ELENICE MARIA SEQUETIN CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA
RAIVA ISOLADAS DE MORCEGOS. AVALIAÇÃO DA
PATOGENICIDADE E PROTEÇÃO CRUZADA EM
CAMUNDONGOS**

SÃO PAULO

2006

ELENICE MARIA SEQUETIN CUNHA

**Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos.
Avaliação da patogenicidade e proteção cruzada em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

SÃO PAULO

2006

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

Elenice
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
30/3/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1670
FMVZ

Cunha, Elenice Maria Sequetin

Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos. Avaliação da patogenicidade e proteção cruzada em camundongos / Elenice Maria Sequetin Cunha. -- São Paulo : E. M. S. Cunha, 2006.

75 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

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. Morcegos. 2. Vírus da raiva. 3. Caracterização genética. 4. Patogenicidade. 5. Vacinas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Propriedades patogênicas e imunogênicas de amostras do vírus da raiva isoladas de diferentes espécies animais do sudeste do Brasil." Protocolo nº 263/2003, utilizando 2200 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 em reunião de 27/02/2003.

(We certify that the Research "Pathogenic and immunogenic properties of rabies virus isolates from diferents species of Southeastern Brazil" protocol number 263/2003, utilizing 2200 mouses, under the responsability of Prof. Dr. Fumio Honma Ito, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 02/27/2003 meeting.)

São Paulo, 07 de março de 2003

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CUNHA, Elenice Maria Sequetin

Título: Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos. Avaliação da patogenicidade e proteção cruzada em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para 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: _____

A coisa mais bonita que podemos experimentar é o mistério. Ele é a fonte de toda a arte e ciência verdadeiras. Aquela para quem essa emoção é estranha, incapaz de soltar a imaginação e quedar-se extasiado, é como se fosse um morto: seus olhos estão fechados. (...) Saber que aquilo que nos é impenetrável realmente existe, manifestando-se como a maior sabedoria e a beleza mais radiante que nossa pobre capacidade só pode aprender em suas formas mais primitivas - esse conhecimento, essa sensação, está no centro da verdadeira religiosidade. Nesse sentido, e apenas nesse, pertencemos às fileiras dos devotos.

Albert Einstein
What I Believe (1930)

A Angelina e José, meus pais, pela vida e pelos ensinamentos.

Ao Newtom, Bruno e Mariana,

dedico este trabalho com gratidão, admiração e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fumio Honma Ito pela orientação, amizade e confiança.

Ao Laboratório Biovet S.A. pela doação da vacina utilizada neste trabalho.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário de São Paulo - Campinas (LANAGRO-SP) pela doação dos camundongos utilizados para a realização deste trabalho.

A Graciana responsável pelo biotério do LANAGRO pela atenção e paciência.

Aos colegas do Laboratório de Raiva e Encefalites Virais, Maria do Carmo C. Souza H. Lara, Alessandra Figueiredo Nassar, Eliana Cassaro Villalobos, Márcia Regina Rosa, Raquel Carvalho Rosa e Rui Barbosa Meyer, pela colaboração e amizade.

As estagiárias, Stefani Fujita, Silvia Consiglio e Karen Asano, pela colaboração nos experimentos de proteção cruzada.

Ao Prof. Dr. Takeo Sakai, Takuya Itou e pós-graduandos Youko Shoji, Yuki Kobayashi e Go Satou, do College of Bioresource Sciences da Nihon University, de Fujisawa, Kanagawa, Japão, pelos estudos genéticos de amostras do vírus da raiva utilizadas neste estudo.

A Elza da biblioteca pela gentil colaboração.

A todos os amigos pelo constante encorajamento.

RESUMO

CUNHA, E. M. S. Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos. Avaliação da patogenicidade e proteção cruzada em camundongos. [Genetic characterization of rabies viruses isolated from bats. Evaluation of the pathogenicity and cross protection in mice]. 2006, 75 f. Tese(Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Vírus da raiva provenientes de 23 morcegos de espécies hematófagas, frugívoras e insetívoras foram caracterizados geneticamente pelo seqüenciamento completo da região que codifica a nucleoproteína N. A análise filogenética das seqüências, incluindo lyssavirus e isolados de morcegos do Chile e Estados Unidos, mostrou que os diferentes isolados do vírus da raiva foram de modo geral segregados em quatro grupos genéticos distintos: morcegos hematófagos, morcegos insetívoros 1, 2 e 3. Os morcegos insetívoros 1 constituíram-se por isolados de *Eptesicus furinalis*: BR-EF1, BR-EF2, BREF3, BR-EF-4, BR-EA1 e BR-NL2; os morcegos insetívoros 2 consistiram de isolados de *Molossus* spp: BR-MM1, BR-MM2 e BR-MA1 e os morcegos insetívoros 3 isolados de *Nictinomops laticaudatus*: BR-NL1 e BR-NL3. A homologia de nucleotídeos entre cada grupo de morcegos insetívoros 1, 2 e 3 foi maior que 99%, 97% e 99%, respectivamente. O grupo de morcegos hematófagos foi representado pelos isolados de: 3 morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (BR-DR1, BR-DR2 e BR-DR3); 5 morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* BR-AL1, BR-AL2, BR-AL3, BR-AL4 e *Artibeus planirostris* BRAP1; 2 morcegos insetívoros (BR-MR1 e BR-EA2) e 2 de espécies não identificadas (BR-BAT1 e BR-BAT2). Entre as amostras seqüenciadas foram selecionadas cinco (BR-EF1, BR-NL1, BR-AL3, BR-MM1, BR-DR1) e um isolado de cão (BR-C) para os estudos de patogenicidade em camundongos albinos suíços inoculados pela vias intracerebral (IC) e intramuscular (IM). Todas as amostras quando inoculadas em camundongos pela via IC apresentaram-se patogênicas, provocando a morte dos mesmos num período de 4 a 14 dias pós-inoculação. No entanto, 500DLIC₅₀ das mesmas amostras inoculadas pela via IM levaram

a uma mortalidade de camundongos de: 60% (BR-DR1); 50% (BR-C, BR-NL); 40% (BR-AL3); 9,5% (BR-MM1); 5,2% (BR-EF10). As mesmas amostras foram utilizadas para a verificação de proteção cruzada, conferida por vacina comercial de uso animal, de camundongos que receberam uma ou duas doses de vacina pela via subcutânea (SC) e desafiados pelas vias IC e IM. Camundongos inoculados com duas doses de vacina foram protegidos quando desafiados pela via IC, com todas as amostras testadas. Quando os camundongos receberam uma dose da mesma vacina houve proteção parcial daqueles desafiados com as amostras de vírus PV e BR-C. Houve proteção de 100% dos camundongos desafiados pela via IM, com exceção daqueles vacinados com uma dose de vacina e desafiados com a amostra PV que apresentaram um índice de 66% de sobreviventes. Os resultados indicam a possibilidade de existir variantes do vírus da raiva espécies específicas circulando em morcegos. Sugerem ainda, que espécies de morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros compartilham o mesmo polimorfismo de vírus. A vacina comercial contra a raiva contendo vírus inativado e de uso veterinário protegeu os camundongos contra o desafio com as diferentes amostras testadas, sugerindo que as vacinas usualmente utilizadas são efetivas no tratamento profilático da raiva transmitida por morcegos, apesar da marcada diferença de neurovirulência dos diferentes isolados quando inoculados em camundongos pela via IM.

Palavras-chave: Morcegos. Vírus da Raiva. Caracterização genética. Patogenicidade. Vacina. Desafio. Proteção cruzada

ABSTRACT

CUNHA, E. M. S. **Genetic characterization of rabies viruses isolated from bats. Evaluation of the pathogenicity and cross protection in mice** [Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos. Avaliação da patogenicidade e proteção cruzada em camundongos]. 2006. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Twenty-three rabies viruses isolated from hematophagous, frugivorous and insectivorous bats were characterized genetically by complete sequencing of the region coding the nucleoprotein N. The phylogenetic analysis of the sequences, including the lyssavirus and the bat isolates from Chile and USA revealed that the isolates were segregated into four distinct genetic lineages: those related to the vampire bats and to the insectivorous bats 1, 2 and 3. The isolates related to the insectivorous bats 1 were from the *Eptesicus furinalis*: BR-EF1, BR-EF2, BREF3, BR-EF-4, BR-EA1 e BR-NL2; those of the insectivorous bats2 included the isolates from *Molossus* spp: BR-MM1, BR-MM2 and BR-MA1 and the group 3, by the isolates from the *Nictinomops laticaudatus*: BR-NL1 and BR-NL3. The homology among each group of the insectivorous bats 1, 2 and 3 were greater than 99%, 97% and 99%, respectively. The lineage related to vampire bats was represented by three isolates from the *D. rotundus* (BR-DR1, BR-DR2 e BR-DR3); five from the fruit bats *Artibeus lituratus* (BR-AL1, BR-AL2, BR-AL3, BR-AL4) and *Artibeus planirostris* (BRAP1); two from insectivorous bats (BR-MR1 and BR-EA2) and two from unidentified species (BR-BAT1 and BR-BAT2). Among the sequenced samples, five bat isolates (BR-EF1, BR-NL1, BR-AL3, BR-MM1, BR-DR1) and one dog isolate (BR-C) were selected for the study of their pathogenicity in Swiss mice, inoculating through intracerebral (IC) and intramuscular (IM) routes. All the isolates, when inoculated via IC, were pathogenic, provoking death in 4 – 14 post inoculation days. However, mice inoculated with 500ICLD₅₀ of the same isolates through IM route were found with different death rates: 60.0% (BR-DR1); 50.0% (BR-C, BR-NL); 40.0% (BR-AL3); 9.5%

(BR-MM1) and 5.2% (BR-EF10). The same isolates were used for the assessment of cross protection conferred by a commercial vaccine of veterinary use. The mice were vaccinated subcutaneously, receiving either one or two shots of vaccine, and challenged through IC and IM routes. Mice receiving two shots were protected against all the isolates, when challenged intracerebrally. Mice receiving one shot were found only partially protected against the challenge with the fixed PV strain and BR-C isolate. Mice challenged intramuscularly showed 100.0% of protection, with the exception of those vaccinated with one dose and challenged with PV strain, which were found with 66.0% of survivors. These results indicate the possibility of the existence of rabies virus variants circulating in different species of bat population. The data also suggest that the vampires, frugivorous and insectivorous bats share the same lineage of rabies viruses. The commercial vaccine has protected the mice against the challenge with different rabies virus isolates, suggesting that the vaccines usually employed in the field are effective, although some marked difference in neurovirulence by IM inoculation was found among the isolates tested.

Key words: Bats. Rabies virus. Genetic characterization. Pathogenicity. Vaccine. Challenge. Cross-protection.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Isolados do vírus da raiva, utilizados para a análise de filogenia, conforme a espécie, Estado, País, ano de isolamento e número de acesso no GenBank.....	43
Quadro 2	Amostras de vírus da raiva, selecionadas por localidade, espécie e número de passagens em camundongos, Instituto Biológico de São Paulo, período de 1998 a 2000.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Árvore filogenética baseada nas seqüências de 1.322 nucleotídeos nas posições 89-1.410 do gene N. A análise filogenética foi baseada nos métodos de “neighbor-joining”. O vírus Mokola foi utilizado como *out group*. CHTB e USATB são os isolados de *Tadarida brasiliensis* do Chile e dos Estados Unidos da América, respectivamente. Dados da seqüência obtidos do GenBank: ABL (AF418014), EBL 1 (AY863408), EBL 2 (AY863375), Mokola (Y09762), CHTB (AF070450) e USATB (AF394876). Os números indicam os valores do bootstrap para 1000 replicações..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de amostras do vírus da raiva segundo o resultado obtido na prova de imunofluorescência direta, inoculação intracerebral em camundongos, título do vírus em DLIC50/0,03 ml e porcentagem de mortalidade após inoculação intramuscular, Instituto Biológico de São Paulo, período de 1998 a 2000.....	50
Tabela 2	Índices de proteção de vacina de vírus inativado, para uso animal contra desafio IC em camundongos, com amostras de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies animais, Instituto Biológico de São Paulo.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1.	CAMUNDONGOS.....	33
3.2	VÍRUS.....	33
3.2.1	AMOSTRA PADRÃO.....	33
3.2.2	AMOSTRAS DE CAMPO.....	34
3.3	EXTRAÇÃO DO RNA DAS AMOSTRAS.....	34
3.4	TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR).....	35
3.5	SEQUENCIAMENTO DIRETO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	36
3.6	VACINA.....	37
3.7	CONJUGADO ANTI-RÁBICO.....	38
3.8	DILUENTE.....	38
3.9	IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA (IFD).....	39
3.10	TÉCNICA DE INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS.....	39
3.11	ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA.....	39
3.12	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE MORCEGOS.....	40
3.13	ADAPTAÇÃO DE AMOSTRAS DE CAMPO EM CAMUNDONGOS.....	40
3.14	TITULAÇÃO DOS VÍRUS DE CAMPO E VÍRUS PV EM CAMUNDONGOS.....	40
3.15	VERIFICAÇÃO DA PATOGENICIDADE.....	41
3.16	EXPERIMENTO DE PROTEÇÃO CRUZADA.....	41
4	RESULTADOS.....	45

4.1	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	46
4.2	PATOGENICIDADE.....	48
4.3	PROTEÇÃO CRUZADA.....	48
5	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÕES.....	62
7	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A etiologia única do vírus da raiva foi aceita até 1956, quando o primeiro vírus “relacionado ou aparentado” ao vírus rábico foi isolado do morcego frugívoro *Eidolon helvum* na Nigéria (SHOPE et al., 1970). O vírus da raiva e os vírus “aparentados” estão classificados na ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Os lyssavirus, como outros rhabdovírus, consistem essencialmente de RNA (2-3%), proteína (65-75%), lipídio (15-25%) e carboidrato (3%). São vírus envelopados em forma de projétil de revólver com diâmetro de 45 a 100nm e 100 a 430 nm de comprimento. Apresentam projeções no envelope, em forma de espículas, que estão distribuídas por toda a superfície viral (com exceção da parte plana do vírus). O nucleocapsídeo é filamentososo e com simetria helicoidal medindo 700nm de comprimento e 20 nm de diâmetro. O virion contém 1-2% de ácido nucléico. O RNA é de fita simples, linear, não segmentado e de senso negativo. (FAUQUET et al., 2004).

As proteínas estruturais do virion incluem a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P, M1 ou NS), a matriz protéica (M ou M2), a glicoproteína (G) e a polimerase RNA dependente ou proteína L. Das cinco proteínas identificadas, duas são de especial interesse para a proteção contra os lyssavirus: a nucleoproteína (N) do RNA, que é um antígeno grupo específico, e a glicoproteína (G) das projeções encontradas na superfície do virion. A proteína N contém 450 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 57.000 Daltons. É a proteína mais conservada em similaridade de seqüência de aminoácidos entre os genótipos, apesar de apresentar uma diversidade em uma pequena região do gene N dos diferentes genótipos (CONSELMANN et al., 1990; BOURHY; KISSI; TORDO, 1993). A maior proporção (98-99%) de similaridade da seqüência de aminoácidos da N está entre as diversas amostras de vírus fixos (genótipo 1) (CONSELMANN et al., 1990). Os conhecimentos atuais sugerem que, os isolados do vírus da raiva e aqueles denominados de aparentados têm em comum menos de 80% de similaridade de nucleotídeos no gene N (BOURHY; KISSI; TORDO, 1993). A nucleoproteína tem sido extensivamente analisada no que diz respeito à sua estrutura

antigênica e imunogênica e função. Dois distintos aspectos estão associados à imunogenicidade: primeiro, a proteína N protege contra o desafio periférico contra o vírus na ausência de anticorpos neutralizantes detectáveis (LODMELL et al., 1991); segundo é capaz de preparar o sistema imune e aumentar a produção de anticorpos neutralizantes após inoculação de animais com vacinas de vírus inativado (DIETZSCHOLD et al., 1987). A glicoproteína G é a única proteína da superfície viral, na qual forma espículas ancoradas no envelope viral. A porção 1-439 da proteína G é responsável pela interação do vírus com os receptores da célula, mediando sua entrada na célula hospedeira (GAUDIN et al., 1991). Está envolvida na patogenicidade e é essencial na resposta imune do hospedeiro contra a infecção, sendo responsável pela indução de anticorpos neutralizantes e alvo para células *T helper* e células citotóxicas específicas (WIKTOR et al., 1973).

Com base em características sorológicas e antigênicas os vírus da raiva foram classificados originalmente, em 4 sorotipos: sorotipo 1 ou vírus clássicos da raiva, que compreende amostras selvagens e vacinais; sorotipos 2, 3 e 4 (aparentados), cujos protótipos são o *Lagos bat*, *Mokola* e *Duvenhage*, respectivamente. Estudos genéticos confirmaram os genótipos 1, 2, 3 e 4 e estenderam esta classificação, incluindo os “European bat lyssaviruses” (EBLs) 1 e 2 como genótipos 5 e 6, respectivamente (TORDO, 1996). Ainda foi proposto um sétimo genótipo, “Australian bat lyssavirus” (ABLs), relacionado com o genótipo 1, isolado de morcego da Austrália e responsável por casos de raiva em humanos (FRASER et al., 1996). Outros lyssavírus relacionados ao vírus da raiva foram descritos em 2003, com sugestão para constituírem novos genótipos: o vírus Aravan como provável genótipo 8, isolado do morcego insetívoro *Myotis blythi*, em 1991, no Quirguistão, Ásia Central (ARAI et al., 2003); o vírus “Khujand”, provável genótipo 9, isolado em 2001, do morcego insetívoro *Myotis mystacinus*, no Norte de Tadjiquistão (KUZMIN et al., 2003); o vírus Irkut, provável genótipo 10, isolado do morcego *Murina leucogaster*, na Sibéria Oriental, em 2002. No mesmo ano, nas

montanhas do Cáucaso, foi isolado do morcego *Miniopterus schreibersi*, o "West Caucasian Bat lyssavirus" (BOTVINKIN et al., 2003).

O vírus da raiva é neurotrópico e causa uma infecção aguda no sistema nervoso central (SNC). Modelos experimentais utilizando camundongos, mimetizando o que ocorre na infecção natural, mostram que após a mordida há uma replicação do vírus no músculo localizado na porta de entrada (MURPHY et al., 1973a). Este se liga a receptores nicotínicos da acetilcolina na junção neuromuscular (REAGAN; WUNNER, 1985), segue pelos axônios dos nervos periféricos e neurônios motores da medula espinal, ascendendo até o cérebro (TSIANG et al., 1991). Ocorre então a disseminação centrífuga através de nervos até a glândula salivar, pele, córnea e outros órgãos (MURPHY et al., 1973b).

A neurovirulência do vírus da raiva está intimamente relacionada à capacidade do vírus em se difundir do sítio periférico para o SNC. O neurotropismo pode ser explicado em parte, pela capacidade dos receptores do vírus em reagir com componentes da membrana celular, entre os quais a molécula de adesão da célula neural (THOULOZE et al., 1998) e, como já mencionado, o receptor nicotínico da acetilcolina (LENTZ et al., 1982). A ligação do vírus a estes receptores é mediada pela proteína G presente na superfície da partícula viral. Mutações nesta proteína têm um papel essencial na patogenicidade do vírus. Em amostras selvagens do vírus da raiva o aminoácido arginina ou lisina na posição 333 da glicoproteína é responsável pela virulência. Variantes do vírus com uma simples mudança destes aminoácidos por uma glutamina, isoleucina, glicina, metionina ou serina têm pouca ou nenhuma virulência quando inoculados por via intracerebral em camundongos adultos (DIETZSCHOLD et al., 1983).

Diferenças na patogenicidade entre os isolados do vírus da raiva têm sido constatadas. Analisando os diferentes genótipos dos lyssavirus, Perrin et al. (1996) observaram que os genótipos 1 e 5 são patogênicos para camundongos por vias periféricas, enquanto o genótipo 3

não. Ainda, as amostras PV (Pasteur Vírus) e ERA (Evelyn, Rokitniki e Abelseth) apesar de conservarem seu neurotropismo, quando inoculadas no músculo da perna de camundongos não são fatais e induzem uma paralisia flácida irreversível nos membros posteriores (SMITH, 1981).

A noção de variantes do vírus da raiva e suas diferenças, tanto no que diz respeito às manifestações clínicas, origem geográfica e hospedeiro foi consolidada com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais - mAbs (WIKTOR; KOPROWSKY, 1978) descrevendo a nucleoproteína (FLAMAND; WIKTOR; KOPROWSKY, 1980a) e a glicoproteína (FLAMAND; WIKTOR; KOPROWSKY et al., 1980b). Esta técnica tem sido utilizada para diferenciar amostras vacinais e selvagens (SCHENEIDER; MEYER, 1981) assim como para identificar a origem geográfica dos isolados do vírus (DIETZSCHOLD et al., 1988; RUPPRECHT et al., 1987; SMITH et al., 1984; SMITH et al., 1986; SUREAU; ROLLIN; WIKTOR, 1983). Diversas baterias de mAbs permitem uma tipificação rápida de isolados de lyssavirus.

No Brasil, Hayashi et al. (1984) com o emprego de mAbs sugeriram a existência de três grupos de vírus: o vírus clássico da raiva, uma variante antigênica no sistema humano-cão e outra isolada de bovinos. Em estudos preliminares, Germano et al. (1990) observaram a existência de diferentes amostras do vírus da raiva, cuja distribuição não parece guardar relação nem com a procedência geográfica, nem com as espécies animais a partir das quais foram isoladas. Estudo antigênico recente, com amostras do vírus da raiva isoladas de várias espécies animais do Brasil, demonstrou a existência de diversas variantes, sendo que a maior variabilidade foi observada entre as amostras isoladas de morcegos insetívoros (FAVORETTO et al., 2002). A triagem de amostras de vírus da raiva isoladas de diferentes espécies animais do Brasil com uma coleção de 473 mAbs foi capaz de selecionar um painel

constituído por 10 mAbs, com resultados indicando os mesmos clados identificados na análise filogenética com base no seqüenciamento do gene P (BERNARDI et al., 2005).

A tipificação genética, especialmente a análise da seqüência de nucleotídeos, permite uma definição mais precisa do tipo de vírus e também é de grande utilidade em investigações epidemiológicas. Este tipo de análise resulta em uma árvore filogenética, diagrama hierárquico ramificado, que retrata a relação entre amostras, baseada em modelos de substituição de nucleotídeos. Os ramos da árvore representam linhagens de vírus e agrupamentos de linhagens ou grupos monofilicos (clados) (NADIN-DAVIS et al., 2002).

Diferenças genéticas e imunológicas entre os vírus da raiva e os vírus aparentados levaram Badrane et al., 2001 a proporem dois filogrupos. O filogrupo I representado pelo genótipo 1 (vírus clássicos da raiva), os lyssavirus dos morcegos europeus (EBL1, EBL2) compreendidos pelos genótipos 5 e 6, o genótipo 4 (Duvenhage) e o genótipo 7 (ABL). O filogrupo II que compreende o genótipo 2 (Lagos bat) e o genótipo 3 (Mokola). Os vírus do filogrupo I são patogênicos para camundongos inoculados pelas vias intracerebral (IC) e intramuscular (IM), enquanto os do filogrupo II são patogênicos somente quando inoculados pela via IC. Os autores mostraram ainda, que o resíduo 333 da glicoproteína, essencial para a virulência da amostra, é substituído naturalmente nas amostras do filogrupo II, resultando provavelmente em sua atenuada patogenicidade.

Através de seqüenciamento de genes amplificados pela PCR foi observada uma marcante divergência (14,7%) entre amostras de vírus selvagens e vacinais (SACRAMENTO, et al., 1992). Vários estudos, usando análise de seqüências, têm demonstrado a existência de numerosas variantes do vírus da raiva associadas a diferentes espécies animais e áreas geográficas (DE MATTOS et al., 1996; ITO et al., 2001; SMITH et al., 1992). Foi observado também um alto nível de variação dos vírus da raiva isolados de morcegos, quando comparados com àqueles de mamíferos terrestres (NADIN - DAVIS et al., 2001).

A caracterização genética de isolados do vírus da raiva no Brasil identificou dois grupos de reservatórios, cão e morcego vampiro (ITO et al., 2001). Sacramento et al. (1994) analisando amostras provenientes de várias espécies animais e amostras utilizadas na produção de vacinas, concluíram que aquelas provenientes de herbívoros do Estado de São Paulo pertencem a um grupo que apresenta, comparativamente, a maior variabilidade de genes.

Tendo em vista a diversidade entre amostras do vírus da raiva, a dúvida em termos de profilaxia é se as vacinas atuais, produzidas com o vírus isolado por Pasteur há mais de cem anos, seriam capazes de proteger contra a infecção com diferentes variantes. Uma pobre reação cruzada ocorre entre soro específico para o vírus Mokola e o vírus clássico da raiva. Esta observação foi confirmada pelas falhas de vacinas com vírus clássico da raiva na proteção de camundongos desafiados com o vírus Mokola (BADRANE et al., 2001; FEKADU et al., 1988; NEL et al., 2003). Vários trabalhos, também utilizando camundongos como modelo, sugeriram falhas vacinais, ou proteção parcial contra isolados do vírus da raiva de diferentes áreas geográficas (CUNHA et al., 2000; GERMANO et al., 1990; HAYASHI et al., 1984; SUREAU; ROLLIN; WIKTOR, 1983; ZANETTI et al., 1998). Por outro lado, outros autores defendem o contrário, sugerindo que a vacina utilizada atualmente é eficaz na proteção contra as diferentes variantes (FEKADU et al., 1988; LODMELL et al., 1995).

A raiva clássica causada pelos vírus do genótipo 1 está distribuída em todos os continentes, com exceção da maior parte da Oceania. De acordo com a *World Survey of Rabies* da World Health Organization - WHO, para o ano de 1999, o número de territórios ou áreas livres de raiva é menor do que aqueles afetados pelo vírus. Muitos dos países ou territórios livres são ilhas, como Japão, Nova Zelândia, Barbados, Fiji, Maldivas e Seicheles. Ainda, são livres de raiva alguns países do continente Europeu tais como a Grécia, Portugal e Escandinávia e o Uruguai e Chile na América Latina (WHO, 2005).

A perenidade da doença é assegurada pelo grande número de espécies animais susceptíveis que atuam, também, como transmissores. A raiva entre os animais domésticos permanece como a maior ameaça na transmissão do vírus para humanos, sendo o cão ainda, o maior reservatório do vírus da raiva na África e em certos países asiáticos e sul-americanos (NIEZGODA; HANLON; RUPPRECHT, 2002; OPAS, 2001).

A grande densidade e a alta taxa de reprodução anual de cães são fatores importantes nas epizootias de raiva canina na América Latina, incluindo o Brasil. Em contraste com outras variantes do vírus da raiva, os isolados de cães de diferentes localidades têm uma diversidade genética limitada (SMITH, 1989) e são bastante similares à amostra vacinal. Foi sugerido por Smith et al. (1992) que esta similaridade na sequência de RNA reflete a existência de um reservatório global do vírus da raiva em cães originado de uma mesma fonte. Este fato seria consequência da colonização Européia e introdução de cães infectados nos diferentes continentes (CHILDS, 2002).

Os gatos podem ser reservatórios de diversas variantes do vírus atuando como importantes hospedeiros acidentais por *spill-over* e como elo de ligação na cadeia de transmissão do vírus para humanos e outros animais domésticos (CHILDS, 2002).

Nas Américas, a raiva em cães tem apresentado uma marcada tendência de diminuição, situação que ocorre desde 1996, sendo este um indicador do sucesso das campanhas de controle da raiva urbana (OPAS, 2001). No entanto, segundo os últimos dados compilados, a raiva canina foi reportada em 20 países das Américas, sendo o Brasil responsável pelo maior número de ocorrências (OPAS, 2001). Em relação à raiva entre os gatos a tendência também é decrescente nos últimos anos. É interessante notar que na América Latina houve uma diminuição de 27,5% de casos de raiva nesta espécie, enquanto que na América do Norte um aumento de 4,7%, o que pode ser decorrência da freqüente exposição destes animais à fauna silvestre (OPAS, 2001).

Criado oficialmente em 1973, o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva foi gradualmente implantado no Brasil, tendo atingido a totalidade das Unidades Federativas em 1977. As atividades iniciaram-se pelas zonas urbanas das capitais e áreas metropolitanas, estendendo-se, posteriormente, às cidades do interior. O Estado de São Paulo iniciou suas atividades de forma coordenada neste Programa, vacinando cães e gatos, em 1975. A partir de 1983, praticamente 100% dos municípios fazem a vacinação em campanha, com a vacina de vírus inativado do tipo Fuenzalida & Palácios (GOMES, 1985). Outras vacinas de vírus inativado e acrescidas de adjuvante são utilizadas nestas espécies (SÃO PAULO, 1999).

Segundo dados da Organização Panamericana da Saúde (OPAS, 2001) a raiva em animais de interesse econômico ocorre principalmente nos países da América Latina e está relacionada à presença do morcego hematófago (*Desmodus rotundus*), principal reservatório do vírus da raiva para estas espécies. O ataque destes morcegos aos bovinos acarreta sérios prejuízos à pecuária, pois além dos animais mortos pela doença, os animais agredidos perdem peso e apresentam lesões em diversas partes do corpo o que prejudica a qualidade do couro.

As primeiras citações sobre a raiva paralítica dos herbívoros no Brasil estiveram relacionadas com o foco ocorrido no litoral do Estado de Santa Catarina entre 1906 a 1908 onde bovinos, eqüinos, suínos, ovinos e caprinos encontravam-se acometidos. Foi somente em 1911 que Carini postulou que o morcego era responsável pela transmissão do vírus da raiva. Durante o período de 1914-1918, Haupt e Rehaag (1925) estudaram os casos de raiva ocorridos na mesma região e confirmaram que a ocorrência da doença estava associada aos morcegos. Mais tarde, pesquisas realizadas com morcegos de diferentes áreas afetadas concluíram que a infecção com o vírus da raiva entre os morcegos vampiros era muito mais elevada que entre as espécies frugívoras e que eram um excelente transmissor do vírus, sendo então reconhecida a importância do morcego vampiro na disseminação do vírus da raiva (QUEIROZ LIMA, 1934; TORRES; QUEIROZ LIMA, 1935).

No Brasil estimou-se perda anual de 15 milhões de dólares, com a morte de 40.000 bovinos (SÃO PAULO, 1998). No ano de 2001 foram reportados 2.684 casos de raiva animal sendo 74,6% em animais de importância econômica, destacando-se a espécie bovina. Apesar desde número elevado houve uma diminuição de 33,9% de casos quando comparado com o ano de 2000 (OPAS, 2001).

Estudo retrospectivo de raiva em espécies de interesse econômico no Estado de São Paulo mostrou casos laboratorialmente comprovados, com positividade de 18,1% na década de sessenta, 38,1% nos anos setenta, 18,7% na década de oitenta e 23,8% no período de 90 a 95 (dados não publicados). Ainda, segundo informações da Comissão Estadual de Coordenação do Programa de Controle da Raiva no Estado de São Paulo, 1999 a 2001, foram registrados 1.421/3.073 (46,2%) casos de raiva no Estado. No entanto, como resultado das campanhas estaduais de combate à doença o número de casos diminuiu significativamente, encerrando o ano de 2005 com 69 notificações.

A raiva em animais silvestres terrestres assume papel importante na Europa, Estados Unidos e Canadá, onde várias espécies estão envolvidas na transmissão da raiva para animais domésticos e para o homem (WHO, 2005). Na América do Norte, os reservatórios mais importantes são as raposas (*Vulpes vulpes*), os *raccoons* (*Procyon lotor*); os *skunks* (*Mephitis mephitis*), os lobos (*Canis lupus arabs*, *Canis latrans*) e as raposas do ártico (*Alopex lagopus*) (MACINNES, 1988). Na Europa, as raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) e o *raccoon-dog* (*Nictereutes procyonoides*) são os mais citados (KREBS et al., 2002).

No continente africano, os carnívoros tais como as hienas (*Hyaena brunnea*, *Crocuta crocuta*), os chacais (*Canis simensis*, *Canis mesomelas*, *Canis adustus*) o mangusto amarelo (*Cynictis penicillata*), as raposas (*Otocyon megalotis*, *Vulpes sp*), as civetas (*Civettictis civetta*), entre outros, são os mais importantes (KING, MEREDITH, THONSON, 1993). Na América Central e no Caribe, o vírus é frequentemente isolado do mangusto comum

(*Herpestes auropunctatus*), um mamífero da família dos viverídeos, que foi trazido da Índia para controlar os roedores e serpentes, especialmente em Honduras, Cuba, Porto Rico, República Dominicana, Haiti, Granada e Antígua (KREBS et al., 2002). No Brasil há relatos esporádicos de isolamento do vírus da raiva de guaxinim (*Procyon cancrivorus*), lobo guará (*Crysocyon brachyurus*), sagüi do Nordeste (*Callithrix jacchus*), raposa do Nordeste (*Dusicyon vetulus*), coati (*Nasua nasua*), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), gato do mato (*Leopardus tigrinus*), onça pintada (*Panthera onca*), entre outros (CORRÊA; PASSOS, 2001). O vírus da raiva foi isolado de morcegos hematófagos *D. rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* e de numerosas espécies de morcegos de hábitos alimentares distintos (UIEDA et al., 1996).

No nordeste do Brasil, Estado do Ceará, foram relatados três casos de raiva humana transmitida pelo sagüi (*Callithrix jacchus*), no período de 1991 a 1998. Estudos de caracterização genética desses isolados comprovaram que existe uma alta homologia entre os vírus e que estes representam um ciclo de raiva único e independente (FAVORETTO et al., 2001).

Recentemente, Gomes (2004), no Estado da Paraíba, isolou o vírus da raiva de 12 raposas *Pseudalopex vetulus* (*Dusicyon vetulus*), e de outras espécies de animais domésticos como caprinos, ovinos, asininos, caninos e quirópteros. A caracterização destes isolados pelo sequenciamento parcial do gene central P, identificou três grupos: o grupo 1 foi identificado em carnívoros terrestres e forma agrupamentos com outras amostras cosmopolitas comuns nas Américas; o grupo 2, formado por duas amostras distintas, isoladas de duas espécies de morcegos não hematófagos; o grupo 3, constituído de variantes isolados de animais domésticos e de morcegos hematófagos *D. rotundus*. O grupo terrestre 1 foi subdividido em três subgrupos: subgrupo 1a associado exclusivamente com cães e gatos enquanto que os subgrupos 1b e 1c foram encontrados exclusivamente em raposas. Estas observações sugerem

que no Nordeste do Brasil, a raposa *P. vetulus* desempenha o papel de reservatório silvestre da raiva. Os mAbs cedidos pelo "Canadian Food and Inspection Service - Canadá" e aplicados a estas amostras revelaram, de maneira semelhante, a existência destas variantes (BERNARDI et al., 2005).

A raiva em morcegos não hematófagos foi relatada, pela primeira vez, em um surto da doença em Trinidad (PAWAN, 1936). No entanto, o primeiro relato de raiva em morcego insetívoro, confirmado laboratorialmente se deu nos Estados Unidos, em 1953 (BRASS, 1994a). No decorrer dos anos o número de morcegos positivos neste país teve um incremento, passando de um em 1956 para 84 em 1990 (CHILDS et al., 1994). A raiva nestas espécies é comum ainda no Canadá (NADIN-DAVIS, 2001) e a infecção com vírus relacionados EBLs é mais prevalente na Europa (DIETZSCHOLD, 1988), outros relatos surgiram na África e Ásia (BRASS, 1994b).

A raiva entre os morcegos insetívoros é de especial interesse nos Estados Unidos onde 24 dos 32 casos humanos diagnosticados entre 1990 e 2000 foram causados por variantes destas espécies (CHILDS, 2002). Na Europa a infecção de morcegos insetívoros pelos lyssavirus 1 (EBL-1) e 2 (EBL-2) são comuns em vários países. Até 2002 o Reino Unido era considerado livre de raiva, quando na Escócia um naturalista morreu em decorrência de raiva transmitida por morcego (NATHAWANI, 2003). No continente Australiano, também até pouco tempo considerado livre de raiva, ocorreram mortes em humanos causadas por lyssavirus transmitidos por morcegos frugívoros (HANNA et al., 2000).

Na América Latina, precisamente no Chile onde a raiva canina está controlada há décadas e casos humanos não ocorriam desde a década de 1970, foi registrado um caso da doença em humano, transmitida por morcego insetívoro (FAVI et al., 2002).

No Brasil, no ano de 1957 foi isolado o vírus rábico de um morcego não hematófago (*Phyllostomus hastatus*) no Estado do Rio de Janeiro (SILVA; RIVELLO; NILSSON., 1961).

Desde então, o isolamento do vírus em morcegos não hematófagos no Brasil já foi relatado em vários Estados (UIEDA et al., 1996).

No Estado de São Paulo, o número de morcegos com diagnóstico positivo para raiva tem aumentado (ALBAS et al., 2004; CUNHA et al., 2001; MARTORELLI et al., 1995; MARTORELLI et al., 1996; PASSOS et al., 1998; QUEIROZ DA SILVA et al., 1999; UIEDA et al., 1995), em decorrência de um grande número de laboratórios de diagnóstico e divulgação da importância do envio de exemplares de morcegos para exame.

Embora a raiva humana não tenha sido reportada no Brasil nos primeiros surtos da doença transmitida pelo morcego hematófago, 62 mortes foram relatadas até o ano de 1960 (SCHNEIDER, 1991). Ainda, um grande número de casos ocorreu em 1990, nas proximidades de uma área de mineração, no Estado de Mato Grosso (SCHNEIDER, 1991).

Dos 18 casos relatados de raiva humana entre 1983 e 1995 no estado de São Paulo, em dois, seguramente, o transmissor foi o morcego, provavelmente de espécies não hematófagas (TAKAOKA, 1996).

Recentemente um surto de raiva humana transmitida por morcego hematófago ocorreu em Portel, Estado do Pará, com 15 casos humanos confirmados (OPAS, 2004). Em 2005, fato semelhante aconteceu nos municípios de Augusto Corrêa e Viseu, com 18 casos de raiva humana, envolvendo os morcegos hematófagos. No Estado do Maranhão 24 casos humanos da doença foram notificados em 2005, envolvendo vários municípios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005) e a tipificação antigênica de três amostras de vírus isoladas de humanos e uma amostra do morcego hematófago *D. rotundus* foram compatíveis com a variante de vírus de morcego hematófago *D. rotundus*, com o uso de painel de oito mAbs desenvolvidos pela *Rabies Centre of Expertise, Canadian Food Inspection Agency, Ottawa – Fallowfield*, do

Canadá. Estas amostras foram analisadas geneticamente com base no gene G, confirmando os resultados da análise antigênica (ITO, 2005). (Informação verbal)¹

O sucesso na profilaxia da raiva humana e dos animais depende, basicamente, da utilização de vacinas eficazes, ou seja, com elevado poder imunogênico, bem como do controle de cães, em áreas urbanas, e de morcegos hematófagos. As vacinas comerciais são preparadas com vírus fixo, sem levar em consideração as diferenças antigênicas observadas em diferentes amostras, principalmente àquelas provenientes de morcegos (FAVORETTO et al., 2002; NADIN-DAVIS et al., 2001; SACRAMENTO et al., 1994).

Falhas vacinais ocorrem com frequência em herbívoros, em decorrência do armazenamento inadequado de vacinas, principalmente as de vírus atenuado (ESDALL, 1969; SUREAU; ARELLANO, 1971), da excessiva carga viral à qual os animais são submetidos (SUREAU; ARELLANO, 1971), ou ainda pela infecção com variantes do vírus rábico (SIKES, 1971).

Apesar de medidas profiláticas para seu controle, a raiva vem se mantendo de forma endêmica, em várias regiões do Brasil. As características biológicas de isolados do vírus da raiva, provenientes de diferentes espécies animais, são pouco estudadas sendo a investigação experimental das propriedades patogênicas e imunogênicas destas amostras de grande importância para o conhecimento da epidemiologia da doença. Vale ressaltar ainda, que o envolvimento de morcegos de diferentes espécies na transmissão de raiva para animais e humanos tem sido relatada cada vez com mais frequência. Assim, estudar o comportamento de amostras do vírus da raiva, isoladas destas espécies, bem como a proteção conferida pelas vacinas utilizadas, frente às mesmas, pode ser de grande valia na adoção de medidas de controle e profilaxia da doença.

¹ Informação fornecida por Ito, F. H. em Palestra intitulada “Road Kills”, no II Encontro Nacional de Coordenadores da Raiva dos Herbívoros. Salvador-Ba, 12-16 de dezembro de 2005.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram:

- Caracterização genética de isolados do vírus da raiva de morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros.
- Verificar a patogenicidade de isolados do vírus da raiva em camundongos, através da inoculação intracerebral e intramuscular.
- Analisar a proteção cruzada conferida por vacina de uso veterinário, aplicada pela via subcutânea, com 1 ou 2 doses, em camundongos desafiados com amostras do vírus da raiva pelas vias IC e IM.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos albinos suíços com 21 dias de idade, separados em lotes de machos e fêmeas, procedentes do biotério do Instituto Biológico - APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios)- Secretaria da Agricultura, para as passagens sucessivas das amostras estudadas bem como para a titulação das mesmas.

Para o teste de patogenicidade e de proteção cruzada foram empregados camundongos albinos suíços, do sexo feminino, com seis semanas de idade, pesando 20 gramas e 4 semanas e com peso de 12 a 15 gramas, respectivamente, provenientes do biotério do LANAGRO-SP (Laboratório Nacional Agropecuário de São Paulo).

3.2 Vírus

Amostra padrão

Foi utilizada a amostra de vírus fixo de raiva PV (Pasteur Virus) – PV1 43.04, procedente do NIH (National Institutes of Health - EUA) e mantida em coelhos da raça Nova Zelândia no Instituto Butantã e com número desconhecido de passagens em camundongos por via IC.

Amostras de campo

Foram utilizadas 23 amostras isoladas de 3 morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), 5 morcegos frugívoros (*Artibeus spp*), 13 morcegos insetívoros (3 *Nyctinomops laticaudatus*, 2 *Eumops auripendulus*, 4 *Eptesicus furinalis*, 2 *Molossus molossus*, 1 *Molossus abarsus* e 1 *Molossus rufus*) e 2 morcegos não identificados (quadro 1). Fragmentos de cérebros dos morcegos relacionados foram submetidos ao diagnóstico da raiva pela prova de imunofluorescência direta (IFD), utilizando conjugado comercial contra a nucleoproteína viral e pela inoculação intracerebral em camundongos, com comprovação da raiva, utilizando novamente a técnica de IFD nos cérebros dos camundongos encontrados em fase agônica. Das suspensões preparadas a partir do cérebro destes camundongos foram extraídos os RNAs. Em uma fase posterior foram selecionadas cinco amostras de morcegos e uma de cão, sendo as mesmas submetidas a passagens adicionais em camundongos por via IC, para os estudos de patogenicidade e proteção cruzada. As espécies das quais foram isoladas, a região geográfica e o número de passagens em camundongos estão ilustrados no quadro 2.

3.3 Extração do RNA das amostras

Os RNAs do vírus da raiva de 23 amostras foram extraídos dos cérebros de camundongos infectados por via IC, na sua primeira passagem. A suspensão de cérebros destes camundongos, diluídos na proporção de 1:5 em PBS (solução fosfatada salina tamponada) foi centrifugada a 2.000 x g por 10 minutos. Do sobrenadante foi extraído o RNA

total, com a utilização de um reagente comercial (*QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, Tokyo, Japan*), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada conforme a descrição de Arai et al., 1997. Inicialmente, foram utilizados dois conjuntos de *primers*, designados por P1/P2 e RHN1/RHNS3, utilizados para detectar regiões completas ou parciais do gene N do vírus da raiva (GOTO et al., 1994; ITO et al., 1999; SOARES et al., 2002). O *primer* P1, apresentando a sequência 5' – 3' (CTACATGGATGCCGACAAGA), corresponde às posições 66-86 (*messenger*) do gene N, e o *primer* P2 (CCCATATAACATCCAACAAAGTG), *genomic*, correspondendo às posições 1029-1007. O outro conjunto de *primers*, o RHN1 (*messenger*) corresponde às posições 28-50, com a sequência 5'-3' (ACAGACAGCGTCAATTGCAAAGC), e o RHNS3 (*genomic*), (CTAGGATTGACAAAGATTTTGCTC), correspondendo às posições 1516-1539 (SOARES et al., 2002). Para a execução desta técnica, um microlitro, contendo aproximadamente 0,2 a 0,4 µg de RNA, foi utilizado para a reação de RT-PCR, com o Super Script One-Step RT-PCR System (Life Technologies, GIBCO BRL), conforme as instruções do fabricante. As misturas foram incubadas a 50°C por 60 min., e submetido a 40 ciclos de PCR a 94°C por 30s., 50°C por 20s., e a 68°C por 2 min em GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems. Tokyo, Japan). A suspensão de cérebros de camundongos não inoculados com o vírus da raiva foi utilizada como controle negativo e a suspensão de cérebros de camundongo inoculados com o vírus fixo PV foi utilizada como controle positivo para os procedimentos de extração de RNA e para a execução da reação de RT-PCR. Os produtos amplificados foram

visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose a 2% preparado em tampão TBE 1X, usando o corante de brometo de etídeo. Foi também aplicado no gel o marcador padrão de peso molecular de DNA para avaliação do tamanho do fragmento obtido (Takara Biomedicals, Shiga, Japan).

3.5 Sequenciamento direto e análise filogenética

No Laboratório Central do College of Bioresource Sciences, da Nihon University, Kanagawa, Japão, os produtos do PCR foram submetidos ao sequenciamento completo da região codificadora da nucleoproteína N, correspondendo aos nucleotídeos 89-1.410 (1.322 pb) utilizando os "sense primers": JW12 (5'-ATGTAACACCYCTACAAT-3', P1 (5'-CTACAATGGATGCGACAAGA-3'), BRABN-S1 (5'GCACTAGCTATGGAATCCTG-3') e BRABN-S3 (5'GCACTGGTGTTCATTACAGG-3'). Os "anti-sense primers" utilizados foram: N8 (5'-AGTTTCTTCAGCCATCTC-3'), P2 (5'CCCATATAACATCCAACAAAGTG-3') e BRABN-C3 (5'-TGTCCAGATTTTGCTCA-3'). Foi empregada a técnica de sequenciamento por PCR derivada da metodologia de Sanger (1977) utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPS) contendo marcadores fluorescentes (kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A concentração de DNA utilizado nas reações de sequenciamento foi determinada de acordo com o tamanho do produto de PCR e seguindo as orientações do kit. As reações foram realizadas com volume final de 20µl com concentrações de 2µl do Ready Reaction Premix, 6µl do tampão 5X (20 Tris 1M (pH=9) 50mM de MgCl₂), 3,2 pmol de cada primer, DNA e H₂O q.s.p. 20 µl. As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura no GeneAmp PCR

System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems. Tokyo, Japan) com os seguintes parâmetros: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação de sequenciamento as amostras foram precipitadas com isopropanol, ressuspensas em 4 µl do tampão contendo 5 partes de formamida (Sigma) deionizada e 1 parte de blue dextran (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para o gel de sequenciamento empregou-se uma solução comercial acrilamida e bisacrilamida (Long Ranger 50% Gel Solution/Cambrex Bio Science Rockland Inc.) acrescida de 6M de uréia, tampão TBE 1X 125 µl de persulfato de amônio e 25 µl de TEMED (Sigma). O sequenciamento foi determinado com o emprego do aparelho automatizado ABI Prism 3100, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). As seqüências obtidas foram inicialmente alinhadas no programa Clustal. X (THOMPSON et al., 1997). A análise filogenética foi realizada pelo uso do PAUP* 4.0b2 (SWOFFORD, 2000) empregando-se o método distância de neighbor-joining (evolução mínima) para reconstrução de topologias, modelo de evolução da seqüência de nucleotídeos Hasegawa-Kishino-Yano (HKY)-1985. Foram calculados os valores de probabilidade "bootstrap" de cada "node" com 1.000 réplicas para a verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas pelo método não paramétrico. Para a obtenção do gráfico, foi utilizado o programa TREEVIEW (PAGE, 1996).

3.6 Vacina

Foi utilizada uma vacina contra a raiva do laboratório Biovet[®], partida 466/04, contendo vírus inativado e de uso veterinário, possuindo o selo holográfico exigido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, produzida a partir da

replicação do vírus PV em células BHK-21 e contendo como adjuvante o hidróxido de alumínio.

3.7 Conjugado anti-rábico

Foi utilizado o conjugado antinucleocapsídeo imunofluorescente policlonal, marcado com o isotiocianato de fluoresceína (BioRad)[®]. A diluição de trabalho deste conjugado foi de 1:90, no microscópio de imunofluorescência Zeiss Jena (Jenalumar), equipado com lâmpada de mercúrio e aumento de 250X.

3.8 Diluente

O diluente empregado para o preparo das suspensões de cérebro de camundongos inoculados para adaptação das diferentes amostras de vírus, bem como na diluição seriada de vírus utilizados para desafio era constituído de uma solução de água destilada estéril, adicionada de 2% de soro equino isento de anticorpos contra o vírus da raiva, acrescido de 1.000 UI de penicilina e 1,25 mg de estreptomicina por mililitro.

3.9 Imunofluorescência direta (IFD)

Foi utilizada a técnica preconizada originalmente por Goldwasser; Kissling (1958) e descrita por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996). As impressões sob pressão, do tecido cerebral, foram obtidas em duplicata em lâminas de microscopia, devidamente identificadas, acondicionadas em caixas de madeira e armazenadas a -20°C , para processamento posterior.

3.10 Técnica de inoculação em camundongos

Os camundongos foram inoculados pela via IC, segundo a técnica descrita por Koprowski (1996), e ainda pelas vias subcutânea (SC) e IM.

3.11 Isolamento das amostras de vírus da raiva

O isolamento das diferentes amostras de vírus da raiva foi obtido pela técnica de inoculação IC em camundongos adulto-jovens (21 dias), com doses de 0,03ml, em grupos de oito camundongos, conforme Koprowski (1996). Os animais inoculados foram observados diariamente por um período de 30 dias. Os animais, em fase final de doença, foram sacrificados e impressões do tecido cerebral submetidas à prova de imunofluorescência, para a comprovação da raiva.

3.12 Identificação das espécies de morcegos

A identificação dos exemplares de morcegos foi realizada através de características morfológicas e morfométricas externas (em milímetro) segundo Taddei, 1998.

3.13 Adaptação de amostras de campo em camundongos

Uma suspensão a 20% (Peso/Volume) de cada amostra de vírus foi inoculada, por via IC, em 10 camundongos recém desmamados. Quando do aparecimento dos sinais clínicos, os animais foram sacrificados, e uma nova inoculação realizada.

3.14 Titulação dos vírus de campo e vírus PV em camundongos

Diluições na razão 10, do vírus padrão (PV) e das demais amostras estudadas foram inoculadas em grupos de 10 camundongos com 21 dias de idade com a dose de 0,03ml pela via IC. Os camundongos inoculados foram observados por 21 dias para a verificação dos sinais clínicos de raiva. Os mortos a partir do 5º dia pós-inoculação e manifestando sinais nervosos característicos da doença foram considerados positivos. A Dose Letal 50% (DL50) foi calculada pelo método de Reed e Muench (1938) e expressa em $\log_{10}DLIC_{50}/0,03$ ml (dose letal IC 50% por 0,03 ml, via IC em camundongos).

3.15 Verificação da patogenicidade

Camundongos albinos suíços com 4 semanas de idade foram inoculados com 0,03ml de uma suspensão a 20% das amostras de campo por via IC. Camundongos com seis semanas de idade, pesando aproximadamente 20 gramas, foram inoculados por via IM, na pata direita com 0,1ml da suspensão 20% do vírus padrão (PV) e das demais amostras. Estes animais foram observados diariamente à procura dos sinais de raiva por um período de 21 dias. Os cérebros de animais encontrados mortos foram submetidos à prova de IFD para comprovar a infecção pelo vírus da raiva.

3.16 Experimento de proteção cruzada

Camundongos com quatro semanas de idade foram separados em três grupos: o primeiro foi inoculado pela via SC no dia zero com 0,2ml de vacina; o segundo recebeu uma segunda dose de vacina após uma semana; o terceiro não recebeu vacina. Os camundongos vacinados com uma ou duas doses de vacina foram desafiados no 14º dia após a primeira vacinação. O desafio foi feito pelas vias IC com dose de 0,03ml e IM com 0,1ml, empregando-se diluições de vírus na razão 10. Os títulos infectantes do desafio viral foram determinados pela inoculação IC e IM em camundongos controle, não vacinados. Foram inoculados seis camundongos para cada diluição de vírus. Os animais foram observados por um período de 21 dias. A prova de imunofluorescência direta foi empregada para pesquisa da presença do antígeno rábico no cérebro de animais mortos. O título viral obtido em animais

vacinados foi comparado ao de animais não imunizados para a determinação do índice de proteção (IP). Considerou-se proteção diferenças de 3 log 10.

Origem Geográfica						
Amostra	Espécie	Município	Estado	País	Ano	Nº acesso
BR-NL1	<i>Nyctinomops latiacudatus</i>	SJR Preto	São Paulo	Brasil	1998	AB201806
BR-NL2	<i>Nyctinomops latiacudatus</i>	SJR Preto	São Paulo	Brasil	1999	AB201807
BR-NL3	<i>Nyctinomops latiacudatus</i>	Nova Granada	São Paulo	Brasil	2001	AB201808
BR-EA1	<i>Eumops auripendulus</i>	Américo Campos	São Paulo	Brasil	1998	AB201809
BR-EA2	<i>Eumops auripendulus</i>	Pres. Venceslau	São Paulo	Brasil		AB201810
BR-EF1	<i>Eptesicus furinalis</i>	SJR Preto	São Paulo	Brasil	1998	AB201811
BR-EF2	<i>Eptesicus furinalis</i>	Olímpia	São Paulo	Brasil	2001	AB201812
BR-EF3	<i>Eptesicus furinalis</i>	SJR Preto	São Paulo	Brasil	2001	AB201813
BR-EF4	<i>Eptesicus furinalis</i>	Catanduva	São Paulo	Brasil	2002	AB201814
BR-MM1	<i>Molossus molossus</i>	Jales	São Paulo	Brasil	1999	AB201815
BR-MM2	<i>Molossus molossus</i>	Ilha Solteira	São Paulo	Brasil	2002	AB201816
BR-MR1	<i>Molossus rufus</i>	Pres. Venceslau	São Paulo	Brasil	2002	AB201817
BR-MA1	<i>Molossus abrasus</i>	Itapira	São Paulo	Brasil	2000	AB201818
BR-DR1	<i>Desmodus rotundus</i>	Lindóia	São Paulo	Brasil	2000	AB201803
BR-DR2	<i>Desmodus rotundus</i>	Lindóia	São Paulo	Brasil	2000	AB201804
BR-DR3	<i>Desmodus rotundus</i>	SJ Barreiro	São Paulo	Brasil	2001	AB201805
BR-BAT1	Desconhecido	Timburi	São Paulo	Brasil	2000	AB201819
BR-BAT2	Desconhecido	Goiânia	Goiás	Brasil	-	AB201820
BR-AL1	<i>Artibeus lituratus</i>	Itapira	São Paulo	Brasil	1998	AB117969
BR-AL2	<i>Artibeus lituratus</i>	SJR Preto	São Paulo	Brasil	1998	AB117970
BR-AL3	<i>Artibeus lituratus</i>	Novo Horizonte	São Paulo	Brasil	1998	AB117971
BR-AL4	<i>Artibeus lituratus</i>	Dracena	São Paulo	Brasil	2002	AB201802
BR-AP1	<i>Artibeus planirostris</i>	SJR Preto	São Paulo	Brasil	1998	AB117972

Quadro 1 - Isolados do vírus da raiva utilizados para a análise de filogenia, conforme a espécie, Município, Estado, País, ano de isolamento e número de acesso no GenBank, - São Paulo – 2005

Amostra	Localidade	Espécie	Nº de passagens *
BR-C	Birigui –SP	Canina	6
BR-EF1	São José Rio Preto-SP	<i>Eptesicus furinalis</i>	5
BR-NL1	São José Rio Preto-SP	<i>Nictinomops laticaudatus</i>	5
BR-AL3	Novo Horizonte-SP	<i>Artibeus lituratus</i>	5
BR-MM1	Jales-SP	<i>Molossus molossus</i>	5
BR-DR1	Lindóia-SP	<i>Desmodus rotundus</i>	5

*passagens em camundongos pela via IC

Quadro 2 - Amostras de vírus da raiva, selecionadas por localidade, espécie e número de passagens em camundongos, Instituto Biológico de São Paulo, período de 1998 a 2000 - São Paulo – 2005

3 RESULTADOS

4.1 Análise filogenética

Todas as amostras do vírus da raiva listadas no quadro 1 pertencem ao genótipo 1, vírus clássico da raiva, conforme o resultado do estudo de homologia e da análise filogenética (Figura 1).

A análise filogenética do gene N dos isolados do vírus da raiva mostrou que os vírus isolados de morcegos foram de modo geral segregados em quatro grupos genéticos distintos: morcegos hematófagos, morcegos insetívoros 1, 2 e 3 (Figura 1). Os morcegos insetívoros 1 estão representados por isolados de *E. furinalis*: BR-EF1, BR-EF2, BREF3, BR-EF-4, BR-EA1 e BR-NL2; os morcegos insetívoros 2 consistem de isolados de *Molossus* spp: BR-MM1, BR-MM2 e BR-MA1 e os morcegos insetívoros 3 isolados de *N. laticaudatus*: BR-NL1 e BR-NL3. A homologia de nucleotídeos entre cada subgrupo de morcegos insetívoros 1, 2 e 3 foi maior que 99%, 97% e 99%, respectivamente.

O grupo de morcegos hematófagos foi representado pelos isolados de: três morcegos hematófagos *D. rotundus* (BR-DR1, BR-DR2 e BR-DR3); cinco morcegos frugívoros *A. lituratus* BR-AL1, BR-AL2, BR-AL3, BR-AL4 e *A. planirostris* BRAP1; dois morcegos insetívoros (BR-MR1 e BR-EA2) e dois de espécies não identificadas (BR-BAT1 e BR-BAT2), como mostra a figura 1. Embora tenham sido isolados de morcegos frugívoros e insetívoros, os vírus BR-AL1, BR-AL2, BR-AL3, BR-AL4, BRAP1, BR-MR1 e BR-EA2 segregaram com o grupo de morcegos hematófagos com uma homologia de 97-99% na sequência de nucleotídeos com outros isolados do mesmo grupo. A árvore filogenética mostra ainda que este grupo de morcegos hematófagos apresentou uma relação mais estreita com dois isolados de morcegos insetívoros do Chile e Estados Unidos (CHTB e USATB), do que com

Figura 1 - Árvore filogenética baseada nas seqüências de 1.322 nucleotídeos nas posições 89-1.410 do gene N. A análise filogenética foi baseada nos métodos de “neighbor-joining”. O vírus Mokola foi utilizado como *out group*. CHTB e USATB são os isolados de *Tadarida brasiliensis* do Chile e dos Estados Unidos da América, respectivamente. Dados da seqüência obtidos do GenBank: ABL (AF418014), EBL 1 (AY863408), EBL 2 (AY863375), Mokola (Y09762), CHTB (AF070450) e USATB (AF394876). Os números indicam os valores do bootstrap para 1000 replicações

os isolados de morcegos insetívoros do Brasil. A homologia de nucleotídeos observada entre os morcegos hematófagos brasileiros (BR-DR1, BR-DR2 e BR-DR3) com os morcegos insetívoros do Chile foi maior que 91%.

4.2 Patogenicidade

As amostras BR-C, BR-EF1, BR-NL1, BR-AL3, BR-MM1 e BR-DR1, quando inoculadas em camundongos pela via IC, apresentaram-se patogênicas, provocando a morte dos mesmos num período de 4 a 14 dias pós-inoculação. No entanto, 500DLIC₅₀ das mesmas amostras inoculadas pela via IM apresentaram resultado diferente, quando comparadas à inoculação IC, conforme apresentado na tabela 1.

4.3 Proteção cruzada

Os índices de proteção obtidos em camundongos vacinados após desafio IC com o vírus PV e os diferentes isolados (BR-C, BR-EF1, BR-NL1, BR-AL3, BR-MM1, BR-DR1), estão na tabela 2. Camundongos inoculados com duas doses de vacina para uso animal, pela via SC, e desafiados pela via IC foram protegidos contra o desafio com todas as amostras testadas. Quando os camundongos receberam 1 dose da mesma vacina houve proteção parcial daqueles desafiados com as amostras de vírus PV e BR-C, enquanto que os desafiados com amostras provenientes de morcegos apresentaram índice de proteção igual ou superior a 3 .

Os títulos virais em $DLIM_{50}/0,1\text{ml}$ (dose letal intramuscular 50% em camundongos por 0,1ml de inóculo) obtidos através da inoculação dos isolados pela IM não permitiram o cálculo do índice proteção (diferença de 3 log 10) como descrito no teste de proteção cruzada. Considerou-se, portanto, a porcentagem de sobrevivência de camundongos vacinados com 1 ou 2 doses de vacina e desafiados com os diferentes isolados do vírus da raiva. Houve proteção de 100% dos camundongos com exceção daqueles vacinados com uma dose de vacina e desafiados com a amostra PV que apresentaram um índice de 66% de sobreviventes.

Tabela 1 - Distribuição de amostras do vírus da raiva segundo o resultado obtido na prova de imunofluorescência direta, inoculação intracerebral em camundongos, título do vírus em DLIC₅₀/0,03 ml e porcentagem de mortalidade após inoculação intramuscular, Instituto Biológico de São Paulo, período de 1998 a 2000 - São Paulo – 2005

Amostra	Origem	IFD	IIC (m/i)	DLIC ₅₀ /0,03ml (log10)	% Mortalidade (500DLIC ₅₀ /IM)
PV				6,6	0,0
BR-C	Canina	+	4/4	5,9	50,0
BR-EF1	<i>E. furinalis</i>	+	5/5	5,5	5,2
BR-NL1	<i>N. laticaudatus</i>	+	6/7	5,2	50,0
BR-AL3	<i>A. lituratus</i>	-	7/7	4,9	40,0
BR-MM1	<i>M. molossus</i>	-	4/4	4,7	9,5
BR-DR1	<i>D. rotundus</i>	-	7/7	5,3	60,0

IFD – imunofluorescência direta

+: positivo -: negativo

IIC – inoculação intracerebral em camundongos

m/i = camundongos mortos/inoculados

DLIC₅₀ – Dose letal 50% intracerebral em camundongos

IM = Intramuscular

Tabela 2 - Índices de proteção de vacina de vírus inativado, para uso animal contra desafio IC em camundongos, com amostras de vírus da raiva, isoladas de diferentes espécies animais, Instituto Biológico de São Paulo - São Paulo - 2005

Vírus de Desafio	Índice de proteção (IP) *	
	2 doses	1 dose
PV	4,0	1,3
BR-C	4,9	1,6
BR-EF1	5,5	4,1
BR-NL1	5,2	4,2
BR-AL3	3,8	3,0
BR-MM1	4,7	3,7
BR-DR1	5,3	3,3

IP - diferença entre as DLIC₅₀ de camundongos não vacinados e vacinados.

4 DISCUSSÃO

O grande número de variantes de vírus implicados na etiologia da raiva levou à descrição do gênero *Lyssavirus* na família *Rhabdoviridae*. A diferenciação entre estas variantes é determinada tanto por estudos antigênicos como genotípicos (SMITH, 1996).

Estudos antigênicos são muitas vezes limitados dependendo da bateria de mAbs utilizados (BERNARDI, 2005). Por outro lado, a caracterização genética de isolados não estabelece nenhum significado biológico. Assim, o estudo proposto teve como objetivos estabelecer a análise filogenética de isolados do vírus da raiva de morcegos do Estado de São Paulo, e associá-la com as características biológicas dos mesmos.

A análise filogenética da região do gene da nucleoproteína de 23 isolados do vírus da raiva de morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros revelou que estes estão divididos em 4 grupos que tendem a se relacionar com a espécie hospedeira. O primeiro grupo (morcegos hematófagos) está representada essencialmente pelos isolados de *D. rotundus*, com uma relação estreita com os isolados de *Tadarida brasiliensis* do Chile. A relação existente entre estas duas espécies de morcegos também foi descrita no México (DE MATTOS et al., 1999). Ainda neste grupo segregaram amostras de morcegos frugívoros e neste aspecto, Favoretto et al. (2001), estudando vários isolados frente a um painel de mAbs, já haviam encontrado a variante antigênica do vírus do morcego *D. rotundus* em amostras provenientes da espécie *A. lituratus*. Delpietro et al. (1977) também obtiveram variante de morcego hematófago em isolados de *A. lituratus* do Brasil e da Argentina.

Em estudo de caracterização genética com base no sequenciamento do gene N, de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos *Artibeus spp.* do Brasil, Shoji et al. (2004) confirmaram os achados de estudos antigênicos de autores anteriormente mencionados e relataram uma homologia de 97,6-94,4% entre estes isolados com amostras virais do morcego vampiro.

Os resultados obtidos ainda mostraram que isolados de morcegos insetívoros *M. rufus* (BR-MR1) e *E. auripendulus* (BR-EA2) também segregaram com o grupo 1 de morcegos hematófagos, o que sugere a circulação desta variante genética também entre morcegos insetívoros. Nadin-Davis et al. 2001 em estudo antigênico e genético do vírus da raiva de espécies de morcegos do Canadá relataram que 36% das variantes de *Myotis* da América do Norte segregaram com clados de outras espécies de morcegos e admitem que esta acentuada porcentagem de *spill-over* é de difícil interpretação e que as razões que levam a este fenômeno, apesar de não estarem esclarecidas, podem estar relacionadas com o comportamento gregário destas espécies o que resulta em contato interespecies. A infecção de morcegos de espécies não hematófagas com a variante genética do morcego hematófago observada neste estudo também é difícil de analisar, tendo em vista que morcegos hematófagos têm hábitos bastante diferentes daqueles de espécies frugívoras e insetívoras.

O grupo representado pelos morcegos insetívoros 1, 2 e 3 agregaram isolados de cada gênero de morcegos insetívoros (*E. furinalis*, *Molossus spp* e *N. laticaudatus*). O isolado BR-NL2 (*N. laticaudatus*) foi a única exceção entre as amostras, pois segregou com os isolados do subgrupo dos morcegos insetívoros 1 (*E. furinalis*). Apesar do pequeno número de amostras estudadas os resultados obtidos sugerem a existência de variantes espécies-específicas entre os morcegos insetívoros do Estado de São Paulo. Esta teoria pode ser reforçada pelo fato que o mesmo perfil genético do vírus foi obtido na mesma espécie hospedeira em áreas geográficas distintas, como por exemplo, os isolados BR-MM1, BR-MM2 e BR-MA1 de morcegos *Molossus spp* que eram provenientes de regiões separadas por mais de 200Km. Os achados deste estudo corroboram com os de Martorelli et al., 2004 que em estudo de caracterização antigênica e genética de amostras do continente americano concluíram que sete isolados de *Nyctinomops sp* provenientes de diferentes períodos e áreas

geográficas do Brasil segregaram em um grupo independente com grande homologia entre os vírus, formando um clado próximo de outros morcegos insetívoros.

Bernardi et al., 2005 analisando amostras do vírus da raiva de várias espécies animais de diferentes regiões do Brasil concluíram que os isolados de morcegos insetívoros formam um clado totalmente distinto dos outros isolados e, aparentemente, representam duas variantes virais distintas e que, em um contexto continental, esses isolados estão mais próximos, em termos de evolução, de espécies de morcegos insetívoros da América do Norte que dos morcegos hematófagos do Brasil.

A existência de variantes específicas do vírus da raiva em morcegos, também foi reportada na América do Norte. Nos Estados Unidos, foi reconhecido que os genomas do vírus da raiva de morcegos exibem mutações características para cada espécie de morcego hospedeira (MESSENGER; SMITH; RUPRECHT, 2002; SMITH, 1996).

A análise dos ciclos de transmissão da raiva em morcegos é mais difícil de interpretar que a dos ciclos terrestres. O grande número de espécies que servem como reservatório e a grande capacidade de deslocamento de algumas espécies permitem o contato entre animais em grandes distâncias o que representa um problema na interpretação dos achados.

Para entender a patogenicidade do vírus da raiva, muitos estudos usando modelos animais têm sido desenvolvidos. Baer; Santha; Bourne, (1965,1968) mostraram que a amputação da cauda ou perna de camundongos inoculados com o vírus fixo da raiva, próxima ao local da inoculação era capaz de prevenir o desenvolvimento da doença, ou seja, que existe um período de incubação que depende do movimento do vírus pelos nervos periféricos até o SNC.

Muitas evidências têm mostrado que a glicoproteína viral é necessária para a disseminação trans-sináptica de um neurônio a outro e uma simples mudança em aminoácidos

na posição 333 afeta a eficiência desta disseminação e o tropismo celular (DIETZSCHOLD et al., 1983). Dietzschold et al. (1983), concluíram ainda, que ocorre uma mudança na patogenicidade de amostras de vírus fixo da raiva com a substituição do aminoácido arginina na posição 333 da proteína G. Na mesma linha de estudo Coulon et al. (1998) mostraram que um duplo mutante avirulento, que difere da amostra original do vírus CVS por duas substituições no ectodomínio da proteína G não é patogênico para camundongos adultos quando inoculado pela via IM.

Outros resíduos que atuam na atenuação da patogenicidade, pela via intramuscular, têm sido documentados (PREHAUD et al, 1988; TORDO et al., 1993). Takayama-Ito et al. (2006) reportaram que a região entre aos aminoácidos 164 e 303 da glicoproteína da amostra de vírus da raiva Nishigahara é importante para a letalidade em camundongos. Este mesmo estudo mostrou que pelo menos três aminoácidos nas posições 242, 255 e 268 estão relacionadas com a patogenicidade do vírus da raiva.

A amostra de vírus ERA adaptada *in vitro* em células não neuronais é atenuada no que diz respeito a patogenicidade para mamíferos imunocompetentes, embora não apresente alterações no sítio III da proteína G (LAWSON et al., 1989). Assim, o fenótipo patogênico de uma amostra particular do vírus da raiva é definido não só por determinantes localizados no sítio III da G, mas também por outros mecanismos os quais podem ou não estar relacionados com esta proteína (MORIMOTO et al., 1999).

A indução de apoptose em células infectadas pelo vírus da raiva tem sido proposta como mecanismo de patogenicidade (LAFON et al, 1992; MORIMOTO et al., 1999; THOULOZE et al., 1997; THOULOZE et al., 2003).

A eficácia de duas variantes de vírus intimamente relacionadas, uma das quais induz apoptose em neurônios tem permitido delinear os mecanismos da morte da célula neuronal e a patogênese da raiva. Presumivelmente a apoptose resulta em uma infecção limitada *in vivo*,

particularmente se esta for periférica, onde a liberação da proteína G pode estimular uma resposta imune e a prevenção da disseminação do vírus para o cérebro (MORIMOTO et al., 1999).

Existe uma correlação inversa entre a capacidade de amostras de vírus da raiva de invadir o cérebro com a indução de apoptose (MORIMOTO et al., 1999; THOULOZE et al., 2003), sugerindo que seu bloqueio pode ser uma estratégia utilizada por vírus neurotrópicos para favorecer sua progressão até o sistema nervoso (THOULOZE et al., 2003). Em estudo comparando a habilidade das proteínas N e G de amostras do vírus da raiva, patogênicas e não patogênicas, em causar apoptose, Préhaud; Dietzschold; Lafon (2003) concluíram que somente a proteína G de amostras não patogênicas é capaz de induzir este fenômeno.

A investigação do significado biológico de isolados de diferentes grupos do vírus da raiva em relação a patogenicidade do presente estudo mostrou que quando inoculados em camundongos adultos pela via IC todas as amostras foram patogênicas. No entanto, os resultados foram diferentes quando analisamos os dados obtidos pela inoculação pela via IM. Os isolados do grupo de morcegos hematófagos, *D. rotundus* (BR-DR1) e *A. lituratus* (BR-AL3) e dos morcegos insetívoros 3, *N. laticadatus* (BR-NL1) mataram 60%, 40% e 50% dos camundongos, respectivamente. Por outro lado, o isolado do grupo de morcegos insetívoros 1 *E. furinalis* (BR-EF1) matou 5,2% de camundongos e o representante da linhagem insetívoro 2 *M. molossus* (BR-MM1) 9,5%, sendo portanto menos neuroinvasivas que as demais amostras analisadas.

Diferenças na patogenicidade de amostras provenientes de morcegos têm sido descritas. Smith (2002) postula que o polimorfismo genético viral encontrado em duas espécies de morcegos: *Lasionycteris noctivagans* (silver-haired bat) e *Pipistrellus subflavus*, estão presentes na maioria dos casos humanos de raiva nos Estados Unidos, apesar da incidência de contato com estes morcegos não ser maior do que com outras espécies. Conclui

que a virulência destes é maior, levando a um sucesso de infecção após contatos superficiais com morcegos infectados. Estes dados são corroborados por achados experimentais que provaram que este grupo de vírus se replica bem a 34°C em células de fibroblastos e epiteliais, características que podem facilitar a infecção após contato superficial (MORIMOTO et al., 1996).

O estudo *in vivo* de 2 isolados: 1 de coioate e outro de humano, naturalmente infectado com variante de morcego *L. noctivagans*, inoculados por via IC e IM mostrou que a variante de morcego foi menos neurovirulenta quando inoculada por via IM (MORIMOTO et al., 1996).

Existem evidências apontadas por Badrane e Tordo. (2001) de dois filogrupos entre os lyssavirus com características patogênicas particulares. Enquanto os representantes do filogrupo I são patogênicos pelas vias IC e IM o mesmo não acontece com os vírus do filogrupo II que não são patogênicos quando inoculados pela via IM. Os mesmos autores mostraram que o resíduo R333 da glicoproteína, essencial para a virulência, está naturalmente substituído por um D333 nos vírus do filogrupo II, resultando em sua atenuada patogenicidade. Como já mencionado mutantes do vírus da raiva com alterações no R333 ou R330 da glicoproteína G são apatogênicos tanto por via IC como IM, quando inoculados em camundongos. Assim, parece que mutações nestas posições têm conseqüências diferentes na patogenia: elas são menos deletérias no filogrupo II (patogênico pela via IC) que no genótipo 1 (apatogênico pelas vias IC e IM), o que leva a acreditar que existem resíduos compensatórios em vírus do filogrupo II, não presentes na glicoproteína daqueles do filogrupo I (BADRANE et al., 2001).

O assunto envolvendo patogenicidade é deveras complexo; porém, os resultados deste estudo em relação à baixa patogenicidade das amostras BR-EF1 e BR-MM1, quando inoculadas pela via IM, poderiam ser explicados por variações no ectodomínio da proteína G

responsáveis pelas mudanças nas propriedades biológicas destes vírus. No entanto, somente futuros estudos da sequência nucleotídica das glicoproteínas destas amostras poderão confirmar ou não esta hipótese.

A proteção contra a raiva depende da produção de anticorpos neutralizantes induzidos pela proteína G (LAFON, 2002). Não existe, no entanto, uma correlação clara entre níveis de anticorpos neutralizantes e resistência à raiva, sugerindo que outros antígenos e mecanismos estão envolvidos na proteção contra a infecção letal (HOOPER et al., 1998; LAFON, 2002)

Falhas vacinais são raras na proteção contra o vírus da raiva. Quando ocorrem são eventos isolados e envolvem animais imunocomprometidos ou jovens que receberam uma única dose de vacina (FISHBEIN, 1990; MCQUISTON et al., 2001).

Segundo alguns autores a única falha verdadeira acontece quando animais vacinados contra o vírus da raiva são expostos ao vírus Mokola e Lagos bat. Animais de laboratório (BADRANE et al., 2001) e cães e gatos domésticos (VAN TEICHMAN et al., 1998) que receberam vacinas preparadas com vírus da raiva não se mostraram protegidos contra o vírus Mokola e Lagos bat. Por outro lado, Fekadu et al (1988) relataram a proteção de camundongos vacinados com vacina para uso animal e desafiados com a amostra Lagos bat.

Lodmel et al. (1995), em estudo de proteção cruzada utilizando camundongos vacinados e desafiados contra um espectro de variantes do vírus da raiva, encontradas nos continentes Americano, Africano e Asiático, concluíram que a vacina produzida com uma única amostra do vírus da raiva (CVS) ou sua glicoproteína protegeu contra o desafio com todas as amostras testadas.

Outros experimentos mostraram que existem falhas na proteção de camundongos imunizados com vacinas produzidas com vírus PM e desafiados com amostras de vírus isoladas de humano (FEKADU et al., 1988) e de morcego Europeu (Duvenhage 3) (LAFON et

al., 1988). Estudos realizados no Brasil também apontaram falhas vacinais em experimentos de proteção cruzada em camundongos vacinados com vacinas para uso humano e animal e desafiados com vírus isolados de bovinos (CUNHA et al., 2000; HAYASHI et al., 1984; ZANETTI et al., 1998).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que vacina, para uso animal, preparada com amostra de vírus PV protegeu camundongos, que receberam duas doses de vacina, contra o desafio IC com todas as amostras testadas. Em camundongos que receberam uma dose da mesma vacina observou-se proteção parcial contra o desafio com as amostras de vírus PV e BR-C. Quando desafiados pela via IM todos os camundongos sobreviveram, com exceção daqueles vacinados com uma dose de vacina e desafiados com a amostra PV, que apresentaram um índice de 66% de sobreviventes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Fekadu et al. (1988) os quais concluíram que camundongos que receberam duas doses de vacinas de uso animal, com e sem adjuvante, foram protegidos contra o desafio com isolados de vírus de várias espécies de morcegos, incluindo Lagos bat. No entanto, a imunização de camundongos com plasmídeo contendo a proteína G do vírus PV não conferiu proteção contra o desafio com a mesma amostra de vírus (BADRANE et al., 2001).

Dois tipos de teste de potência de vacina com vírus PV inativado para uso animal: o primeiro com vacinação pela via IP e desafio IC; o segundo com aplicação da vacina e desafio pela via IM detectaram altos índices de proteção contra o desafio de isolados de guaxinim e morcego em ambos os testes, quando comparados com o desafio com outros isolados de vírus selvagens (BAER, 1997).

Lafon et al. (1988) observaram que vacina preparada com amostra de vírus PV4 conferiu proteção contra o desafio IC com isolado de morcego Europeu (Duvenhage 4), o que não ocorreu após imunização com vacinas com vírus PM (Pitman Moore) e com a mesma

amostra viral. Os autores concluíram ainda, neste mesmo estudo, que embora as duas amostras de vírus (PV4 e PM) tenham a mesma origem do vírus isolado por Pasteur in 1882, suas glicoproteínas são diferentes frente a um painel de anticorpos monoclonais.

Em relação a amostras do vírus da raiva isoladas no Brasil, Zanetti et al. (1998), ao investigarem a proteção conferida por vacina com vírus PV concluíram que 94,4% dos camundongos sobreviveram ao desafio com o vírus CVS e 36,2% ao desafio com isolado de vírus proveniente de bovino. Cunha et al. (2000), também observaram falha na proteção de camundongos inoculados com vacina preparada com a amostra de vírus PV para uso animal e desafiados com amostras isoladas de bovinos. Vale lembrar que os isolados de bovinos são variantes do vírus do morcego hematófago. Portanto, os achados acima citados diferem dos resultados obtidos no presente estudo, no qual a vacina protegeu camundongos contra o desafio com isolado de *D. rotundus* (BR-DR1).

A continuação dos estudos de caracterização do vírus da raiva é importante para definir o grau de variabilidade nucleotídica e sua extensão, no sentido de identificar os reservatórios envolvidos na manutenção desta doença num determinado nicho ecológico. A situação pode ser definida como um processo de evolução continuada, pois, o fenômeno de *spill-over* do vírus da raiva pode, sob determinadas condições, determinar a adaptação do vírus no novo hospedeiro, resultando em nova relação hospedeiro-parasita (BADRANE; TORDO, 2001), originando inclusive um novo biotipo viral (FOOKS, 2004).

O isolamento do vírus da raiva de morcegos frugívoros do Estado de São Paulo, apresentando o mesmo perfil do vírus isolado de morcegos hematófagos é de fato, muito intrigante e preocupante. As medidas de controle da raiva em herbívoros, conforme o MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), 2005, visam apenas o controle de morcegos *D. rotundus*, com indicação do uso de pasta anticoagulante. Devido à complexidade do assunto, não sabemos exatamente como ocorre a transmissão do vírus da raiva de um

morcego hematófago a um morcego frugívoro, ou vice-versa. Há quase um século atrás, uma das contestações dos pesquisadores europeus contra as descobertas de Carini (1911) e de Haupt; Rehaag (1925), nos episódios de raiva no Estado de Santa Catarina, se referia justamente à identificação equivocada de um morcego frugívoro (*Artibeus lituratus*, na época *Phyllostoma superciliatum*) como sendo hematófago. O primeiro diagnóstico da raiva em um morcego não hematófago, em um morcego frugívoro *Artibeus planirostris* aconteceu em Trinidad, no Caribe Inglês (PAWAN, 1936). À luz dos conhecimentos atuais, quando técnicas moleculares e genéticas indicam a ocorrência de uma mesma variante nestas espécies de morcegos, pode-se inclusive imaginar que o morcego identificado por Haupt e Rehaag realmente se tratasse de um morcego frugívoro do gênero *Artibeus*.

As espécies de morcegos não hematófagos relatadas neste estudo têm hábitos sinantrópicos, ou seja, vivem próximas ao homem em meios urbanos onde se abrigam em árvores frutíferas e em vários tipos de construções. As amostras de vírus da raiva de morcegos não hematófagos estudadas foram todas provenientes de animais encontrados em condições de estreita relação com humanos ou animais de estimação (DADOS não publicados), o que implica em um grande risco de transmissão da doença. Estas observações indicam que a presença de morcegos frugívoros e insetívoros em ambiente urbano é um problema complexo com implicações econômicas, ecológicas e de saúde pública e necessita ser tratado por autoridades políticas e sanitárias para que medidas sejam adotadas para a prevenção da transmissão do vírus da raiva para animais e humanos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

Espécies de morcegos frugívoros e insetívoros compartilham o mesmo polimorfismo viral do vírus oriundo do morcego hematófago, indicando ter ocorrido um *spill-over* ou uma mudança de hospedeiro entre espécies de morcegos hematófagos e não hematófagos.

A caracterização genética de isolados do vírus da raiva de morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros revela a existência de variantes do vírus da raiva “espécie específica”, que circulam entre espécies de morcegos insetívoros.

Existe uma marcada diferença na patogenicidade das amostras de vírus da raiva, quando inoculadas pelas vias IC via IM em camundongos. Em geral, os camundongos foram pouco suscetíveis ao desafio pela via IM.

A vacina empregada protegeu os camundongos contra o desafio com as diferentes amostras testadas, sugerindo que as vacinas, usualmente utilizadas para a imunização de animais, são efetivas no tratamento profilático da raiva transmitida por morcegos.

REFERÊNCIAS

ALBAS, A.; ZOCCOLARO, P. T.; ROSA, T. Z.; LARA, M. C. C. S. H.; NASSAR, A. F. C.; CUNHA, E.M. S. Raiva em morcegos na região de Presidente Prudente, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.71 (supl.), p.235-236, 2004.

ARAI, Y. T.; YAMADA, K.; KAMEOKA, Y.; HORIMOTO, T.; YAMAMOTO, K.; YABE, S.; NAKAYAMA, M.; TASHIRO, M. Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variant using RT-PCR. **Archives of Virology**, v.142, p.1787-1796, 1997.

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 Disease**, v.9(3), p.333-337, 2003.

BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in *Lyssavirus* history from the chiroptera to the carnivore orders. **Journal of Virology**, v. 75, p. 8096-8104, 2001.

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

BAER, G. M. Evaluation of an animal rabies vaccine by use of two types of potency tests. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n. 8, p. 837-840, 1997.

BAER, G. M.; SANTHA, T. R.; BOURNE, G. H. Studies on pathogenesis of fixed rabies virus in rats. **Bulletin of the World Health Organization**, v.33, p. 783-794, 1965.

BAER, G. M.; SANTHA, T. R.; BOURNE, G. H. The pathogenesis of street rabies virus in rats. **Bulletin of the World Health Organization**, v.38, p. 119-125, 1968.

BERNARDI, F.; NADIN-DAVIS, S. A.; WANDELER, A. I.; ARMSTRONG, J.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S.; NOGUEIRA, F. R. B.; ITO, F. H. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 3153-3162, 2005.

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

BOURHY, H.; KISSI, B. TORDO, N. Molecular diversity of *Lyssavirus* genus. **Virology**, v.194, p.70-81, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros**. Manual Técnico. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2005.

BRASS, D.A. Rabies and rabies-related viruses of Africa. In: _____. **Rabies in bats. Natural history and public health implications**. Connecticut: Livia Press, 1994b, p. 263-273.¹

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. Ed. São Paulo:FMVZ – USP, 2003, 84 p.

BRASS, D.A. Prevalence and distribution of rabies in insectivorous bats. In: _____. **Rabies in bats. Natural history and public health implications**. Connecticut: Livia Press, 1994a, p. 131-162.

CARINI, A. Sur une grande épizootie de rage. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 25, p. 843-846, 1911.

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

CHILDS, J. E.; TRIMARCHI, C. V.; KREBS, J. W. The epidemiology of bats rabies in New York State, 1988-92. **Epidemiology Infection**. v.113, p.501-511, 1994.

CORRÊA, S. H. R.; PASSOS, E. C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M. E. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. 1. Ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 493-499.

COSELMANN, K. K.; COX, J. H.; SCHNEIDER, L. G.; THIEL, H. J. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B 19. **Virology**. v.175, p.485-499, 1990.

COULON, P.; TERNAUX, J. P.; FLAMAND, A.; TUFFEUREAU, 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.

CUNHA, E. M. S.; ACHKAR, S.; SOUZA, M. C. C.; SOUZA, M. C. A. M. Cross protection of mice against different rabies virus isolated in São Paulo, Brazil. In: Encontro Nacional de Virologia – Encontro de Virologia do Mercosul, XI., 2000, São Lourenço – MG, **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Virologia, 2000. p.170.

CUNHA, E. M. S.; SILVA, M. M. S.; SOUZA, M. C. C.; SOUZA, M. C. A. M.; CASTRO, A.F.; SCHYMONSKY, B. Bat rabies in northwestern São Paulo state from 1997 to 2000. In: Encontro Nacional de Virologia – Encontro de Virologia do Mercosul, XII., 2001, Caldas Novas – GO, **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Virologia, 2001. p.177.

DE MATTOS, C. C.; DE MATTOS, C. A.; LOZA-RUBIO, E.; AGUILAR SETIEN, A.; ORCIARI, L. A.; SMITH, J. S. Molecular characterization of rabies virus isolates from México: implications for transmission dynamics and humans risk. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**.v.61, p.587-597, 1999.

DE MATTOS, C. A.; DE MATTOS, C. C.; SMITH, J.S.; MILLER, E. T.; PAPO, S.; UTRERA, A.; OSBURN, B. I. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**. v.34(6), p.1553-1558, 1996

DEAN, D. J.; ALBELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowsky H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-95.

DELPIETRO, H. A.; GURY-DHOMEN, F.; LARGHI, O. P.; MENA-SEGURA, C.; ABRAMO, L. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v.44, p.477-483, 1977.

DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C. E.; TOLLIS, M.; LAFON, M.; MATTEI, J.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKY, H. Antigenic diversity of glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control rabies. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, supplement 4, p. 785-789, 1988.

DIETZSCHOLD, B.; WANG, H.; RUPPRECHT, C. E.; CELIS, E.; TOLLIS, M.; ERTL, H.; HEBER-KATZ, E.; KOPROWSKY, H. Induction of protective immunity against rabies virus immunization with rabies nucleoprotein.. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, p.9165-9169, 1987.

DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W. H.; WIKTOR, T. J.; LOPES, A. D.; LAFON, M.; SMITH, C. L.; KOPROWSKY, 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.

ESDALL, G. Aspectos técnicos de los programas de vacunación. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.66, p.305-408, 1969.

ENG, T. R.; FISHBEIN, D. B. Epidemiologic factors, clinical findings, and vaccination status of rabies in cats and dogs in the United States in 1998. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.197, p. 201-209, 1990.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy: The eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press; 2004. 1162 pp.

FAVI, M. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n.1, p. 79-81, 2002.

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

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C.C.; MORAIS, N.B.; ARAÚJO, F. A. A.; DE MATTOS, C.A. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n.5, 2001.

FEKADU, M.; SHADDOCK, D. W.; SANDERLIN, J. S.; SMITH, J. S. Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies and rabies related viruses. **Vaccine**, v.6, p.533-539, 1988.

FLAMAND, A.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. **Journal of General Virology**, v.48, p.97-104, 1980a.

FLAMAND, A.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. II. The glycoprotein. **Journal of General Virology**, v.48, p.105-109, 1980b.

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

FRASER, G. C.; HOOPER, P. T.; LUNT, R. A; GOULD, A. R.; GLEESON, L. J.; HYATT, A. D.; RUSSEL, G. M.; KATTENBELT, J. A. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. **Emerging Infectious Disease**, v.2, p.327-331, 1996.

GERMANO, P. M. L.; SILVA, E. V.; SILVA, E. V.; MIGUEL, O. M.; SUREAU, P. Variantes antigénicas del virus de la rabia aisladas en el nordeste y sudeste del Brasil. Estudio preliminar. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.108, p.39-44, 1990.

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

GOMES, A. A. B. Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil. 2004. 107f. tese (Doutorado em Medicina veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-14012005-104243/publico/Alberio.pdf>>. Acesso em: 02 agosto 2005.

GOMES, F. J. P. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva – Relatório Preliminar. **Arquivos de Biologia Tecnológica**, v.28, n.2, p.165-175, 1985.

GOTO, H.; MINAMOTO, N; SUGIYAMA, M.; KINJO, T. MANNEN, K.; KAWAI, A. Nucleotide sequence of the nucleoprotein gene of the RC.HL strain of rabies virus, a seed strain used for animal vaccine production in Japan. **Virus genes**. v.8(2), p.91-97, 1994.

GAUDIN, Y.; TUFFEREAU, C.; SEGRETAINE, D.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**. v .65, p.4853-4859, 1991.

HANNA, J. N.; Carney, I. K.; Smith, G.A.; Tannenberg, A. E. G.; Deverill, J. E.; Botha, J. A.; Serafin, I. L.; Harrower, B. J.; Fitzpatrick, P. F.; Searle, J. W. Australian bat lyssavirus infection: a second human case, with a long incubation period. **The Medical Journal of Australia**. v. 172, p. 597-599, 2000.

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

HAYASHI, Y.; MORA, E.; CHANDELIER, E.L.; MONTAÑO, J.A. & OHI, M. Estudos de proteção cruzada de 24 amostras de vírus rábico isoladas de diferentes espécimes animais no Brasil. **Arquivos de Biologia Tecnológica**, v.27, p.27-35, 1984.

- HOOPER, D. C.; MORIMOTO, K.; BETTE, M.; WEIHE, E.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. **Journal of Virology**, v.72, n.5, p.3711-3719, 1998.
- ITO, M.; ARAI, Y. T.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; TAKASAKI, T.; KURANET, I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolation in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v.284, p.214-222, 2001.
- ITO, N.; SUGIYAMA, M.; ORAVEERAKUL, K.; PIYAVIRIYAKUL, P.; LUMLERTDACHA, B.; ARAI, Y. T.; TAMURA, Y.; MORI, Y.; MINAMOTO, N. Molecular epidemiology of rabies in Thailand. **Microbiology and Immunology**, v.43(6), p.551-559, 1999.
- KING, A. A.; MERDITH, C. D.; THOMSON, G.R. Canid and viverrid rabies viruses in South Africa. *Journal of Veterinary Research*, v.60, p.295-299, 1993.
- KOPROWSKY, H. Routine laboratory procedures: The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 80-87.
- KREBS, J. W.; NOLL, H. R.; RUPPRECHT, C. E.; CHILDS, J. E. Rabies surveillance in the United States during 2001. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.221, n.12, p.1690-1710, 2002.
- KUZMIN, I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T.; SMITH, J. S.; HANLON, C. A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C. E. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. **Virus Research**, v.97(2), p.65-79, 2003.
- LAFON, M. Immunology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002, p. 351-369.
- LAFON, M.; BOURHY, H.; SUREAU, P. Immunity against the European bat rabies (Duvenhage) virus induced by rabies vaccines: an experimental study in mice. **Vaccine**, v.6, p.362-368, 1988.
- LAFON, M.; LAFAGE, M.; MARTINEZ-AREND, A.; RAMIREZ, R.; VUILLIER, F.; CHARRON, D.; LOTTEAU, V.; SCOTT-ALGARA, D. Evidence for a viral superantigen in humans. **Nature**, v.3, p.6403-6423, 1992.
- LAWSON, K. F.; HERTLER, R.; CHARLTON, K. M.; CAMPBELL, J. B.; RHODES, A. J. Safety and immunogenicity of ERA strain of rabies virus propagated in a BHK-21 cell line. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.53, p.438-444, 1989.
- LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G. H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v.226, p.847-848, 1982.
- LODMEL, D. L.; SMITH, J. S.; ESPOSITO, J. J.; EWALT, L. C. Cross-protection of mice against a global spectrum of rabies virus variants. **Journal of Virology**, v. 69, n. 8, p. 4957-4962, 1995.

LODMEL, D. L.; SUMMER, J. W.; ESPOSITO, J. J.; BELLINI, W. J.; EWALT, L. C. Raccoon poxvirus recombinant expressing the rabies virus nucleoprotein protects mice against lethal rabies virus infection. **Journal of Virology**, v. 65, p. 3400-3405, 1991.

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.

MARTORELLI, L. F. A.; FAVORETTO, S. R.; SACRAMENTO, D. R.V.; ALMEIDA, M. M. S.; CUNHA, E. M. S.; DURIGON, E. L. genetic and antigenic characterization of rabies virus isolated from insectivorous bats, *Nyctinomops sp.* In: Encontro Nacional de Virologia – Encontro de Virologia do Mercosul, XV., 2004, São Pedro, **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Virologia, 2004. p.214.

MARTORELLI, L. F. A.; AGUIAR, E. A. C.; ALMEIDA, M. F.; SILVA, M. M. S.; NUNES, V.F.P. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Lasiurus borealis*. **Revista Saúde de Pública**, v.30, n.1, p.101-102, 1996.

MCQUISTON, J. H.; YAGER, P. A.; SMITH, J. S.; RUPPERCHT, C. E. Epidemiology of rabies in dogs and cats in the United States during 1999. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.218, p.1939-1942, 2001.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Nota técnica de 11/11/2005. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs/destaques/raiva.htm>>. Acesso em: 08 março 2006.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D.C.; SPITSIN, S.; KOPROWSKI, H.; DIESTZSCHOLD, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. **Journal of Virology**. v.73(1), p.510-518, 1999.

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

MURPHY, F.A.; BAUER, S. P.; HARRISON, A. K.; WINN, J. R. W.C. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. **Laboratory Investigation**, v. 28, p. 361-376, 1973a.

MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K.; WINN, W.C.; BAUER, S. P. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. **Laboratory Investigation**, 29: 1-16, 1973b.

NADIN-DAVIS, S. A.; ABDEL-MALIK, M.; ARMSTRONG, J.; WANDELER, A. I. Lyssavirus P gene characterization provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. **Virology**, v. 298, p. 286-305, 2002.

NADIN-DAVIS, S. A.; HUANG, W.; AMSTRONG, J.; CASEY, G. A.; BAHLOUL, C.; TORDO, N.; WANDELER, A. I. Antigenic and genetic divergence of rabies viruses from bat species indigenous to Canada. **Virus Research**, v.74, p.139-156, 2001.

NATHAWANI, D.; MCINTYRE, P. G.; WHITE, K.; SHEARER, A. J.; REYNOLDS, N.; WALKER, D.; ORANGE, G. V.; FOOKS, A. R. Fatal human rabies caused by European bat Lyssavirus type 2a infection in Scotland. **Clinical Infectious Disease**, v.37, n.4, p. 598-601, 2003.

NEL, L. H.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; MORRIL, P. A.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C.E. A comparison of DNA vaccines for the rabies-related virus, Mokola. **Vaccine**, v.21, p. 2598-2606, 2003.

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

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas**, v.33, 2001, 41p.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. EER Noticias Semanales: Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas. Rabia humana transmitida por murciélagos en el estado de Pará, Brasil **Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes**, v.2(13), p.1-5, 2004. Disponível em: <<http://www.paho.org>> Acesso em: 15 abril 2004.

PAGE, R. A. M. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Application in the Biosciences**, v.12, p.357-358, 1996.

PASSOS, E. C.; CARRIERI, M. L.; DAINOVSKAS, E.; CAMARA, M.; SILVA, M. M. S. Isolamento do vírus rábico em morcego insetívoro, *Nyctinomops macrotis*, no município de Diadema, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n.1, p. 74-76, 1998.

PAWAN, J.L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 30, p.101-130, 1936.

PERRIN, P.; DE FRANCO, T.; JALLET, C.; FOUQUE, F.; MORGEAUX, S.; TORDO, N.; COLLE, J.H. The antigen-specific cell-mediated immune response in mice is suppressed by infection with pathogenic lyssaviruses. **Research of Virology**, v.147, p.289-299, 1996.

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

PREHAUD, C.; LAY, S.; DIETZSCHOLD, B.; LAFON, M. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. **Journal of Virology**, v.77, p.10537-10547, 2003.

QUEIROZ DA SILVA, L.H.; CUNHA, E. M. S.; PEDRO, W. A.; CARDOSO, T. C.; SOUZA, M. C. C. S.; FERRARI, C. I. L. Isolamento do vírus rábico em *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae) no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n.6, p. 626-628, 1999.

QUEIROZ LIMA, E. A transmissão da raiva bovina pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*. **Brasil Médico**, v.48, p.38-40, 1934.

REAGAN, K. J.; WUNNER, W. H. Rabies virus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor: brief report. **Archives of virology**, 84: 277-282, 1985.

REED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v.27, n.3, p. 151-190, 1938.

RUPPRECHT, C. E.; GLICKMAN, L. T.; SPENCER, P. A.; WIKTOR, T. J. Epidemiology of rabies virus variants: differentiation using monoclonal antibodies and discriminant analysis. **American Journal of Epidemiology**, v.126, p.298-309, 1987.

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

SACRAMENTO, D.R.V., TORDO, N.; KOTAIT, I. Estudo molecular de amostras do vírus da raiva, isoladas no Estado de São Paulo. In: Reunião Anual do Instituto Biológico (RAIB), 7., 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo. 1994. p.15.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National. Academy Sciences of the United States of America**, v. 74(12), p.5463-7, 1977.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenação dos Institutos de Pesquisa. Instituto Pasteur. Manual Técnico do Instituto Pasteur. **Controle da raiva nos herbívoros**, 1998. Manuais, 1.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenação dos Institutos de Pesquisa. Instituto Pasteur. Manual Técnico do Instituto Pasteur. **Vacinação contra a raiva de cães e gatos**, 1999. Manuais, 3.

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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 7, 747-753, 2004

SCHNEIDER, L. G.; MEYER, S. Antigenic determination of rabies virus as demonstrated by monoclonal antibody. In: BISHOP, D. H. L.; COMPANS, R. W. **The replication of negative strand viruses**. Amsterdam: Elsevier, 1981, p.947-953.

SCHNEIDER, M. C. Epidemiological situation of human rabies transmitted by bats in Brazil. In: **Expert consultation on the care of persons exposed to rabies transmitted by vampire bats**. PAHO/WHO. Programs for veterinary public health. Washington. D.C. April 1-5, 1991.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; CUNHA, E. M. S.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. B. C.; NOCITTI, D. P.; ITO, F. H.; KURANE, I.; SAKAI, T. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus* spp.) in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 10, 1271-1273, 2004.

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

SIKES, R. K. Present status of animal and human rabies vaccination. In: World Veterinary Congress, 19., 1971, Mexico. **Anais...** v.1, p. 36-47, 1971.

SILVA, R. A.; RIVELLO, G. V.; NILSSON, M. R. Isolamento do vírus rábico de morcego não hematófago da espécie *Phyllostomus hastatus hastatus* (Pallas). **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**, Rio de Janeiro, v.4, p.115-120, 1961.

SMITH, J. Mouse model for abortive rabies infection of the central nervous system. **Infection and Immunity**, v.31, p.297-308, 1981.

SMITH, J. S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiology Review**, v. 9, n. 2, p. 166-176, 1996.

SMITH, J. S. Rabies virus epitopic variation: use in ecologic studies. **Advanced Virus Research**, v. 36, p. 215-253, 1989.

SMITH, J. S.; ORCIARI, L. A.; YAGER, P. A.; SEIDEL, H. D.; WARNER, C. K. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. **Journal of Infectious Diseases**, v.166, p. 296-307, 1992.

SMITH, J. S.; REID-SANDEN, F. L.; ROUMILLAT, L. F.; TRIMARCHI, C.; CLARK, K.; BAER, G.; WINKLER, W.G. Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.24, p.573-580, 1986.

SMITH, J. S.; SUMMER, J. W.; ROUMILLAT, L. F.; BAER, G.; WINKLER, W. G. Antigenic characteristics of isolates associated with a new epizootic of raccoon rabies in United States. **Journal of Infectious Disease**, v.149, p.769-774, 1984.

SMITH, J. S. Molecular Epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002, p. 79-111.

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

SUREAU, P.; ARELLANO, C. Epizootiologia de la rabia paralítica bovina. In: **19th World Veterinary : papers and Short Communications**, Mexico, v.1, p. 28-31, 1971.

SUREAU, P.; ROLLIN, P.; WIKTOR, T. J. Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: detection by monoclonal antibodies. **American Journal of Epidemiology**, v.117, p.605-609, 1983.

TADDEI, V. A.; NOBILE, C. A.; VERSUTE, E. M. Distribuição Geográfica e Análise Morfométrica Comparativa em *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). **Ensaio e Ciência**, v.2, p.71-127, 1998.

TAKAOKA, N.Y. Considerações sobre a raiva humana transmitida por quirópteros no Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto Pasteur**, São Paulo, v.1, n.2, p. 59-61, 1996.

TAKAYAMA-ITO, M.; ITO, N.; YAMADA, K.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N.; Multiple amino acids in the glycoprotein of rabies virus as responsible for pathogenicity in adult mice. **Virus Research**, v.115, p.169-175, 2006.

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

THOULOZE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7181-7190, 1998.

THOULOZE, M. I.; LAFAGE, M.; YUSTE, V. J.; KROEMER, G.; SUSIN, S. A. ISRAEL, N. LAFON, M. Apoptosis inversely correlated with rabies virus neurotropism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1010, p.598-603, 2003.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of rabies virus. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p.28-51.

TORDO, N.; BOURHY, H.; SATHER, S.; OLLO, R. Structure and expression in baculovirus of the Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine. **Virology**, v.194, p.59-69, 1993.

TORRES, S.; QUEIROZ LIMA, E. A raiva nos morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus murinus*). **Revista do Departamento Nacional de Produção Animal**, Rio de Janeiro, v.2, n.4-6, p.385-406, 1935.

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

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

UIEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOMES, L.H.; SILVA, M.M.S. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**, São Paulo, v.1,n.2, p.17-35, 1996.

VAN TEICHMAN, B. F.; DE KOKER, W. C.; BOSH, S. J.; BISHOP, G. C; MEREDITH, C. D.; BINGHAM, J. Mokola virus infection: description of recent South Africa cases and review of the virus epidemiology. **Journal of the South African Veterinary Association**. v.69, p.169-171, 1998.

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

WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization; detection of antigenic variants. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v.75, p. 3938-3942, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World survey of rabies**, no. 35 – For the year 1999 – Diseases surveillance and control. WHO/EMC/ZDI/98.4, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies**. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/>>. Acesso em: 13 junho 2005.

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

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.