, n. 7, p. 28-32, 2003. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/manual_07.pdf>. Acesso em 15 jan. 2008.

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

FISHBEIN, D. B. Rabies in humans. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**, 2nd ed. Florida: CRC Press, 1991. p. 520-549.

FOOKS, A. R. The challenge of new and emerging lyssaviruses. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 333-336, 2004.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M. M.; SILVA, E. V. Avaliação de três cepas de vírus rábico, antigenicamente distintas, em camundongos. II – Estudo da disseminação viral por diferentes órgãos. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 6, p. 473-478, 1988.

GONÇALVES, J. L. S.; VON HUBINGER, M. G.; WERMELINGER, M. C. M. W. Vírus da RAIVA. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.157-164.

HEINEMANN, M. B. **Análise do polimorfismo do gene N de amostras de vírus da raiva isoladas no Estado de São Paulo**. 2000. 56 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

HEMACHUDHA, T.; WACHARAPLUESADEE, S.; LUMLERTDAECHA, B.; ORCIARI, L. A.; RUPPRECHT, C. E.; LA-ONGPANT, M.; JUNTRAKUL, S.; DENDUANGBORIPANT, J. Sequence analysis of rabies virus in humans exhibiting encephalitic or paralytic rabies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 960-966, 2003.

HILLS, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41. p. 95-98, 1999.

INSTITUTO MUNICIPAL DE MEDICINA VETERINÁRIA JORGE VAITSMAN (Rio de Janeiro). **Dados dos livros de registro de amostras da seção de diagnóstico de raiva**. Rio de Janeiro, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Rio de Janeiro). **Ensaio de potência para a vacina contra a raiva (número 65.3430.018)**. Rio de Janeiro, 2004. 18 p.

INSTITUTO PASTEUR (São Paulo). **Raiva silvestre**. 2002. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_04.htm> Acesso em: 15 jan. 2008.

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

JOGAI, S.; RADOTRA, B. D.; BANERJEE, A. K. Rabies viral antigen in extracranial organs: a *post-mortem* study. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 28, p. 334-338, 2002.

KING, A. A.; TURNER, G. S. Rabies: a review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, n. 1, p. 1-39, 1993.

KOBAYASHI, Y.; INOUE, N.; SATO, G.; ITOU, T.; SANTOS, H. P.; BRITO, C. J. C.; GOMES, A. A. B.; SANTOS, M. F. C.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 7, p. 691-696, 2007b.

KOBAYASHI, Y.; OKUDA, H.; NAKAMURA, K.; SATO, G.; ITOU, T.; CARVALHO, A. A.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic analysis of phosphoprotein and matrix protein of rabies virus isolated in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 11, p. 1145-1154, 2007a.

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

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

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.), **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 80-87.

KOPROWSKI, H. The virus – Overview. In: BAER, G. M., (Ed.). **The natural history of rabies**, 2nd ed. Florida: CRC Press, 1991. p. 27-29.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; CARNIELI JR, P.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; FERREIRA, K. C. S.; ACHKAR, S. M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, [2007]. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40_raiva.htm> Acesso em 15 jan. 2008.

KOTAIT, I.; GONÇALVES, C. A.; PERES, N. F.; SOUZA, M. C. A. M.; TARGUETA, M. C. Controle da raiva dos herbívoros. **Manual Técnico do Instituto Pasteur**, São Paulo, n. 1, p.23, 1998. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/manual_01.pdf>. Acesso em 15 jan. 2008.

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA ANIMAL DA PESAGRO (Rio de Janeiro). **Dados dos livros de registro de amostras do Laboratório de Virologia**. Rio de Janeiro, 2007.

MACEDO, C. I.; CARNIELI JR, P.; BRANDÃO, P. E.; RODA, E. S. T.; 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.

MÁLAGA-ALBA, A. El vampiro portador de la rabia. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 37, n. 1, p. 53-65, 1954.

MARTORELLI, L. F. A.; AGUIAR, E. A. C.; ALMEIDA, M. F.; SILVA, M. M. S.; NOVAES, E. C. R. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Myotis nigricans*. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 140-141, 1995.

McDERMID, R. C.; SAXINGER, L.; LEE, B. JOHNSTONE, J.; GIBNEY, R. T. N.; JOHNSON, M.; BAGSHAW, S. M. Human rabies encephalitis following bat exposure: failure of therapeutic coma. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 5, p. 557-561, 2008.

MÉNDEZ, E. Murciélagos hematófagos y su importancia médica en Panamá. **Centro Panamericano de Zoonosis**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1972. 39 p.

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

NEL, L. H. Lyssavirus genotypes that occurred in Africa. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003. CENTENÁRIO DO INSTITUTO PASTEUR, 2003, São Paulo. **Resumos**...São Paulo: Secretário de Estado da Saúde, 2003. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2003.pdf> Acesso em: 15 jan. 2008.

NOGUEIRA, V. Programa estadual de controle da raiva dos herbívoros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003. CENTENÁRIO DO INSTITUTO PASTEUR, 2003, São Paulo. **Resumos**...São Paulo: Secretário de Estado da Saúde, 2003. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2003.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2008.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE. **Manual of diagnostic tests and vaccine for terrestrial animals: Rabies**. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00044.htm> Acesso em: 15 jan. 2008.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Rabia transmitida por murciélagos hematófagos en la región amazónica**, Brasília: OPAS, 2006, 55p.

PIZA, A. T.; PIERI, K. M.; LUSA, G. M.; CAPORALE, G. M. M.; TERRERAN, M. T.; MACHADO, L. A.; ZANETTI, C. R. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein on the potency rabies vaccination in cattle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 265-268, 2002.

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

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

RODRIGUES DA SILVA, A. C.; CAPORALE, G. M. M.; GONÇALVES, C. A.; TARGUETA, M. C.; COMIN, F.; ZANETTI, C. R.; KOTAIT, I. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 95-98, 2000.

ROMIJN, P.; VAN DER HEIDE, R.; CATTANEO, C. A. M.; SILVA, R. C. F.; V DER POEL, W. H. M. Study of Lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 1, p. 81-86, 2003.

ROSA, E. S. T.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J. S.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUSA, R. C.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. Bat-transmitted human rabies outbreak, Brazilian Amazon, **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1197-1202, 2006.

RUPPRECHT, C. E.; DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W. H.; KOPROWSKI, H. Antigenic relationships of Lyssaviruses. In: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**, 2 ed. Florida: CRC Press, 1991, p. 69-96.

SACRAMENTO, D.; BADRANE, H.; BOURHY, H.; TORDO, N. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1149-1158, 1992.

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

SATO, G.; TANABE, H.; SHOJI, Y.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SATO, T.; SAKAI, T. Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, p. 267-273, 2005.

SCHAEFER, R.; BATISTA, H. B. R.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A. M.; ROEHE, P. M. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology**, n. 107, p. 161-170, 2005.

SCHEFFER, K. C.; CARRIERI, M. L.; ALBAS, A.; SANTOS, H. C. P.; KOTAIT, I.; ITO, F. H. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 389-395, 2007.

SCHNEIDER, M. C.; BELOTTO, A.; ADÉ, M. P.; LEANES, L. F.; CORREA, E.; TAMAYO, H.; MEDINA, G.; RODRIGUES, M. J. Situación epidemiológica de la rabia humana en América Latina en 2004. **Boletín Epidemiológico.Organización Panamericana de la Salud**, v. 26, n. 1, p. 2-4, 2005.

SEIF, I.; COULON, P.; ROLLIN, P. E.; FLAMAND, A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53, p. 926-934, 1985.

SILVA, M. V.; XAVIER, S. M.; MOREIRA, W. C.; SANTOS, B. C. P.; ESBÉRARD, C. E. L. Vírus rábico em morcego *Nyctinomops laticaudatus* na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: isolamento, titulação e epidemiologia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 479-481, 2007.

SILVA, R. A.; SOUZA, A. M. Sur l'isolement au Brésil du virus rabique à partir du poumon, du cœur et de différents autres tissus de vampires hématophages appartenant à l'espèce *Desmodus rotundus*. **Bulletin de l'Office International des Epizooties**, v. 66, p. 741-745, 1966.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; GOMES, A. A.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraíba, Brazil. **Acta Virologica**, v. 50, n. 1, p. 33-37, 2006.

SMITH, J. S.; FISHBEIN, D. B.; RUPPRECHT, C. E.; CLARK, .K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 4, p. 205-211, 1991.

SOUSA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCOPELOS, F. C. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1197-1202, 2006.

SRINIVASAN, A.; BURTON, E. C.; KUEHNERT, M. J.; RUPPRECHT, C.; SUTKER, W. L.; KSIAZEK, T. G.; PADDOCK, C. D.; GUARNER, J.; SHIEH, W-J.; 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. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, 1103-1111, 2005.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, K. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 181-192.

TORDO, N.; SACRAMENTO, D.; BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; AGUILAR-SETIEN, A.; LOZA-RUBIO, E.; GAVILAN-SALINAS, A.; BROCHIER, B.; PASTORET, P. P.; DESMEZIERES, E.; JACOBIS, Y.; PERRIN, P. Genetic diversity of Lyssaviruses: implications in vaccinology. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA DO INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO, 2000. **Resumos....** Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/anais/seminario_internacional/resumo_3_1.htm> Acesso em: 15 jan. 2008.

UIEDA, W. Rabies in the insectivorous bat *Tadarida brasiliensis* in Southeastern Brazil, **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 484-485, 1998.

UIEDA, W.; HAMANI, N. M. S.; SILVA, M. M. S. Raiva em morcegos insetívoros (*Molossidae*) do Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 5, p. 393-397, 1995.

VIEIRA, L. F. P. **Caracterização molecular de vírus da raiva (Lyssavirus-Rhabdoviridade) isolados de espécimes clínicos de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* no Norte e Noroeste Fluminense**. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2007.

WIKTOR, T. J.; GYÖRGY, E.; SCHLUMBERGER, D.; SOKOL, F.; KOPROWSKI, H. Antigenic properties of rabies virus components. **The Journal of Immunology**, v. 110, n. 1, p. 269-276, 1973.

WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Antigenic variants of rabies virus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 99-112, 1980.

WILBUR, L. A.; AUBERT, M. F. A. Épreuve d'activité NIH. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratoire techniques en la rage**. 5th ed. Genève: Organisation Mondiale de la Santé, 1999. p. 366-374.

WILLOUGHBY, R. E.; TIEVES, K. S.; HOFFMAN, G. M.; GHANAYEM, N. S.; AMLIE-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, 2508-2514, 2005.

WINKLER, W. G. Rodent Rabies. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**, 2nd ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 405-414.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 49-63, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies vaccines. **Weekly Epidemiological Record**, v. 14, n. 77, p. 109-120, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Requirements for rabies vaccine for human use. Geneva: WHO Press, 1994. 4 p. (**WHO Technical Report Series, n. 840**), Disponível em: <www.who.int/entity/rabies/vaccines/en/Annex_4.pdf> Acesso em: 15. jan. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Strategies for the control and elimination of rabies in Asia**. Geneva: Report of a WHO Interregional Consultation, 2001. 38 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO expert consultation on rabies. Geneva: WHO Press, 2005. 121p. (**Technical Report Series, n. 931**).

WUNDERLI, P. S.; DREESEN, D. W.; MILLER, T. J.; BAER, G. M. The rabies peripheral challenge test: more accurate determination of vaccine potency. **Vaccine**, v. 24, p. 7115-7123, 2006.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, San Diego: Academic Press, 2002. p. 23-77.

ZANETTI, C. R. Imunidade anti-rábica. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003. CENTENÁRIO DO INSTITUTO PASTEUR, 2003, São Paulo. **Resumos**...São Paulo: Secretário de Estado da Saúde, 2003. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2003.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2008.

ZANETTI, C. R.; FRANCO, M. T.; VASSÃO, R. C.; PEREIRA, C. A.; PEREIRA, O. A. C. Failure of protection induced by a brazilian vaccine against brazilian wild rabies viruses. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1745-1756, 1998.