ANGÉLICA CRISTINE DE ALMEIDA CAMPOS

ESTUDO GENÉTICO DA VARIANTE DO VÍRUS DA
RAIVA MANTIDA POR POPULAÇÕES DO
MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2011

ANGÉLICA CRISTINE DE ALMEIDA CAMPOS

ESTUDO GENÉTICO DA VARIANTE DO VÍRUS DA
RAIVA MANTIDA POR POPULAÇÕES DO MORCEGO
HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Dr^a Silvana Regina Favoretto Lazarini

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Campos, Angélica Cristine de Almeida.

Estudo genético da variante do vírus da raiva mantida por populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* / Angélica Cristine de Almeida Campos. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Silvana Regina Favoretto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Estudo epidemiológico e genético do vírus da raiva.

Versão do título para o inglês: Genetic study of rabies virus variant maintained by hematophagous bats *Desmodus rotundus* populations

Descritores: 1. Vírus da raiva 2. Morcegos (*Desmodus rotundus*) 3. Genomas 4. Sequenciamento genético 5. Genética 6. Filogenia (análise) I. Favoretto, Silvana Regina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB036/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Angélica Cristine de Almeida Campos.

Título da Tese: Estudo genético da variante do vírus da raiva mantida por populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* .

Orientador(a): Silvana Regina Favoretto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **48** nas fls. **73** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Silvana Regina Favoretto Lazarini, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo genético da variante do vírus da raiva mantida por populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* por meio do sequenciamento completo do genoma viral** do qual participou(aram) o(s) alunos **Angélica Cristine de Almeida Campos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **29.06.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 30 de junho de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

**Dedico este trabalho aos grupos de pesquisa e vigilância do vírus da raiva,
para que um dia esta doença possa ser mantida sob controle em todo o mundo e que a
prevenção não permita que tantas pessoas e outros animais ainda morram aos milhares.**

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é um ato aparentemente simples, mas de uma grandeza incomensurável”.

A vida, em sua maestria de complexa diversidade.

A Dr^a Silvana Regina Favoretto por aceitar que eu fosse membro do Núcleo de Pesquisas em Raiva e ser a mentora deste trabalho, orientando, ensinando, partilhando todo o conhecimento que detém além de me receber dentro de sua família. Muito obrigada!

A minha família que me apoiou desde o primeiro momento quando optei pela Biologia. Meus pais, em especial minha mãe, Marlene, exemplo de vida, meus irmãos Aline Bethânia e Adilson Jr e meu sobrinho lindo, benção em forma de criança que tornou nossas vidas mais alegres com a sua chegada.

Ao meu amado Luiz Gustavo, um furacão que entrou em minha vida, companheiro de todos os momentos, obrigada pelo amor, carinho, apoio e muita paciência. Te Amo!

Ao Prof. Dr Edison Luiz Durigon por ceder a estrutura laboratorial e à Dr^a Danielle Bruna Leal por me abrir as portas do mundo da pesquisa.

Às raivosas, Danielle Bastos, Camila Seabra, Dr^a Débora Sacramento, Dr^a Elenice Cunha, Dr^a Luzia Martorelli, Dr^a Luzia Queiroz, Dr^a Marilene Almeida e Dr^a Ana Paula Kataoka, componentes do Núcleo de Pesquisas em Raiva.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (desculpem quem eu esqueci o nome): Ju Rodrigues, Claudinha, Dyana, Ariane, Carolzinha, Raquel, Priscila, Luc Thomazelli, Érika, Danila, Misa, Marina, Zezinho, Renatinha, Tati Ometto e Jansen.

Aos mais que amigos do Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, muito obrigada pelo auxílio técnico e pelas risadas nas horas que eu mais precisava: Camila Romano, Fernando Melo (Frank), Átila, Ju Velasco, Carla, Motoki e mais recentemente Julian e Dani.

As Dr^{as} Malu e Vivi pelas conversas, explicações, correções, puxões de orelha, almoços e muitas risadas.

Às Famílias Góes e Bentim por me acolherem em seu seio, pelos finais de semana, pelo apoio e principalmente por me presentear com o meu amado Gustavo.

Aos professores pelas conversas nos corredores do ICB, que muitas vezes iluminou idéias obscuras: Prof. Zanotto, Prof^a Charlotte, Prof^a Dolores, Telma (mais que professora), Prof. Enrique, Prof. Althertun, Prof. Menck, Prof^a Heloísa Barbosa, Prof^a Marilis.

Aos funcionários da secretaria do Programa Interunidades em Biotecnologia Eliane, Fábila e Marcos. E aos funcionários do ICB Alice, Aninha, Naíde, Carlos, Romeu, pessoal da Faísca.

As agências CAPES pela bolsa de doutorado e FAPESP pelo auxílio à pesquisa que financiou esta Tese.

Aos morcegos e aos vírus.

“ – Mãe!? Para que serve uma Tese?

– Uma Tese? Bem uma Tese é como um livro,
a organização de resultados e conclusões de uma pesquisa.

Este livro fica na biblioteca da Universidade
disponível para consultas, para que todos
os alunos possam ter acesso aos dados da pesquisa.

– Ah, e todos consultam a Tese de graça?

– É. A Tese é pública.

– E NÃO SERVE NEM PRÁ VENDER?!?!”

Henrique Favoretto Lazarini
Agosto de 2006 aos 9 anos de idade

RESUMO

Campos ACA. Estudo genético da variante do vírus da raiva mantida por populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) mostram que a raiva é um problema de saúde pública podendo acarretar sérios prejuízos ambientais e econômicos, a despeito da existência de vacinas eficazes de uso humano e veterinário. Segundo seu último informe, estima-se que no mundo em torno de 55.000 pessoas por ano morrem de raiva. O cão permanece como principal transmissor da raiva para o homem e também como principal vítima da doença. Nos países que conseguiram controlar a raiva em animais domésticos, o vírus se mantém circulante na natureza por meio dos animais silvestres, sendo os morcegos apontados como a segunda espécie transmissora da raiva a humanos. Os *lyssavirus* têm sido detectados em morcegos, em diversos continentes, sendo identificados como transmissor em dez das onze espécies de *lyssavirus*. Fósseis de morcego mostram sua presença há 50 milhões de anos. Mas somente em 1911, Carini relacionou pela primeira vez a raiva aos morcegos, levantando a hipótese destes serem os transmissores da doença a outros animais. Há registros de que o vírus da raiva foi isolado em pelo menos 41 das 167 espécies de morcegos brasileiras, sendo que a maioria dessas espécies está relacionada a atividades humanas com a presença destes animais próximos ao local de trabalho e moradia das pessoas. Os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são encontrados do norte do México até a costa norte do Chile, região central da Argentina e costa do Uruguai e com exceção do Chile. Esta espécie de morcego tem sido apontada como reservatório natural do vírus da raiva nesta região. Alguns pesquisadores observaram que a raiva em morcegos não hematófagos precede a raiva bovina e em animais de estimação, sugerindo que os morcegos não hematófagos podem ser o elo entre a raiva silvestre e a raiva urbana e o fato de se detectar a variante mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* em cães e gatos mostra que o papel deste morcego no ciclo da raiva não está limitado à raiva silvestre. As características dos *lyssavirus* adaptados a morcegos têm mostrado diferenças quando comparadas à raiva relacionada aos carnívoros, confirmando a necessidade do desenvolvimento de metodologias que permitam estudos complementares mais precisos a respeito da biologia e epidemiologia da raiva em quirópteros. A escassez de dados na literatura, até o momento, a respeito do genoma completo da variante

do vírus da raiva mantida por populações de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, deixa uma lacuna no entendimento da epidemiologia molecular deste vírus. A importância epidemiológica desta espécie na transmissão da raiva é inquestionável. Neste estudo foi sequenciado e analisado, o genoma da variante do vírus da raiva mantido por populações de morcego hematófago *Desmodus rotundus* isolado de um morcego hematófago *Desmodus rotundus*. A amostra, procedente de área endêmica no Estado de São Paulo, foi filogeneticamente comparada com o genoma da amostra padrão para a espécie viral 1 – *Rabies virus* e outras amostras pertencentes ao ciclo aéreo ou terrestre de transmissão, disponíveis no *GenBank*, identificando possíveis padrões de diferenciação, próprios do ciclo aéreo, e em alguns casos relacionados somente à variante estudada.

Palavras chave: Vírus da raiva. *Desmodus rotundus*. Sequenciamento. Genoma viral. Estudo genético.

ABSTRACT

Campos ACA. Genetic study from rabies vírus variant maintained by hematophagous bats *Desmodus rotundus* population [Ph. D. Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Data from the World Health Organization (WHO) show that rabies is a public health problem which can cause serious environmental and economic damage, despite the existence of effective vaccines for human and veterinary use. According to WHO latest report, estimated that worldwide around 55,000 people per year died of rabies. The dog remains the main transmitter of rabies to humans as well as the main victim of the disease. In countries that were successful in controlling rabies in domestic animals, the virus is still circulating in nature by wild animals and the bats are seen as the second species transmitting rabies to humans.

The lyssavirus have been detected in bats in several continents and is identified as a transmitter in ten of eleven species of lyssavirus. Bat fossils show their presence for 50 million years. But only in 1911, in the first time Carini related to rabies at bats, raising the possibility of these being the transmitters of the disease to other animals. Reports show that the rabies virus was isolated in at least 41 of the 167 species of bats in Brazil, with the majority of these species is related to human activities with the animals living near the local job and houses of people. The vampire bat *Desmodus rotundus* is found from northern Mexico to northern Chile coast, central coast of Argentina and Uruguay and with the exception of Chile. This bat species has been identified as a natural reservoir of the rabies virus in this region. Some researchers observed that rabies into non-hematophagous bats precedes the bovine rabies and in pets, suggesting that the non-hematophagous bats may be the link between wildlife rabies and urban rabies and the fact that detect the variant maintained by vampire bats *Desmodus rotundus* in dogs and cats shows that the role of bat rabies in the cycle is not limited to wildlife rabies. The characteristics of lyssavirus bat adapted have been shown differences when compared to rabies related to the carnivores, confirming the need to develop methods that enable more accurate follow-up studies about the biology and epidemiology of rabies in bats. The paucity of data in the literature to date about the complete genome of the rabies virus variant maintained by populations of vampire bats *Desmodus rotundus* leaves a gap in understanding the molecular epidemiology of this virus and the epidemiological importance of this species in the transmission of rabies virus is unquestionable. In this study we sequenced and analyzed the genome of the rabies virus

variant maintained by populations of bat *Desmodus rotundus* isolated from a bat *Desmodus rotundus*. The sample, coming from an endemic area in São Paulo, was phylogenetically compared with the genome of the standard sample for species 1 – *Rabies virus* and other samples belonging to the Terrestrial and Aerial cycles of transmission, available in GenBank, to identify possible patterns of differentiating themselves Aerial cycle and in some cases linked only to variant studied.

Key words: Rabies virus. *Desmodus rotundus*. Sequencing. Viral genome. Genetic study.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa das áreas de risco para o vírus da raiva no mundo	25
Figura 2. Desenho esquemático do Vírus da Raiva.....	27
Figura 3. Desenho esquemático do mapa genômico (a) e replicação do Vírus da Raiva (b)	29
Figura 4. Morcego hematófago <i>Desmodus rotundus</i>	31
Figura 5. Visualização da quantificação de RNA para as amostras brdrusp100/07 e brbvusp01/06.	48
Figura 6. Esquema da organização do genoma do Vírus da Raiva e representação da cauda Poli-A.....	51
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para nucleoproteína com a amostra controle brbvusp01/06.	51
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fosfoproteína e proteína de matriz.	52
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para núcleo e glicoproteínas com a amostra controle brbvusp01/06	53
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para glicoproteína da amostra brbvusp01/06....	53
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.	54
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5% fragmentos da polimerase viral.	55
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral	56
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de um gradiente de temperatura para a amostra controle brbvusp01/06.....	56
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.	57
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.	58
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.	58
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.	59
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação do genoma completo.....	60
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 1,0% da amplificação do genoma completo.....	61
Figura 21. Visualização da quantificação de DNA	62
Figura 22. Visualização da quantificação de DNA para a amostra brbvusp01/06.....	62
Figura 23. Ilustração comparativa do sítio antigênico I na região carboxi terminal da nucleoproteína N.	63
Figura 24. Ilustração comparativa dos sítios antigênicos localizados na glicoproteína G.....	63

Figura 25. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para nucleoproteína (parcial).....	64
Figura 26. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para nucleoproteína.....	66
Figura 27. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para nucleoproteína.....	67
Figura 28a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 377 da nucleoproteína.	69
Figura 28b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 379 da nucleoproteína.	69
Figura 28c. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 433 da nucleoproteína.	70
Figura 29. Gráfico com frequência de aminoácidos na nucleoproteína.	71
Figura 30. Gráfico de substituição de aminoácidos na nucleoproteína.	71
Figura 31. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a fosfoproteína.....	73
Figura 32. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a fosfoproteína.....	74
Figura 33a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 68 da fosfoproteína.	75
Figura 33b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 112 da fosfoproteína. ..	75
Figura 34. Gráfico com frequência de aminoácidos na fosfoproteína.....	76
Figura 35. Gráfico de substituição de aminoácidos na fosfoproteína.	76
Figura 36. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para proteína de matriz.....	77
Figura 37. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para proteína de matriz.....	78
Figura 38a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 82 da proteína de matriz.	80
Figura 38b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 148 da proteína de matriz.	80
Figura 38c. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 184 da proteína de matriz.....	81
Figura 39. Gráfico com frequência de aminoácidos na proteína de matriz.	81
Figura 40. Gráfico de substituições de aminoácidos na proteína de matriz.	82
Figura 41. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para glicoproteína.	83
Figura 42. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para glicoproteína.....	84
Figura 43a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 213 da glicoproteína. ..	86
Figura 43b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 367 da glicoproteína. ..	87
Figura 43c. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 475 da glicoproteína....	87
Figura 43d. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 478 da glicoproteína. ..	88
Figura 44. Gráfico com frequência de aminoácidos na glicoproteína.	88
Figura 45. Gráfico de substituição de aminoácidos na glicoproteína.	89

Figura 46. Esquema das regiões sequenciadas para a polimerase viral.....	90
Figura 47. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	90
Figura 48. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	91
Figura 49. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	92
Figura 50. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	93
Figura 51. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	94
Figura 52. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	95
Figura 53. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	96
Figura 54. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	97
Figura 55. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	98
Figura 56. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	99
Figura 57. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	100
Figura 58. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	101
Figura 59. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	102
Figura 60. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	103
Figura 61. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	104
Figura 62. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	105
Figura 63. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	106
Figura 64. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.....	107
Figura 65a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 8 da polimerase viral.	111
Figura 65b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 645 da polimerase.	112
Figura 65c. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 27 da polimerase.	112
Figura 65d. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 1487 da polimerase. ..	113
Figura 65e. Ilustração gerada pelo programa MacClade, no resíduo 88 da polimerase.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos primers utilizados nas reações de RT/PCR e Sequenciamento para a nucleoproteína.	43
Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de genes do vírus da raiva.....	49
Tabela 3 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína N.....	68
Tabela 5 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína M.....	79
Tabela 6 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína G.....	85
Tabela 7 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína L	108
Tabela 8 - Regiões com mais de sete resíduos de aminoácidos conservados entre as amostras estudadas e a amostra de referência PV - proteína L	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL – Lissavirus do morcego australiano (do inglês *Australian Bat Lyssavirus*)

ARAV – Aravan vírus

BHK-21– linhagem celular (do inglês *Baby Hamster Kidney*)

brbvusp01/06 – amostra do vírus da raiva isolada de um Bovino

brdrusp100/07 – amostra do vírus da raiva isolada de um morcego hematófago *Desmodus rotundus*

cDNA – fita complementar ao DNA

CDC – Centro de Controle de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

DEPC – Dimetilpirocarbonato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Desoxy Nucleic Acid*)

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DUVV – Duvenhage vírus

EBLV – Lissavirus do morcego europeu (do inglês *European Bat Lyssavirus*)

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EMEM – Meio de crescimento (do inglês *Eagle's Minimum Essential Medium*)

GARLi – Programa de análises filogenéticas (do inglês *Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference*)

ICB II-USP – Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo

IRKV – Irkut vírus

KHUV – Khujand vírus

LBV – Vírus do morcego de Lagos (do inglês *Lagos bat virus*)

MEGA – Programa de análises (do inglês *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software*)

MMLV – Enzima para transcrição (do inglês *Moloney-Murine Leukemia Virus*)

MOKV – Mokola vírus

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês *National Center for Biotechnology Information*)

OPAS – Organização Panamericana de Saúde

PAHO – Organização Panamericana de Saúde (do inglês *Panamerican Health Organization*)

PCR – Reação em cadeia pela polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

pH – Potencial Hidrogeniônico

PV – Vírus Pasteur (do inglês *Pasteur virus*)

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

RABV – Vírus da Raiva (do inglês *Rabies virus*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *Ribo Nucleic Acid*)

RNP – Ribonucleoproteína

RT-PCR – Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição

RV – Vírus da Raiva (do inglês *Rabies virus*)

SFB – Soro Fetal Bovino

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

WCBV – Vírus do morcego caucasiano do oeste (do inglês *West Caucasian bat virus*)

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

Aminoácidos

A – Ala – Alanina

C – Cys – Cisteína

D – Asp – Ácido Aspártico

E – Glu – Ácido Glutâmico

F – Phe – Fenilalanina

G – Gly – Glicina

H – His – Histidina

I – Ile – Isoleucina

K – Lys – Lisina

L – Leu – Leucina

M – Met – Metionina

N – Asn – Asparagina

P – Pro – Prolina

Q – Gln – Glutamina

R – Arg – Arginina

S – Ser – Serina

T – Thr – Treonina

V – Val – Valina

Y – Tyr – Tirosina

W – Trp – Triptofano

Bases Nitrogenadas dos Nucleotídeos

A – Adenina

C – Citosina

G – Guanina

T – Timina

Fórmulas

Ca^{++} – íons cálcio

H_3BO_3 – Ácido Bórico

DTT – Ditionitrotol

H_2O – Água

KCl – Cloreto de Potássio

Mg^{++} – íons magnésio

MgCl_2 – Cloreto de Magnésio

Tris-HCl – Tris (hidroximetil) aminometano

Símbolos

Ψ - Psi, indica a região do genoma viral chamada de Pseudogene situada entre a glicoproteína e a polimerase viral .

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Genoma viral.....	28
2.2 Os morcegos e o vírus da Raiva	30
3 OBJETIVOS	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Amostras.....	38
4.2 Imunofluorescência Indireta.....	39
4.3 Cultivo Celular	39
4.4 Descrição dos Oligonucleotídeos Iniciadores (<i>primers</i>).....	40
4.5 Extração do RNA Total.....	40
4.6 Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição (RT-PCR)	41
4.6.1 Transcrição Reversa (RT-PCR)	41
4.6.2 Amplificação (PCR)	43
4.7 Detecção por Eletroforese dos Produtos Amplificados.....	44
4.8 Purificação da Reação de Amplificação	45
4.9 Reação de Sequenciamento	45
4.9.1 Purificação da reação de sequenciamento	46
4.9.2 Processamento e alinhamento das sequências dos genes N, P, M, G e L do vírus da raiva.....	47
4.10 Análise Genealógica	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Imunofluorescência Indireta e Cultivo Celular.....	48
5.2 Desenho de <i>Primers</i> e Quantificação do RNA viral.....	48
5.3 Síntese de cDNA e Amplificação Viral	50
5.4 Quantificação e Sequenciamento	61
5.5 Análises Genealógicas	63
6 DISCUSSÃO	116
7 CONCLUSÕES.....	131
REFERÊNCIAS*	132
ANEXOS	149
ANEXO A – Sequências utilizadas nas análises filogenéticas dos genes N, P, M, G e L	149
ANEXO B – Artigo enviado para publicação no <i>Journal of Virological Methods</i>	161
ANEXO C – Premiação - Menção Honrosa	181

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença letal conhecida desde a antiguidade, com relatos no Código de Eshnunna cerca de 1930 aC e nos escritos por Aristóteles e Hipócrates 500 aC. Democritus, também em 500 aC, fez a primeira descrição de um cão raivoso e Celsus, Século I, descreveu a Raiva em humanos. No Século XVIII a raiva foi descrita em diferentes partes da Europa, em 1703 foi descrito o primeiro relato de raiva no México e em 1803 a doença foi relatada pela primeira vez na América do Sul em humanos no Peru. Em 1804, Zinke comprovou que a saliva do cão doente era responsável pela transmissão da raiva e Pasteur com observações e experimentos desenvolveu a primeira vacina, produzida em cérebro de coelhos, a partir de passagens sucessivas do material obtido de animais contaminados.

As citações mais antigas que envolvem morcegos hematófagos foram descritas nas Américas pelos primeiros colonizadores espanhóis que chegaram ao novo mundo e relataram grandes refúgios e agressões destes morcegos a animais e homens, com registros de óbitos de soldados, como no Panamá em 1514, acontecimentos estes que certamente já ocorriam antes da colonização, mas permaneciam restritos a fauna nativa existente.

A raiva é transmitida a partir de contato direto com um animal infectado por meio de mordedura, lambedura, arranhadura, ou ainda pela formação de aerossóis em cavernas onde exista um grande número de morcegos contaminados com alta concentração de vírus. Além do cão e do morcego já foram relatadas transmissão por via oral em raposas e por transplantes de órgãos sólidos entre seres humanos.

Existem duas formas clássicas da doença, a raiva paralítica, que em virtude de ser observada predominantemente em bovinos vem sendo associada à transmissão por morcegos hematófagos e a raiva furiosa, evidente em carnívoros, geralmente relacionada à transmissão por cães. O período de incubação, ou período prodrômico, pode variar de 15 dias a anos, sendo observado no homem em média de 45 dias; com o aparecimento dos sintomas a raiva tem sido fatal com excessão de 2 casos humanos um descrito nos Estados Unidos em 2004 e outro no Brasil em 2009.

A raiva continua amplamente distribuída no mundo, com raras exceções de alguns países ou regiões, apesar da quantidade de recursos destinados ao estudo, prevenção e controle da doença. Mesmo em países onde uma estrutura sanitária desenvolvida, como no Brasil onde a campanha de vacinação em massa para cães e gatos, iniciada em 1981, contribuiu de forma decisiva para o controle da raiva no país, o controle da raiva mantida e transmitida por populações de cães e de animais silvestres ainda é um problema de saúde

pública.

Depois de séculos de estudos, o vírus da raiva é o mais conhecido dos *Lyssavirus*. Mundialmente, espécies de animais silvestres que servem como reservatórios e agem como transmissores garantem a manutenção da raiva.

Ainda hoje, 126 anos depois da vacina produzida e testada por Pasteur, a raiva continua a vitimar humanos, animais de companhia e rebanhos além de animais silvestres em todo o mundo, representando um grande problema de saúde pública, tanto para países em desenvolvimento, como para os que detêm recursos e tecnologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O vírus da Raiva pertence à família *Rhabdoviridae* que, juntamente com as famílias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, e *Bornaviridae* constituem uma “superfamília” da ordem *Mononegavirales*, na qual todos os membros são constituídos por uma molécula única de RNA (ssRNA) não segmentado, de polaridade negativa [Mono, do grego *Monos* “único, simples”, *Nega* “de RNA polaridade negativa”, *Virales*, do latim “vírus”] (Fauquet et al., 2004).

A família *Rhabdoviridae* está subdividida em dois sub-grupos de vírus de plantas, um grupo de vírus de peixe e três gêneros de vírus de mamíferos: *Ephemerovirus*, *Vesiculovirus* cujo protótipo é o vírus da estomatite vesicular-VSV e os *Lyssavirus* que têm como protótipo o vírus da raiva.

A partir do final de 2009 foram definidas, pelo Comitê de Taxonomia Viral – ICTV [do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*], 11 espécies virais para o gênero *Lyssavirus* (ICTV, 2009). As quatro primeiras espécies (anteriormente descritas como genótipos) coincidem com os sorotipos 1 a 4:

espécie viral Raiva - *Rabies virus* - mundialmente distribuída (Figura 1), compreende as amostras clássicas de vírus da raiva (RABV): as selvagens isoladas de animais e as amostras chamadas fixas ou vacinais (Tordo, 1996; Wunner, 2002).

espécie viral Lagos Bat - *Lagos bat virus* (LBV) - corresponde a amostra isolada pela primeira vez de um morcego frugívoro (*Eidolon helvum*) na Nigéria em 1956 (Boulger e Porterfield, 1958; Kuzmin et al., 2003) e de outro morcego (*Micropteropus pusillus*) na África Central em 1974 (King e Turner, 1993).

espécie viral Mokola - *Mokola virus* (MOKV) - compreende a amostra isolada na África, de roedores e mussaranhos (*Crocidura sp.*), de cães, de crianças na Nigéria em 1968 e 1971 (Shope et al., 1970; Kemp et al., 1972; Familusi et al., 1972; Kuzmin et al., 2003) e de gatos no Zimbábue (Von Teichman, 1998; Kuzmin et al., 2003).

Figura 1. Mapa das áreas de risco para o vírus da raiva no mundo.

Fonte: World Health Organization. Department of Neglected Tropical Diseases (NTD), Neglected Zoonotic Diseases (NZD), 2009.

espécie viral Duvenhage - *Duvenhage virus* (DUVV) - corresponde ao isolado originariamente de um homem que morreu após ser mordido por um morcego na África em 1970 (Meredith et al., 1971) e posteriormente, em 1981, de um morcego *Miniopterus sp.* na África (Kuzmin et al., 2003).

O vírus *European Bat Lyssavirus* (EBLV) primeiro foi identificado como parte do antigo genótipo 4 DUVV (Schneider et al., 1985), entretanto verificou-se a existência de diferenças antigênicas que o classificaram como o antigo genótipo 5 (Dietzschold et al., 1988). Posteriormente foi subdividido em dois genótipos EBLV1 e EBLV2 (Bourhy et al., 1993) e atualmente em duas espécies virais *European bat lyssavirus 1*, *European bat lyssavirus 2* (ICTV, 2009):

espécie viral Lissavírus do Morcego Europeu 1 - *European bat lyssavirus 1* (EBLV1) - identificado em morcego *Eptesicus serotinus* na Alemanha em 1968 (Schneider et al., 1985; Dietzschold et al., 1988; Schneider e Cox, 1994), na Polônia em 1985 (Lafon et al., 1986), na Dinamarca, Holanda e Espanha em 1987 e na França em 1989 (Bourhy et

al., 1992). Alguns isolados do EBLV1 foram obtidos de morcegos na Ucrânia e de um caso humano relacionado a morcego na Rússia em 1985 (Selimov et al., 1989, 1991; Kuzmin et al., 2003).

espécie viral Lissavírus do Morcego Europeu 2 - *European bat lyssavirus 2* (EBLV2) - isolado de um humano na Finlândia em 1985 (Bourhy et al., 1993; Tordo, 1996) e em morcegos na Holanda, Suíça e Reino Unido, sendo mantido por morcegos insetívoros do gênero *Myotis* (King et al., 1994; Kuzmin et al., 2003).

espécie viral Lissavírus do Morcego Australiano - *Australian bat lyssavirus* (ABLV) - responsável por casos humanos em 1996, foi também isolado de cinco espécies de morcegos raposa voadora e uma espécie de morcego insetívoro no continente Australiano (Gould et al., 1998; Fraser et al., 1996; Kuzmin et al., 2003).

Quatro novas espécies virais foram identificadas na Ásia Central, leste da Sibéria e região caucasiana (ICTV, 2009):

espécie viral Aravan - *Aravan virus* (ARAV) - identificada em 1991 na espécie de morcego *Myotis blythi* na região do Quirguistão na Ásia Central (Arai et al., 2003; Kuzmin et al., 2003).

espécie viral Khujand - *Khujand virus* (KHUV) - identificada em 2001 na espécie de morcego *Myotis daubentoni* no Tajiquistão (Kuzmin et al., 2003).

espécie viral Irkut - *Irkut virus* (IRKV) - identificada em 2002 na espécie de morcego *Murina leucogaster* na Província de Irkutsk - Rússia (Kuzmin et al., 2005).

espécie viral do Morcego Caucasiano do Oeste - *West Caucasian bat virus* (WCBV) - identificada em 2002 na espécie de morcego *Miniopterus schreibersii* na região de Krasnodar na Rússia (Kuzmin et al., 2005).

Kuzmin et al. (2010) identificaram o *Shimoni Bat Lyssavirus* em morcegos africanos e o indicam como a décima segunda espécie viral.

A primeira vacina foi produzida a partir de passagens sucessivas em cérebro de coelhos e administrada em 1885 por Louis Pasteur (Pasteur et al., 1881; 1882; Pasteur, 1885). Este tipo de vacina, assim como várias outras que sucederam, também produzidas a partir de tecido nervoso, causava acidentes neurológicos em virtude da presença de mielina no cérebro de animais adultos (Horack, 1939; Sellers, 1947). Somente em Fuenzalida e Palácios (1955)

desenvolveram então uma vacina produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos, quando o cérebro ainda não apresenta níveis consideráveis de mielina, o que reduziu o número de reações secundárias. Estas vacinas produzidas em tecido nervoso foram chamadas então de vacinas de primeira geração. Posteriormente Koprowski e Cox (1948) apresentaram os primeiros estudos das vacinas produzidas em ovos embrionados, chamadas de segunda geração. Estas vacinas apresentavam baixo poder antigênico além das reações de hipersensibilidade decorrentes das proteínas do ovo. As vacinas de terceira geração, produzidas a partir de cultivo celular, passaram a ser produzidas em meados da década de 50 (Kissling, 1958; Wiktor et al., 1964; Frazatti-Galina et al., 2004) e evoluíram sendo atualmente as mais utilizadas em virtude da eficiência e segurança. Estudos com a expressão de genes em culturas de células (dos Santos et al., 2009) abrem caminho para as novas vacinas sintéticas de subunidades e as vacinas recombinantes. O controle da raiva em reservatórios silvestres vem sendo mantido a partir da vacinação oral com o uso de vacinas em iscas sendo uma metodologia socialmente aceita e que pode ser aplicada em larga escala onde a vacinação parenteral é impraticável (Slate et al., 2009).

Figura 2. Desenho esquemático do Vírus da Raiva

Morfolologicamente o vírus com forma de projétil, apresenta envelope lipídico, com espículas em toda a superfície do envelope, com exceção da região plana. O envelope é

adquirido da célula hospedeira no momento da lise durante a replicação. A partícula viral possui um diâmetro médio de 75 nm (45 a 100 nm) e comprimento que varia de 100 a 300 nm sendo constituída por duas estruturas principais de acordo com a função, o complexo helicoidal ribonucleoproteico e o envelope viral (Fauquet et al., 2004). Os componentes virais estão representados na figura 2.

2.1 Genoma viral

O genoma do vírus da Raiva é de aproximadamente 12 Kb e codifica 5 proteínas diferentes, como pode ser observado na figura 3.

A ribonucleoproteína (nucleocapsídeo) é filamentosa, composta por uma fita simples de RNA genômico de forma helicoidal não segmentado e de senso negativo, associada à nucleoproteína (N – do inglês *Nucleoprotein*), fosfoproteína (P – do inglês *Phosphoprotein*) e polimerase viral (L – do inglês *Large Protein*) (Sokol et al., 1969; Fauquet et al., 2004).

O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica à qual estão associadas duas proteínas, a proteína de matriz (M – do inglês *Matrix Protein*) e a glicoproteína (G – do inglês *Glycoprotein*). A glicoproteína é a única proteína transmembranária e se projeta para o exterior com espículas glicosiladas constituídas por trimeros (Wunner et al., 1985; Tordo et al., 1986a). Também é responsável pela fixação da partícula viral nos receptores celulares, participando da endocitose do vírus e da fusão da membrana viral com a vesícula endossomal (Perrin et al., 1982; Gaudin et al., 1991; Gaudin, 1993).

O vírus da raiva se fixa em um ou mais receptores celulares (Perin et al., 1982; Superti et al., 1984; Wunner et al., 1984; Superti et al., 1986). Após a fixação ao receptor, a partícula viral penetra na célula por endocitose, funde-se com endossomos e pelo contato com lisossomos libera a ribonucleoproteína no citoplasma (Lentz et al., 1982). O RNA viral é transcrito em moléculas complementares positivas sequencialmente da extremidade 3' em direção a extremidade 5', produzindo primeiro um RNA *leader* e depois cinco RNAs mensageiros, que correspondem às proteínas N, P, M, G, e L. Em seguida, há uma segunda etapa replicativa, na qual as fitas positivas servirão de molde para a produção de fitas negativas, as quais serão encapsidadas (Banerjee, 1987). A liberação das partículas virais ocorre por brotamento nos sítios da membrana celular, onde as proteínas do envelope viral se acumularam previamente (Hummeler et al., 1967; Cox et al., 1977).

Figura 3. Desenho esquemático do mapa genômico (a) e replicação do Vírus da Raiva (b).
Fonte: Schnell et al., 2010.

2.2 Os morcegos e o vírus da Raiva

Os morcegos já tinham sua presença registrada há 50 milhões de anos (Taddei, 1996).

A ordem Chiroptera (cheiros=mão e pteron=asa, animal com mão transformada em asas) subdivide-se em duas subordens (*Megachiroptera* e *Microchiroptera*), 17 famílias e aproximadamente 1198 espécies (Nowak, 2003). Os Megachiropteros incluem apenas a família *Pteropodidae*, os grandes morcegos frugívoros conhecidos como raposas voadoras, que podem atingir até 1,70 m de envergadura. A subordem *Microchiroptera* inclui 16 famílias (Taddei, 1996).

Espécies das ordens *Carnivora* e *Chiroptera* são reconhecidas como reservatórios silvestres (WHO, 2005). Os Lissavírus têm sido detectados nos morcegos em diversos continentes, sendo os morcegos identificados como vetores em dez das onze espécies virais dos *Lyssavirus*.

As características dos *Lyssavirus* adaptados a morcegos têm mostrado diferenças quando comparadas à raiva relacionada aos carnívoros, porém somente em 1911, Carini relacionou pela primeira vez a raiva aos morcegos, levantando a hipótese destes serem os transmissores da doença a outros animais, estudando uma epizootia em Santa Catarina, Brasil (Carini, 1911).

Os *Desmodus rotundus*, chamados de morcegos vampiros (Figura 4), são encontrados do norte do México até a costa norte do Chile, região central da Argentina e costas do Uruguai. Desde o nível do mar até 2 mil metros de altitude (Flores Crespo, 2000). Fósseis descobertos na Flórida e em Cuba indicam que os morcegos vampiros vivem nas Américas desde o período Pleistoceno, 2,5 milhões de anos atrás (Arellano-Sota, 1988).

O hábito alimentar de sangue de vertebrados endotérmicos é conhecido apenas em três espécies de morcegos da região neotropical (América Latina), que compõem a subfamília *Desmodondinae*, da família *Phyllostomidae*. Das três espécies conhecidas, *D. rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*, a primeira é a mais estudada em razão da sua importância social e econômica, o que ainda não está estabelecido para as outras duas espécies (Brasil, 1996, 2005).

Durante os três primeiros meses de idade, os morcegos hematófagos se alimentam exclusivamente de leite materno, após o que, são introduzidas pequenas quantidades de sangue direto na boca. Entre os cinco e seis meses, o filhote acompanha a mãe para se alimentar, mas provavelmente são amamentados até os nove meses (Lord, 1992).

Figura 4. Morcego hematófago *Desmodus rotundus*.

Fonte: Melo¹ [(2010)].

Entre os animais silvestres, os morcegos constituem um dos principais reservatórios do vírus da raiva. Nas últimas décadas têm sido frequentes os relatos de morcegos com raiva em vários países do mundo. Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde - WHO (WHO, 2005), estima-se que no mundo em torno de 55.000 pessoas, por ano, morrem de raiva. O cão permanece como principal transmissor da raiva para o homem e também como principal vítima da doença, porém nos países que conseguiram controlar a raiva em animais domésticos, o vírus da raiva se mantém circulante na natureza por meio de reservatórios em animais silvestres, demonstrando que a raiva é um problema de saúde pública, podendo ainda acarretar sérios prejuízos ambientais e econômicos, a despeito da existência de vacinas eficazes de uso humano e veterinário (WHO, 1996; PAHO, 1999; WHO, 2005).

Carini (1911) foi o primeiro pesquisador a associar um foco de raiva diagnosticado em animais domésticos à transmissão por morcegos.

Durante a década de 30, ocorreram epidemias em bovinos no Brasil, Colômbia, Bolívia, Venezuela, México e Trinidad. Em Trinidad, a epidemia atingiu 2.000 animais e 53 pessoas. A doença foi inicialmente diagnosticada como botulismo nos animais e poliomielite em humanos, porém Hurst e Pawan (1931, 1932) observaram o grande número de mordidas

¹ Melo M. [(2010)]. Extraída do site: <http://web.me.com/marmello/marcomello/Welcome.html>.

de morcegos vampiros em bovinos que, posteriormente, morreram sugerindo que os morcegos eram os responsáveis pela transmissão da doença, o que se confirmou com o isolamento do vírus em numerosos morcegos frugívoros e hematófagos, corroborando assim a hipótese de Carini (1911). Estes estudos estabeleceram as formas de manifestação do vírus da raiva em morcegos como parálitica. Em 1936, Pawan estudou outra epidemia de raiva ocorrida em Trinidad que levou a morte de milhares de bovinos e 89 humanos e isolou, pela primeira vez, o vírus da raiva de um morcego insetívoro (Pawan, 1936).

Alguns pesquisadores relataram também o estado de portador assintomático da doença no qual o animal, quando experimentalmente infectado, podia transmitir continuamente o vírus pela saliva por diversos meses, sem manifestar qualquer anormalidade e sem a ocorrência da forma furiosa de raiva, seguida de recuperação (Hurst e Pawan, 1932; Queiroz Lima, 1934; Torres e Queiroz Lima, 1935, 1936; Pawan, 1936). Entretanto, anos mais tarde Moreno e Baer (1980) não observaram nenhum animal excretando vírus na saliva apenas como portador, nenhum animal que adoecesse e se recuperasse da doença e nenhum animal que excretasse o vírus na saliva e permanecesse saudável. O estado de portador assintomático, que pode ter sido confundido com forma parálitica da raiva, a forma furiosa da doença seguida de recuperação não foram confirmados, porém a ausência de sintomas em morcegos experimentalmente ou naturalmente infectados continuou a ser relatada em morcegos não hematófagos (Sulkin et al., 1959) e morcegos *D. rotundus* (Setien et al., 1998; Rodrigues e Tamayo, 2000). No Brasil, Silva et al. (1961) isolaram pela primeira vez o vírus da raiva de um morcego não hematófago no Rio de Janeiro em 1957. A partir de então o isolamento deste vírus em várias espécies de morcegos, hematófagos ou não, foi relatado em vários estados brasileiros (Uieda et al., 1996).

A presença do vírus da raiva nas populações de morcegos é difícil de ser determinada sendo que os estudos epidemiológicos, em sua maioria, baseiam-se em relatórios de serviços dos programas de profilaxia da raiva, quando os animais são capturados em razão da queixa ou encaminhados por munícipes. A positividade em estudos desta natureza variou de 3 a 11% (Richardson et al., 1966; Birney e Rising, 1967; Schowelter, 1980; Steece et al., 1982; Burnett, 1989; Almeida et al., 2003).

Na América Latina, em 1999, foram notificados 95 casos de raiva em morcegos, sendo 22 em hematófagos, 45 em insetívoros e frugívoros e 28 casos, nos quais, o hábito alimentar do animal não foi especificado. Os dados notificados a Organização Panamericana de Saúde (OPAS), entretanto, estão subestimados, o relatório aponta 10 casos de raiva em morcegos ocorridos em 1999 no Brasil enquanto a Coordenação do Programa Estadual da Raiva relatou,

só para o Estado de São Paulo, 28 casos de raiva em morcegos. De acordo com Belotto et al., (2005), na América Latina, os morcegos são a segunda espécie transmissora da raiva a humanos, apontando 14.7% de todos os casos humanos estudados entre 1993-2002 e na maioria destes casos os morcegos hematófagos *D. rotundus* estavam envolvidos.

O primeiro estudo com 228 amostras provenientes de 17 países da América Latina e Caribe, pela técnica de anticorpos monoclonais, foi realizado por Diaz et al. (1994) e mostrou que duas variantes estavam amplamente distribuídas na região, a variante mantida por populações de cães e a variante mantida por populações de morcego *D. rotundus*. Todos os isolados humanos eram de uma dessas duas variantes. Uma amostra de animal doméstico (gato) apresentava a variante de *D. rotundus*.

Com a utilização do painel de anticorpos monoclonais do CDC-OPAS (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Georgia, USA - Organização Panamericana de Saúde), estudos realizados com amostras do Brasil, Argentina e Paraguai, do período de 1987 a 1995 (Delpietro et al., 1997) confirmaram as variantes canina e do morcego hematófago como predominantes: a variante de *D. rotundus* foi detectada em bovinos, equinos, raposas, morcegos hematófagos e não hematófagos. A variante canina foi detectada em cães, um humano, um búfalo, um bovino e uma lhama. Estes estudos detectaram também as variantes características de morcegos insetívoros, em *Tadarida brasiliensis*, *Lasiurus cinereus* e *Molossus molossus*. Os estudos com amostras do Peru, Colômbia e Venezuela também mostram o predomínio das variantes canina e de *D. rotundus* (Lopes et al., 1998; Mattos et al., 1996).

O Peru notificou um surto de raiva humana com 29 mortes em 1990, as vítimas relataram história de mordidas de morcegos e a caracterização antigênica da amostra de uma das vítimas revelou padrão idêntico ao de *D. rotundus* (Lopez et al., 1992). Em 1996 ocorreu outro surto com 9 mortes, e mais duas amostras humanas foram analisadas, indicando variante de morcego hematófago (Warner et al., 1999).

Na Venezuela, circulam duas variantes relacionadas ao *D. rotundus*. O sequenciamento genético mostrou que as amostras de morcego vampiro procedentes de uma região específica da Venezuela segregam em um grupo homólogo e outro distinto, mas estreitamente relacionados com as amostras de morcegos vampiros de outros países da América Latina (Mattos et al., 1996).

No Chile, o morcego insetívoro *T. brasiliensis* é o reservatório do vírus em centros urbanos e fonte de infecção de casos esporádicos reportados em animais domésticos e humanos. A análise de amostras isoladas entre 1977 e 1998 mostrou que nenhuma das

amostras segregava com amostras relacionadas a reservatórios terrestres (Mattos et al., 2000). O primeiro caso humano registrado no Chile desde 1972 ocorreu em 1996 e a caracterização antigênica e genética indicou o morcego *T. brasiliensis* como reservatório do vírus (Favi et al., 2002).

No Brasil, entre 1986 e 2000, ocorreram 617 casos de raiva humana, sendo 63 (10,2%) transmitidos por morcegos. Os dados do Ministério da Saúde (Brasil, 2005) apontam os morcegos como a segunda espécie em número de casos humanos de raiva, lugar anteriormente ocupado pelos felinos domésticos. Infelizmente esses dados não especificam o hábito alimentar do morcego envolvido na transmissão.

O vírus da raiva foi isolado de 41 das 167 espécies de morcegos identificadas no Brasil (Uieda et al., 1996; Castilho et al., 2008; Sodré et al., 2010). Análises de amostras de vírus da raiva isoladas no Brasil confirmaram estudos anteriores de que os reservatórios principais eram os cães e os morcegos vampiros (Ito et al., 2001a; Favoretto et al., 2002).

A variante de morcego hematófago foi detectada em 100% das amostras de bovinos, equinos, ovinos, suínos, caprinos e morcegos hematófagos e em 58,3% (35) de 60 amostras de morcegos não hematófagos, pertencentes a 7 das 17 espécies nas quais o vírus foi isolado (Favoretto et al., 2002), indicando que o morcego não hematófago está sendo contaminando com a variante mantida por populações de morcegos hematófagos.

Carrieri et al. (2000) observaram que a raiva em morcegos não hematófagos precede a raiva bovina e em animais de estimação. Se isso se confirmar, os morcegos não hematófagos poderiam ser o elo entre a raiva silvestre e a raiva urbana. Favoretto et al. (2002) detectaram a variante antigênica de *D. rotundus* (AgV3) em amostras isoladas entre 1989 e 2000, em 4 (30,8%) das 13 amostras positivas de felinos, em 12 dos 100 cães (12,2%) e em 3 das 36 amostras obtidas de humanos (8,3%). O fato de se detectar a variante 3 em cães e gatos mostra que o papel deste morcego no ciclo da raiva não está limitado a raiva silvestre.

No período de 1989 a 1993, o sequenciamento genético de amostras de vírus da raiva de diferentes espécies animais relacionou a maioria destes isolados com a variante mantida por populações de cães. Porém, duas amostras de bovinos isoladas em 1991 e 1993 foram caracterizadas como mantidas por populações de morcego *D. rotundus*. Este dado demonstra que naquele momento já havia duas variantes circulantes, a variante canina predominante e a variante de morcego hematófago (Martorelli et al., 2001). Amostras isoladas de equinos, bovinos e outros animais de rebanho foram analisadas no período de 1996 a 2000 e caracterizadas antigênicamente como variante mantida por populações de morcego *D. rotundus* (Favoretto et al., 2002).

No Brasil, até o ano de 2003, o ciclo epidemiológico de transmissão responsável pelos casos de raiva humana foi o relacionado à cães e gatos, com 72,5% dos casos. A ocorrência de dois surtos de raiva humana transmitido por morcegos, ocorridos nos municípios de Portel-Pará (15 casos) e Viseu-Pará (6 casos), em 2004 somado à diminuição da raiva em cães, inverteu o panorama epidemiológico da raiva e o morcego tornou-se o principal responsável pelos casos de raiva humana. Essa situação manteve-se no ano de 2005, devido os surtos por morcegos hematófagos no Pará e Maranhão, tendo sido notificado 29 casos transmitidos por morcegos, um por cão e um por primata (da Rosa et al., 2006; Brasil, 2005). Em outubro de 2005 foi notificado um novo foco de raiva humana transmitida por morcego hematófago no Maranhão (Brasil, 2005).

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil 13 casos foram confirmados e 12 foram a óbito entre 2006 e 2008. Em 2009 foi reportado o primeiro caso de cura de raiva no Brasil, de um paciente com histórico de contato e agressão por morcego hematófago, com confirmação clínica e laboratorial de raiva em 2008, com a administração do Protocolo de Recife, uma adaptação do Protocolo de Milwaukee (Brasil, 2009; Willoughby et al., 2005).

A raiva transmitida por morcegos hematófagos tem exigido maior atenção epidemiológica representando um novo desafio para o controle da doença. Não é uma forma de transmissão nova, porém desde 2004 têm-se observado o aumento no número de casos, requerendo novas estratégias de controle, mais complexas que as utilizadas nos programas de profilaxia da raiva dirigidas ao controle de variantes relacionadas ao ciclo terrestre de transmissão (Schneider et al., 2004).

Faber et al. (2004), mapearam o genoma completo de um *Lasiyonicteris noctivagans*, importante reservatório do vírus na América do Norte. Recentemente, em virtude da importância de se conhecer mais a respeito dos vírus, foram mapeados os genomas de outras variantes do vírus da raiva, uma isolada de *T. brasiliensis*, reservatório deste vírus no Chile, de um *Procyon lotor*, importante reservatório no Canadá, de uma raposa *Dusicyon sp.* um dos reservatórios do vírus no Brasil (Delmas et al., 2008; Szanto et al., 2008; Mochizuki et al., 2009). Apenas recentemente, um grupo japonês em fevereiro de 2011, sequenciou o vírus da raiva de um morcego hematófago *D. rotundus* e um morcego frugívoro *Artibeus lituratus* do Brasil, entretanto as sequências não se encontram disponível no banco de dados *GenBank* (Mochizuki et al., 2011).

A escassez de dados, na literatura, a respeito do genoma completo da variante mantida por populações de morcegos hematófagos *D. rotundus*, deixa uma lacuna no entendimento da epidemiologia molecular deste vírus. Este fato confirma a necessidade do desenvolvimento de

metodologias que permitam estudos complementares mais precisos a respeito da biologia e epidemiologia da raiva em quirópteros, com o sequenciamento completo de isolados de morcego *D. rotundus* com a finalidade de desenvolver estudos genéticos evolutivos além da genotipagem, sendo fundamental para o melhor entendimento da diversidade genética desse vírus em diferentes hospedeiros sendo que a importância epidemiológica desta espécie na transmissão da raiva é inquestionável.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver estudo genético da variante do vírus da raiva mantida por populações de morcego *D. rotundus*, isolada de uma amostra deste morcego no Brasil.

3.2 Específicos

- a) Estabelecer um protocolo rápido e econômico de síntese de cDNA (RT-PCR) para o vírus da raiva independente da técnica de clonagem;
- b) Desenhar *primers* específicos e eficientes para o sequenciamento da variante do vírus da raiva estudada;
- c) Comparar filogeneticamente as amostras da variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* com a amostra padrão da espécie viral *Rabies virus*, além de outras desta mesma espécie viral disponíveis no *GenBank*.
- d) Estabelecer possíveis padrões genéticos de diferenciação com a amostra de referência da espécie viral *Rabies virus*, de acordo com a região do genoma identificada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados no laboratório NB3 do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - SP, segundo as normas de biosegurança vigentes.

Cada uma das etapas foi realizada em diferentes espaços físicos, sendo uma área destinada à extração do ácido nucléico, outra para a reação de PCR e a terceira somente para manipulação do produto amplificado. Cuidados para evitar contaminação por manipulações técnicas como pipetagens, uso de ponteiras com filtros e fluxos laminares para as etapas de PCR, também foram utilizados, como é de rotina destes laboratórios.

4.1 Amostras

Para execução deste trabalho, foi selecionada a amostra de vírus da raiva isolada de morcego hematófago *D. rotundus* na região tropical e temperada das Américas: amostra IBDR341/2001 isolada de morcego hematófago *D. rotundus* na cidade de São José do Barreiro, estado de São Paulo, Brasil no ano de 2001, gentilmente cedida pela Dr^a Elenice Maria Sequetin Cunha.

A amostra de vírus pertence e tem sido mantida a -70°C no banco de amostras do Laboratório de Raiva e Encefalites do Centro de P&D de Sanidade Animal do Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, em tecido nervoso central com título de 10^{-5} DL₅₀ quinta passagem em cérebro de camundongo albino suíços sob responsabilidade da Dr^a Elenice Maria Sequetin Cunha. Para este estudo foi registrada sob o número brdrusp100/07 no banco de amostras do Núcleo de Pesquisas em Raiva do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (ICBII-USP).

Uma amostra isolada de um bovino positivo para raiva foi utilizada para os testes de padronização e também como controle positivo. Esta amostra foi encaminhada para o Núcleo de Pesquisas em Raiva do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICBII-USP) com a finalidade de caracterização antigênica, e foi registrada no banco de amostras de vírus da raiva sob identificação brbvusp01/06, procedente da cidade de Manoel Emídio-Piauí.

4.2 Imunofluorescência Indireta

Para a caracterização da variante antigênica foi realizado o teste de Imunofluorescência Indireta utilizando um painel formado por oito anticorpos monoclonais contra o nucleocapsídeo do vírus da raiva, produzido pelo *Centers for Disease Control and Prevention*-CDC, Atlanta, Georgia, USA e distribuído pela Organização Pan-americana da Saúde - OPAS, pré-estabelecido para a tipificação do vírus da raiva isolado em amostras das Américas (PAHO, 2000). Cada amostra foi processada com o painel de anticorpos monoclonais por duas vezes e em lotes e dias diferentes.

4.3 Cultivo Celular

A amostra brdrusp100/07 foi cultivada em sistema de cultura celular para manutenção e aumento de volume. Paralelamente ao cultivo, os testes moleculares foram padronizados com a amostra brbvusp01/06.

A linhagem celular escolhida foi BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) já bastante descrita na literatura e amplamente utilizada em estudos com vírus da raiva em virtude da sua sensibilidade ao vírus, de acordo com o seguinte protocolo de cultivo.

O meio de crescimento EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) foi suplementado com vitaminas (2X), glutamina (2X) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), além de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B.

Uma suspensão de 20% do material (cérebro, cerebelo e hipocampo) foi preparada para a inoculação no sistema de cultivo celular. Após centrifugação a 500 g por 10 minutos, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado à suspensão 2×10^6 células BHK-21 em 1,5 mL de EMEM. As células e vírus foram incubados por 1h a 37 °C, agitando a cada 15 minutos, para adsorção do vírus às células e a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 100 g.

O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 10 mL de EMEM com 10% de soro fetal bovino. O teste de imunofluorescência direta foi realizado, para confirmar a presença do vírus da raiva, com 4 mL do material cultivado fixado em acetona resfriada a -20 °C, (Goldwasser e Kissiling, 1958; Dean et al., 1996) empregando-se conjugado anti-vírus da raiva (*Chemicon International*, Light Diagnostics Rabies DFA Reagent - Monoclonal antibody FITC-conjugate) adquirido comercialmente.

Os 6 mL restantes foram inoculados em garrafa de 25 cm³, que pode ser mantida em um sistema fechado ou incubada a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 40 a 48 horas e

novamente foi realizado o teste de Imunofluorescência Direta para confirmar a presença do vírus e preparado o subcultivo. Após a lavagem da monocamada por 2 vezes com 5mL de PBS (livre de Mg^{++} e Ca^{++}), foi adicionado 2 mL Tripsina-EDTA e incubado em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. As células foram então ressuspensas em meio EMEM e dispersas por pipetagem vigorosa (cerca de 10 a 20 vezes). O volume de 3 mL da suspensão de células foram ressuspensos em 3 mL de meio EMEM, incubados a 37°C por 2-3 dias.

Após este período foi realizado teste de Imunofluorescência Direta em uma alíquota para confirmar a presença do vírus e o lote de vírus produzido foi armazenado em freezer -70 °C até o momento do uso.

4.4 Descrição dos Oligonucleotídeos Iniciadores (*primers*)

Para amplificar e sequenciar todo o genoma viral da variante do vírus da raiva isolada de morcego hematófago *D. rotundus* foram desenhados oligonucleotídeos com o programa OLIGO 6.83 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, Estados Unidos), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto. A análise da qualidade dos mesmos, em relação à temperatura de anelamento, presença de regiões de falso pareamento e presença de ‘*hairpins*’ também foi feita com o mesmo programa e os oligonucleotídeos foram sintetizados pela *Invitrogen Brazil Custom Primers*.

4.5 Extração do RNA Total

Todo o processo de extração foi realizado em banho de gelo (amostras e reagentes) e utilizando centrifuga refrigerada. Ao lisado de células (1 mL) foram adicionados 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). A mistura resultante foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos, incubada em banho de gelo por 5 minutos e centrifugada a 12.000 g, 4 °C, por 15 minutos.

Após centrifugação, o sobrenadante (cerca de 400 µL) foi transferido para um tubo estéril, sendo o RNA precipitado pela adição de isopropanol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, Estados Unidos) volume a volume, seguido de homogeneização em agitador e incubação em banho de gelo por 15 minutos. A mistura foi novamente centrifugada a 12.000 g, por 15 minutos. A seguir o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol a 75% (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluído em H₂O DEPC® (Invitrogen Corporation,

Carlsbad, CA, Estados Unidos). A suspensão foi então centrifugada a 7.500 g, a 4 °C por 8 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento, após secagem, foi ressuspenso em 30 µL de H₂O DEPC[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), contendo 40 U de Inibidor de Ribonuclease (RNase OUT[®] – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). A quantificação do RNA foi realizada com o equipamento Thermo Scientific NanoDropTM1000 Spectrophotometer^{Thermo} (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos), integrante do parque de equipamentos do Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto.

4.6 Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição (RT-PCR)

4.6.1 Transcrição Reversa (RT-PCR)

A reação de transcrição reversa (RT-PCR), para a obtenção de cDNA, foi realizada em uma única fase utilizando o sistema *Super ScriptTM II Invitrogen[®]* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Nesta fase, 4 µL de RNA total extraído foram acrescidos a um mix contendo 200 U de *Transcriptase Reversa* (RT) (MMLV – *Moloney-murine leukemia virus/Super ScriptTM Invitrogen[®]* - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) diluídas no tampão da enzima (50 mM de tris-HCl (pH-8,3), 75 mM de KCl, 3 mM MgCl₂), 4 mM de DTT, 1,2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP/Gibco-BRL[®] - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 2µM de cada *primer* (polaridade positiva e negativa), 40 U de Inibidor de *Ribonuclease* (RNase OUT[®] – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), e H₂O DEPC[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), perfazendo um volume final de 25 µL. A transcrição foi realizada a 42 °C por uma hora. O cDNA foi utilizado para a amplificação e posteriormente armazenado a -70 °C.

Paralelamente foi realizada, com o auxílio do *High Capacity cDNA Archive kit[®]* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), outra transcrição reversa para gerar cDNA randômico, onde 50 µL de RNA extraído foram diluídos em mix contendo 10 µL de *Random primers* 10X, 10 µL tampão da RT 10X, 250 U de *MultiScribe RT enzyme*, 4 µL de *dNTP mix* [100mM], 1 U de inibidor de Ribonuclease (RNase OUT[®] - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e água DEPC[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para completar o volume de 100 µL. A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos e 37 °C por 120 minutos no termociclador *MasterCycler personal*

Eppendorf® (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). O cDNA foi utilizado para a amplificação e posteriormente armazenado a -70 °C.

Uma metodologia diferenciada para a síntese de *cDNA* longo foi desenvolvida por Campos et al. (trabalho em fase de publicação)² a partir da metodologia para síntese de cDNA em HIV (Rousseau et al., 2006). Os resultados obtidos com a utilização desta metodologia foram testados para a amplificação da nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de matriz, glicoproteína e polimerase viral. Esta nova metodologia encontra-se em fase final de análise pelos relatores da revista *Journal of Virological Methods* e está descrita a seguir.

Ao RNA extraído, cerca de 25 µL, foi combinado com 2 µL de 10mM de dNTP (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e 5 µL do *primer* anti-sense (*reverse*) a uma concentração de 10 pmol/µL, na posição final do genoma (extremidade 5') e incubados a 65 °C por 5 minutos. Em seguida, a uma temperatura de 45 °C, foram adicionados 19 µL da segunda mistura contendo 200 U de *Transcriptase Reversa* (RT) (MMLV – *Moloney-murine leukemia virus/SuperScript™* *Invitrogen®* - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) diluídas no tampão da enzima (50 mM de tris-HCl (pH-8,3), 75 mM de KCl, 3 mM MgCl₂), 4 mM de DTT, 40 U de Inibidor de *Ribonuclease* (RNase OUT® – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), e H₂O DEPC® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), perfazendo um volume final de 51 µL. A primeira etapa da transcrição foi realizada a 45 °C por uma hora e meia. A seguir foram adicionados mais 200 U de *Transcriptase Reversa* (RT) (MMLV – *Moloney-murine leukemia virus/SuperScript™* *Invitrogen®* - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e a reação incubada por mais uma hora e meia, sendo posteriormente inativada a 70 °C durante 15 minutos, seguido de um ciclo de 37 °C por 20 minutos.

Após a síntese o cDNA foi quantificado com o equipamento Thermo Scientific NanoDrop™1000 Spectrophotometer^{Thermo} (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) ou com o uso do padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder®* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Foi realizada a amplificação parcial do gene N (765pb) para a confirmação da viabilidade do cDNA “longo”.

Também foi testada a metodologia de síntese do cDNA com o *cMaster™ RT kit* (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) seguindo instruções do fabricante.

² Campos et al. One-step protocol for amplification of full-length cDNA of the rabies virus genome. A ser publicado na *Journal of Virological Methods*; 2011.

4.6.2 Amplificação (PCR)

Partindo da temperatura já estabelecida para os testes de amplificação parcial do gene N, já utilizados no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, foram testadas todas as combinações possíveis com a utilização dos *primers* desenhados e diferentes temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos (gradiente).

Para a reação de PCR, com os *primers* desenhados para cada uma das regiões alvo selecionadas, foram utilizados 50 ng de cDNA diluídos em tampão de reação 10 mM tris-HCl (pH 9.0), 50 mM de KCl (PCR *buffer* 10X - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1µM de cada *primer* (polaridade positiva e negativa - 50 pmoles/50µL), 2,5 U de *Taq DNA polimerase*[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e H₂O DEPC[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para completar um volume final de 50 µL.

Tabela 1 - Descrição dos primers utilizados nas reações de RT/PCR e Sequenciamento para a nucleoproteína.

Utilização	Primer (5'→3')	Posição (nucleotídeo – nt)	Sequência	Referência
RT/PCR e Sequenciamento	21G <i>Foward</i>	55 - 75	ATG TAA CAC CTC TAC AATG	Smith et al., 1995
RT/PCR e Sequenciamento	304 <i>Reverse</i>	1533 - 1514	TTG ACG AAG ATC TTG CTC AT	Smith et al., 1995
RT/PCR e Sequenciamento	P784 <i>Reverse</i>	869 - 849	CCT CAA AGT TCT TGT GGA AGA	Soares et al., 2002

Somente para amplificar e sequenciar a nucleoproteína foram também utilizados iniciadores complementares ao gene N da nucleoproteína, descritos na literatura (Smith et al., 1995; Soares et al., 2002). A descrição dos *primers*, bem como a localização dos mesmos, estão ilustradas na tabela 1.

As amplificações foram realizadas no termociclador *MasterCycler Gradient Eppendorf*[®] (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), com preaquecimento a 95 °C por 5 minutos, para denaturação, seguidos de 35 ciclos, cada um deles composto de 45 segundos a 94 °C para denaturação do DNA molde, 45 segundos a 55 °C para emparelhamento dos

primers e 90 segundos a 72 °C para a extensão das novas cadeias. Ao final dos 35 ciclos, seguiu-se um aquecimento a 72 °C por 5 minutos de extensão final.

Para a reação de PCR da polimerase viral, com o intuito de amplificar completamente o gene L, mais de 6.000 nt (6.476 nt para a amostra de referência NC_001542) e do genoma completo (11.932 nt para a amostra PV) foi utilizado o kit *Expand Long Template PCR System*[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Também foram necessários inúmeros testes com fragmentos menores utilizando *primers* internos (Tabela 2).

As amplificações e sequenciamento da polimerase viral, com a combinação de iniciadores desenhados, foram realizadas com 25ng de cDNA diluídos em tampão de reação 10 mM tris-HCl (pH 9.0), 50 mM de KCl (PCR *buffer* 10x - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 1µM de cada *primer* (polaridade positiva ou negativa), 2,5 U de *Taq DNA polimerase*[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e H₂O DEPC[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para completar um volume final de 50 µL.

A amplificação dos fragmentos longos foi realizada no termociclador *MasterCycler Gradient Eppendorf*[®] (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), com preaquecimento a 95 °C por 5 minutos para denaturação, seguidos de um *touchdown* de duas rodadas de 10 ciclos e uma rodada de 20 ciclos, totalizando 40 ciclos, o primeiro conjunto de ciclos foi composto de 45 segundos a 94 °C para denaturação do DNA molde, 45 segundos a 57 °C para emparelhamento dos *primers* e 150 segundos a 72 °C para a extensão das novas cadeias, o segundo conjunto composto de 45 segundos a 94 °C para denaturação do DNA molde, 45 segundos a 56 °C para emparelhamento dos *primers* e 150 segundos a 72 °C para a extensão das novas cadeias e o terceiro conjunto composto de 45 segundos a 94 °C para denaturação do DNA molde, 45 segundos a 55 °C para emparelhamento dos *primers* e 150 segundos a 72 °C para a extensão das novas cadeias. Ao final dos 40 ciclos, seguiu-se um aquecimento a 72 °C por 5 minutos de extensão final.

4.7 Detecção por Eletroforese dos Produtos Amplificados

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a 1,5% em tampão TBE 1x (89 mM - tris HCl; 89 mM H₃BO₃; 2 mM Na₂ EDTA, pH 8,3 - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Edt Br-Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO,

Estados Unidos). Uma mistura de 10 µL de produto amplificado e 2 µL de azul de bromofenol (*loading buffer*) foi aplicada no gel de agarose submetido então à eletroforese, em cuba horizontal, em tampão TBE 1x (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) durante 45 minutos a 100 volts. A visualização do gel foi realizada sobre transluminador de luz ultravioleta (UV), sendo os resultados comparados aos controles positivos, negativos e aos marcadores de peso molecular (1 Kb, Fermentas[®] International Inc., Burlington, Ontario, Canadá), sendo a seguir fotodocumentados.

4.8 Purificação da Reação de Amplificação

Para produtos amplificados que apresentaram fragmentos inespecíficos menores que 300 pb foi utilizado o sistema de colunas *PureLinkTM PCR Purification Kit[®]* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), para purificação diretamente do produto de PCR, seguindo as instruções do fabricante. Para produtos amplificados que apresentaram fragmentos inespecíficos com mais de 300 pb foi utilizado o *PureLinkTM Quick Gel Extraction Kit[®]* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a partir da excisão do fragmento do gel de agarose, seguindo as instruções do fabricante. Para alguns produtos do gene L, com apenas o fragmento de interesse, foi necessária a purificação do produto de PCR, sendo utilizado o sistema *ExoSAP-IT[®]* (GE Healthcare Bio-Sciences Ltd - USB Corporation, Cleveland, OH, Estados Unidos) segundo instruções do fabricante (adicionando 16 µL do kit a 40 µL de produto de PCR e incubados por 15 minutos a 37 °C e 15 minutos a 80 °C).

4.9 Reação de Sequenciamento

Após a amplificação, as fitas de DNA foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando o kit comercial *BigDyeTM terminator – cycle sequencing read reaction – Applied Biosystems[®]* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante, com os *primers* previamente sintetizados para mapear os genes codificadores para as proteínas N, P, M e G.

Em um microtubo contendo cerca de 10-30 ng de produto de PCR, foram adicionados a um microtubo acrescido de 2 µL de Tampão *Save Money 5X* (Tris HCl 200 mM pH 9,0 e 5mM MgCl₂), 3.2 pMol/µL do *primer*, 2 µL do kit *ABI PRISM DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Big Dye v3.1[®])* Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) e água DEPC[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para

completar um volume final de 10 μ L. Este procedimento foi efetuado separadamente para cada um dos *primers*.

Para a polimerase foram necessários cerca de 60-100 ng de produto de PCR purificado. A quantificação do DNA foi realizada no Thermo Scientific NanoDropTM1000 Spectrophotometer^{Thermo} (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) ou com o padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder*[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

A mistura homogeneizada foi levada ao termociclador *MasterCycler Gradient Eppendorf*[®] (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), pré-aquecido a 96 °C por 5 minutos, para denaturação da fita de DNA, seguido de 25 ciclos, cada um deles composto de 10 segundos a 96 °C para denaturação do DNA molde, 15 segundos a 50 °C para emparelhamento dos *primers* e 4 minutos a 60 °C para extensão da nova fita de DNA.

4.9.1 Purificação da reação de sequenciamento

O produto obtido foi purificado, visando a remoção de excesso de dideoxinucleotídeos “terminadores” presentes na reação, por precipitação com isopropanol, descrita a seguir:

Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 30 μ L de água DEPC[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e 60 μ L de isopropanol a 100%, com agitação e centrifugação por 60 minutos a 4.000 g em temperatura ambiente, utilizando centrífuga (*Centrifuge 5804R* - Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 250 μ L de etanol 70%, com agitação e nova centrifugação por 30 minutos a 4000 g em temperatura ambiente.

As amostras purificadas e precipitadas foram ressuspensas com 10 μ L de formamida ultra pura (formamida Hi-Di[®] - Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), denaturadas a 95 °C por 3 minutos e resfriadas em banho de gelo por mais 2 minutos e então submetidas à eletroforese em polímero POP6[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), utilizando sequenciador automático ABI-PRISM modelo 3100[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). As amostras foram traqueadas automaticamente utilizando *software* do Analisador Automático de DNA *ABI Prism* modelo 3100.

Também foi testado o *Applied Biosystems Big Dye*[®] *X-Terminator*TM *Purification Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante.

4.9.2 Processamento e alinhamento das sequências dos genes N, P, M, G e L do vírus da raiva

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas e analisadas com os programas BioEdit v7.0.9 (1997-2007, *Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA*) e *CodonCode Aligner* V3.0.1 (*CodonCode Corporation*), para obtenção de segmentos de nucleotídeos para os genes N, P, M, G e L.

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas, juntamente com sequências adquiridas do *GenBank*, utilizando o programa BioEdit v7.0.9 (1997-2007, *Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA*) sendo então convertidas para o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). Os arquivos foram analisados, com o referido programa, tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as sequências, calculadas par a par.

Posteriormente às análises filogenéticas o *dataset* de amostras alinhadas foi submetido ao programa MacClade 4.0 (Maddison e Maddison, 2000) para análises de substituição de aminoácidos em cada uma das regiões codificadoras de seus respectivos genes.

4.10 Análise Genealógica

Os arquivos gerados pelos programas de alinhamento BioEdit v7.0.9 (1997-2007, *Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA*) e MEGA 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*), disponível no site <http://www.megasoftware.net/mega.html> (Tamura et al., 2007) foram convertidos para formato NEXUS e utilizados para as análises genealógicas para as amostras de vírus da raiva, que foram realizadas empregando os critérios de Máxima Verossimilhança (*maximum likelihood* - ML) evolutivas utilizando o programa GARLi (*Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference*), disponível no site <http://www.bio.utexas.edu/faculty/antisense/garli/Garli.html> (Zwickl, 2006). A árvore de ML (*maximum likelihood*) com as sequências de vírus da raiva foi gerada com uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “*Neighborn joining*” (NJ) e para verificar a sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas, análises de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) e reamostragem de 200 caracteres foram feitas no programa GARLi (Zwickl, 2006). As anotações de valores de *bootstrap* nas árvores foram realizadas com o aplicativo *TreeAnnotator* do programa BEAST para Mac OS, disponível nos sites: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/> ou http://beast.bio.ed.ac.uk/Main_Page.

5 RESULTADOS

5.1 Imunofluorescência Indireta e Cultivo Celular

Os resultados dos testes de Imunofluorescência Indireta realizados com as amostras brdrusp100/07 e brbvusp01/06 apresentaram perfil antigênico compatível com a variante antigênica 3 - AgV3, mantida por populações de morcegos hematófagos *D. rotundus*.

O produto obtido do cultivo da amostra brdrusp100/07 em sistema de cultura celular BHK-21 permaneceu armazenado em freezer a -70 °C durante o desenvolvimento dos testes.

5.2 Desenho de *Primers* e Quantificação do RNA viral

Para amplificar e sequenciar todo o genoma viral da variante do vírus da raiva isolada de morcego hematófago *D. rotundus* foram desenhados 33 oligonucleotídeos (Tabela 2). Os testes de amplificação das amostras utilizadas neste estudo, realizados a partir dos *primers* desenhados, mostraram que 32 dos 33 oligonucleotídeos foram eficientes.

Figura 5. Visualização da quantificação de RNA para as amostras brdrusp100/07 e brbvusp01/06. As amostras brdrusp100/07 (identificada para o teste com o código M374C/00) e brbvusp01/06 (identificada para o teste com o código Bov_012/06). A quantidade de RNA após a extração está destacada. Em (a) quantificação realizada em uma data e em (b) quantificação realizada em data diferente após concentração das amostras.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de genes do vírus da raiva

Utilização	Primer	Posição no gene	Polaridade	Sequência
RT-PCR e Seq.	Início_Posição1_F	1-22	+	ACgCTTAACAACAARATCARAg
		<i>Leader</i>		
PCR e Seq.	SEQ_NuleoPr_F.750	749-766	+	ggCACAgTWgTCACTgCT
PCR e Seq.	NPM_1_F.1342	Nucleoproteína 1342-1361	+	TgTCTCAgTCAgYTCCAATC
PCR e Seq.	NPM_1_R.2479	Nucleoproteína 2480-2501	-	gTTCATYTTATCAgTggTgTg
PCR e Seq.	NPM_2_F.2207	Fosfoproteína 2207-2226	+	ATgAACCTTgATgAYATAgT
RT-PCR e Seq.	NPM_2_R.3428	Fosfoproteína 3428-3447	-	ggRCAGCTgAgRTgATgTAT
RT-PCR e Seq.	Glyco_F_pcr - A	Glicoproteína 3284-3303	+	CTATCAACATCCCTCAAARg
RT-PCR e Seq.	Glyco_F_Sato_pcr - C	Intergênica M-G 3219-3237	+	CgCTgCATTTTTRTCARAgT
RT-PCR e Seq.	Glyco_R_pcr - B	Intergênica M-G 5021-5038	-	CAGTTgAgAKgATTgATg
RT-PCR e Seq.	Glyco_R_pcr - D	Pseudogene 5426-5443	-	CgggTCATCATARACCTC
PCR e Seq.	Glyco_seqF_1	Pseudogene 3987-4007	+	gACTTgSggMTTgTRgATgA
PCR e Seq.	Glyco_seqR_1	Glicoproteína 4120-4138	-	gATCMggRgggCACCATT
PCR e Seq.	Glyco_seqF_2	Glicoproteína 4120-4138	+	AAATggTgCCCgCCKgATC
PCR e Seq.	Glyco_seqR_2	Glicoproteína 4520-4538	-	TCCAACARYTCCATATgTT
PCR e Seq.	Glyco_seqF_3	Glicoproteína 4370-4390	+	ggACTTggAACgARRTCATCC
PCR e Seq.	Glyco_seqR_3	Glicoproteína 4637-4656	-	gAgAYCTgTTTgTGMACATC
RT-PCR e Seq.	GliPol_1_F.5257	Glicoproteína 5257-5275	+	TgAAggACAKAAgCARTAg
PCR e Seq.	GliPol_1_R.6270	Glicoproteína 6270-6287	-	AgTTTCCRCACATRgACA
PCR e Seq.	GliPol_2_F.6129	Glicoproteína 6129-6147	+	gAAACTACACACTTATgCT
PCR e Seq.	GliPol_2_R.7295	Glicoproteína 7294-7312	-	ATACATCCTCTgTYgAYTC
PCR e Seq.	GliPol_3_F.7158	Glicoproteína 7157-7178	+	TgACTATgACAgACAAYTgAA
PCR e Seq.	GliPol_3_R.8274	Glicoproteína 8273-8290	-	gMAggCgAgTgAAgCTYT
PCR e Seq.	GliPol_3_R_alternativa.8330	Proteína L 8329-8348	-	TTgAgWAgAATggTgggACT
PCR e Seq.	Pol_1_F.8185	Proteína L 8184-8204	+	gAgAgARATYTgTAAgCTC
PCR e Seq.	Pol_1_R.9215	Proteína L 9214-9233	-	gTCAARTCAgACATgTgTC
PCR e Seq.	Pol_2_R.10316	Proteína L 10315-10333	-	CCTgTTgAgCAGgCARAC
PCR e Seq.	Pol_3_F.10226	Proteína L 10225-10242	+	gATCARgARgTKCgCCAT
PCR e Seq.	Pol_3_R.11196	Proteína L 11195-11217	-	TATgATCATYTCAATRTAAggAT
PCR e Seq.	Pol_4_F.10847	Proteína L 10846-10866	+	ATgTCYgATTTTgCATTgTCK
PCR e Seq.	Pol_4_F_alternativa.11064	Proteína L 11064-11084	+	TgACCTCYTCYACCCTTCgAg
PCR e Seq.	Pol_4_R.11616	Proteína L 11616-11636	-	TCCAgtAgATgAVAgACTCA
RT-PCR e Seq.	PosicaoFINAL_R.11904	Proteína L 11904-11924	-	ACgCTTAACAAATAACAACA
		<i>Trailer</i>		

A quantificação do RNA realizada após a extração pode ser visualizada nas figuras 5a e 5b. A transcrição foi eficiente apenas quando quantidades acima de 145,42ng/μL de RNA foram utilizadas, apresentando resultados positivos para amplificação (Figuras 5a e 5b).

A figura 5a mostra a quantificação de RNA após uma extração. Os testes de amplificação posteriores a esta extração foram negativos para a amostra em estudo brdrusp100/07 e fracamente positivos para a amostra controle brbvusp01/06 com os iniciadores SeqN+304 da nucleoproteína.

A figura 5b mostra os resultados da quantificação de RNA de outra extração executada a partir da concentração, por centrifugação a 20.000 g durante 2 horas, da amostra em estudo brdrusp100/07 e do controle brbvusp01/06.

5.3 Síntese de cDNA e Amplificação Viral

Tanto o teste de síntese de cDNA com o sistema *Super Script™ Invitrogen®* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), quanto com o *High Capacity cDNA Archive Kit®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) foram eficientes. A viabilidade do cDNA longo, desenvolvido neste trabalho, foi confirmada primeiramente com a amplificação parcial do gene N realizada com a combinação de *primers* SeqN+304 (765 pb) e posteriormente com a amplificação de fragmentos realizada com os demais conjuntos de *primers* para os demais genes estudados. A metodologia de síntese do cDNA com o *cMaster™ RT kit* (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) não apresentou resultados satisfatórios sendo, portanto, desconsiderada.

Ao serem testadas diferentes temperaturas de anelamento para os oligonucleotídeos desenhados para este estudo, foi verificado que o protocolo já utilizado neste laboratório para amplificar a nucleoproteína, mostrou-se eficiente para algumas combinações dos novos conjuntos de *primers* como Início+304 (1.533 pb), SeqN+304 (765 pb), NPM1F+NPM2R (2.089pb), NPM1F+NPM1R (1.137 pb), NPM2F+NPM2R (1.221 pb), A+D (2.141 pb), C+D (2.206 pb), GliPol1F+GliPol1R (1.030 pb), GliPol1F+GliPol2R (2.046 pb) e GliPol3F+GliPol3R (1.133 pb). Por outro lado foi observado que para os demais fragmentos amplificados foram necessárias adaptações quanto a temperatura de anelamento e o número de ciclos.

Cada um dos genes codificadores para as proteínas do vírus da raiva encontra-se destacado na figura 6 que facilita a visualização das regiões abordadas neste trabalho. Os genes para nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase (L) são separados por regiões intergênicas curtas e um longo pseudogene (entre as proteínas G e L). A sequência é flanqueada por uma região *Leader* (Le) na posição 3' e por uma região *Trailer* (Tr) na posição 5'.

Figura 6. Esquema da organização do genoma do Vírus da Raiva e representação da cauda Poli-A.

Os resultados positivos da amplificação de fragmentos do vírus da raiva na amostra controle brbvusp01/06, utilizando as combinações Início+304 (1.533 pb) e 21g+304 (1.478 pb) estão demonstrados na figura 7. A combinação dos *primers* SeqN+304 (765 pb) também amplificou o fragmento esperado (dados não mostrados). O teste foi realizado em duplicata com amplificações realizadas a partir de cDNA randômico e a partir de cDNA específico MMLV sendo que os resultados foram eficientes para ambos os tipos de cDNA.

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para nucleoproteína com a amostra controle brbvusp01/06.

O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1. Nas canaletas 2 e 4 aparecem os resultados para a combinação 21g+304 (1.478 pb), nas canaletas 3 e 5 para a combinação Início+304 (1.533 pb), em 6 e 7 aparecem os controles negativos. As setas vermelhas indicam amplificações realizadas a partir de cDNA randômico e as setas azuis indicam amplificações realizadas a partir do cDNA MMLV.

As combinações de oligonucleotídeos NPM1F+NPM2R (2.089 pb - dados não mostrados), NPM1F+NPM1R (1.137 pb) e NPM2F+NPM2R (1.221 pb), desenhados para as proteínas P e M, foram utilizadas com sucesso, gerando fragmentos com tamanhos esperados para as duas amostras estudadas (figura 8).

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fosfoproteína e proteína de matriz.
O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1 do primeiro gel (a) e na canaleta 5 do segundo gel (b). O primeiro gel apresenta resultados para a combinação NPM1F+NPM1R (amplificando 1.137 pb do gene da fosfoproteína), na canaleta 2 aparece a amostra brbvusp01/06, na canaleta 3 controle negativo, em 4 amostra de outra variante testada paralelamente, em 5 e 6 aparece a amostra brdrusp100/07. O segundo gel (b) apresenta resultados para a combinação NPM2F+NPM2R (amplificando 1.221 pb do gene da proteína de matriz), na canaleta 1 amostra brbvusp01/06, nas canaletas 2 aparece a amostra brdrusp100/07, em 3 amostra de outra variante testada paralelamente e em 4 controle negativo.

As reações de amplificação da glicoproteína foram realizadas em duplicata para cada uma das combinações de *primers* A+B (esperado 1.736 pb), C+B (esperado 1.801 pb), A+D (2.141 pb) e C+D (2.206 pb). Nestes ensaios foi utilizado no primeiro tubo o cDNA específico para a glicoproteína viral, obtido com o sistema *SuperScript™ Invitrogen®* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e no segundo tubo foi utilizado o cDNA randômico obtido com o *High Capacity cDNA Archive kit®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Os testes com as combinações onde foi utilizado o *primer* B não amplificaram nenhum fragmento, indicando que este oligonucleotídeo não foi eficiente. As reações realizadas com as combinações de A+D e C+D apresentaram os produtos esperados e ainda, com a combinação C+D o material amplificado apresentou o melhor resultado com fragmentos únicos e maior quantidade de material amplificado (Figura 9).

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para núcleo e glicoproteínas com a amostra controle brbvusp01/06.

O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1. Nas canaletas 2 e 3 aparecem os resultados para a combinação 21g+304 (nucleoproteína), em 6 aparece o resultado para a combinação C+D (glicoproteína) e em 8 o resultado para a combinação A+D (glicoproteína), todos positivos. As setas azuis indicam amplificações a partir de um cDNA MMLV e as setas vermelhas indicam amplificações a partir de um cDNA randômico.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para glicoproteína da amostra brbvusp01/06.

O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1. Na canaleta 2 aparece o resultado para a combinação F1+D, na canaleta 3 para A+R1, em 4 o resultado de C+R1, em 5 aparece A+D e em 6 aparece o resultado para a combinação C+D. Os resultados positivos estão assinalados pelas setas vermelhas.

A amplificação dos fragmentos de glicoproteína gerados a partir dos primers A+R1 (836 pb), A+D (2.141 pb), F1+D (1.433 pb), C+R1 (901 pb) e C+D (2.206 pb) foi eficiente para a amostra controle brbvusp01/06. Com estas combinações de *primers* foi possível a obtenção de material de melhor qualidade para o sequenciamento onde os fragmentos

apresentavam grande quantidade de material genético amplificado (Figura 10). Nos produtos amplificados onde o fragmento era único a reação de sequenciamento foi realizada diretamente não sendo necessária a etapa de purificação.

Utilizando o cDNA longo padronizado nas primeiras etapas deste projeto foi possível amplificar com sucesso as combinações GliPol1F+GliPol2R (2.056 pb), GliPol2F+GliPol2R (1.184 pb), GliPol3F+GliPol3R (1.130 pb), Pol1F+Pol1R (1.049 pb), Pol1F+Pol2R (2.149 pb), Pol3F+Pol4R (1.410 pb) e Pol3F+Final (1.699 pb), resultando na amplificação total do genoma viral.

Combinações dos demais iniciadores da polimerase também foram testadas a partir do cDNA longo com sucesso para fragmentos de diversos tamanhos: GliPol1F+GliPol3R (fragmento esperado 3.034 pb), GliPol1F+GliPol2R (2.056 pb resultado positivo na figura 12), GliPol1F+GliPol1R (1.030 pb resultado positivo na Figura 13), GliPol2F+GliPol2R (1.184 pb), GliPol3F+GliPol3R (1.130 pb resultado positivo na Figura 11 canaletas 1 e 4), GliPol3F+Pol1R (2.076 pb), Pol1F+Pol3R (3.033 pb), Pol1F+Pol1R (1.049 pb), Pol2F+FINAL (2.926 pb), Pol2F+Pol4R (2.637 pb), Pol2F+Pol3R (2.219 pb), Pol2F+Pol2R (1.335 pb), Pol3F+Pol3R (992 pb), Pol3F+FINAL (1.699 pb), Pol4F+FINAL (1.076 pb) e Pol4F+Pol4R (787 pb).

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.

O marcador de peso molecular na canaleta identificada com PM. Amplificação realizada com os *primers* GliPol1F+GliPol1R (1.030 pb) e cDNA sintetizado com Sistema *SuperScript*TM. As canaletas 1 e 2 estão vazias, na canaleta 4 aparece o controle negativo. Na canaleta 3 está a amplificação da amostra brbvusp01/06, na canaleta 5 da amostra brdrusp100/07 e na canaleta 6 da amostra brsgusp32/07. A seta vermelha indica o resultado positivo.

O protocolo de temperatura de anelamento foi testado para cada combinação de oligonucleotídeos, porém foram observados resultados positivos para apenas 3 combinações, GliPol1F+GliPol1R (1.030pb), GliPol3F+GliPol3R (1.133 pb) e GliPol1F+GliPol2R (2.046 pb), figuras 11, 12 e 13 respectivamente.

A figura 11 mostra os resultados para a combinação GliPol1F+GliPol1R (1.030 pb) que amplifica um fragmento inicial da polimerase viral. Apenas na canaleta 3 pode ser visualizado o resultado positivo para a amostra controle brbvusp01/06.

As amplificações da polimerase viral, a partir do cDNA longo, com os *primers* GliPol3F+GliPol3R (1.133 pb) e GliPol1F+GliPol2R (2.046 pb) foram positivas para a amostra controle brbvusp01/06 (figuras 12 e 13). Nestes testes de amplificação os resultados para a amostra brdrusp100/07 foram negativos.

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5% fragmentos da polimerase viral.

O marcador de peso molecular aparece na canaleta 5. Nas canaletas de 1 a 4 GliPol3F+GliPol3R (1.133 pb) e de 6 a 7 SeqN+304 (787 pb). Nas canaletas 1 e 7 aparecem uma amostra de outra variante testada paralelamente e em 3 e 9 a amostra brbvusp01/06. Nas canaletas 2 e 8 estão a amostra brdrusp100/07, em 3 e 6 aparecem os controles negativos. As setas vermelhas indicam os fragmentos amplificados.

A combinação GliPol1F+GliPol2R (2.046 pb) foi novamente testada para as duas amostras em estudo e em duplicata a partir de cDNAs específicos para polimerase viral sintetizados com os sistemas SuperScript™ e *c-Master*. Os resultados positivos para a

amostra controle brbvusp01/06 e o resultado negativo para a amostra brdrusp100/07 são visualizados na figura 13. Todos os testes com o kit *c-Master* foram negativos.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral

O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1. Amplificação realizada com os *primers* GliPol1F+GliPol2R (2.056 pb). As canaletas 5 e 8 estão vazias, na canaleta 4 aparece o controle negativo. Nas canaletas 3 e 10 aparecem a amostra brbvusp01/06 amplificadas a partir de cDNA sintetizado com Sistema *SuperScript*TM, nas canaletas 2 e 9 aparecem a amostra brdrusp100/07 (cDNA sintetizado com Sistema *SuperScript*TM), na canaleta 6 a amostra brdrusp100/07 (cDNA Sistema *c-Master*) e na canaleta 7 a amostra brbvusp01/06 amplificada a partir de cDNA sintetizado com Sistema *c-Master*. As setas vermelhas indicam os resultados positivos, apenas em 3 e 10.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de um gradiente de temperatura para a amostra controle brbvusp01/06.

48 °C nas canaletas 1, 8 e 15, 50 °C em 2, 9 e 16, 52 °C em 3, 10 e 17, 54 °C em 4, 11 e 18, 56 °C em 5, 12 e 19 e 58 °C em 6, 13 e 20. O marcador de peso molecular que aparece nas canaletas 7 e 14. Nas canaletas de 1 a 6 aparecem os resultados para a combinação Pol1F+Pol1R (1.049 pb), nas canaletas de 08 a 13 para a combinação Pol1F+Pol2R (2.149 pb) e nas canaletas de 14 a 20 aparece a combinação Pol3F+Pol4R (1.410 pb).

As combinações Pol1F+Pol1R (1.049 pb), Pol1F+Pol2R (2.149 pb) e Pol3F+Pol4R (1.410 pb) com amostra bovina para amplificação da polimerase viral, submetidas a testes de gradiente para a identificação da temperatura ótima de anelamento de 48 °C a 58 °C com aumento de 2 °C em cada reação, indicaram 52 °C para Pol1F+Pol1R e 56 °C para as combinações Pol1F+Pol2R e Pol3F+Pol4R como as temperaturas ótimas de anelamento (Figura 14).

A partir das padronizações descritas anteriormente, utilizando a amostra brbvusp01/06, os testes de amplificação foram aplicados para a amostra de vírus da raiva isolada de morcego hematófago *D. rotundus* brdrusp100/07. Os resultados da PCR, com a amostra de morcego, positivos para o conjunto de oligonucleotídeos GliPol3F+GliPol3R (1.130 pb) e negativo para GliPol1F+GliPol2R (2.056 pb) são apresentados na figura 15.

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.

O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1. Amplificação realizada com os *primers* GliPol1F+GliPol2R (2.056 pb) na canaleta 2 onde aparece a amostra brbvusp01/06, na canaleta 3 aparece o controle negativo, a canaleta 4 está vazia. Nas canaletas de 5 a 9 estão os testes com os *primers* GliPol3F+GliPol3R (1.130 pb). Nas canaletas 5 e 6 aparece a amostra brdrusp100/07 amplificada a partir de cDNA longo, nas canaletas 7 e 8 aparece a amostra brbvusp01/06, na canaleta 9 aparece o controle negativo.

Com o intuito de aperfeiçoar o rendimento da reação de amplificação para o conjunto Pol1F+Pol2R (2.149 pb) foi testado uma variação no número de ciclos da reação de PCR (*touchdown*) para as amostras de bovino e de morcego hematófago. Os resultados foram comparados com os obtidos na opção de ciclos utilizados nos testes anteriores mostrando que a otimização do ciclo foi mais eficiente para essa combinação de *primers* (Figura 16).

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.

O fragmento amplificado foi de 2.149 pb amplificados com os oligonucleotídeos Pol1F+Pol2R. O marcador de peso molecular aparece na canaleta 6. Nas canaletas 1 e 3 aparecem os resultados para a amostra brbvusp01/06 e em 2 e 4 a amostra brdrusp100/07, em 5 aparece a amostra brsgusp32/07. Nas canaletas 1 e 2 foram utilizados 35 ciclos e nas canaletas 3, 4 e 5 foram utilizados o *touchdown* de 40 ciclos. As setas vermelhas indicam a comparação entre os fragmentos da amostra brbvusp01/06 e as setas azuis indicam a comparação entre os ciclos para a amostra brdrusp100/07.

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.

O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1. Nas canaletas 2 e 3 aparece a amostra brdrusp100/07 e em 4 e 5 a amostra brbvusp01/06, em 6 aparece o controle negativo. As setas vermelhas indicam os fragmentos de 1.699 pb amplificados com os oligonucleotídeos Pol3F+Final.

O resultado positivo para as amostras de bovino brbvusp01/06 e morcego hematófago brdrusp100/07, com o conjunto Pol3F+Final (1.699 pb), que amplifica um fragmento da porção terminal da polimerase e a região 5' *Trailer*, está apresentado na figura 17.

A figura 18 mostra um exemplo da quantificação do fragmento viral amplificado com as combinações de iniciadores Pol1F+Pol2R (2.149 pb) e P784+304 (849 pb). O teste foi realizado para as amostras brdrusp100/07 (canaletas 2, 4 e 7), brbvusp01/06 (canaletas 3, 5 e 8) e brsgusp32/07 (canaletas 6 e 9), onde podem ser visualizados fragmentos apresentando de menos de 10ng/4μL de DNA (canaleta 2) a próximo de 120ng/4μL (canaleta 8). Foram aplicados 4μL de cada amostra e também do *low DNA mass ladder* Invitrogen® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para fragmentos da polimerase viral.

O marcador de peso molecular na canaleta 11. Na canaleta 1 aparece o *low DNA mass ladder* e nas canaletas de 2 a 6 aparecem os fragmentos amplificados da polimerase com os oligonucleotídeos Pol1F+Pol2R (2.149 pb). Nas canaletas de 7 a 9 aparecem os fragmentos amplificados de 849 pb de nucleoproteína com o conjunto P784+304. Na canaleta 10 aparece o controle negativo. As setas azuis indicam a comparação entre os fragmentos da amostra brbvusp01/06 nas canaletas 3 e 5 para diferentes ciclos de amplificação da polimerase e na canaleta 8 da nucleoproteína e as setas vermelhas indicam a comparação entre os fragmentos da amostra brdrusp100/07 nas canaletas 2 e 4 para diferentes ciclos da polimerase e na canaleta 7 da nucleoproteína. A amostra brsgusp32/07 aparece nas canaletas 6 e 9.

Com objetivo de amplificar o gene da Polimerase e o genoma completo do vírus da raiva, a partir de uma única reação com uso de cDNA longo, foram realizados ensaios com o Kit *Expand Long Template PCR System*[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e as amostras controle de bovino brbvusp01/06 e de morcego brdrusp100/07. Foram testadas tanto a combinação de *primers* GliPol1F+FINAL (6.650 pb) para amplificação da polimerase, quanto as combinações Início+FINAL (11.932 pb) e Início+Pol4R (11.643 pb) para a amplificação do genoma completo. Os resultados destes ensaios foram fracamente positivos apenas para amplificação do genoma completo da amostra controle brbvusp01/06 (Figura 19).

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação do genoma completo.

O marcador de peso molecular aparece nas canaletas 8 (a e b). Em (a) os testes para a combinação Início+FINAL e em (b) Início+Pol4R, nas canaletas de 1 a 4 estão testes com diferentes quantidades de cDNA para a amostra brbvusp01/06, na canaleta 5 aparece a amostra brdrusp100/07, e nas canaletas 6 e 7 a amostra brbvusp01/06 em duplicata com fragmentos superiores a 10 kb indicados pelas setas vermelhas, em 8 está o marcador de 1Kb. Testes realizados com enzima *Expand Long*.

Após a obtenção do fragmento de DNA viral longo contendo o genoma viral completo (cerca de 12Kb), foram realizados ensaios de sequenciamento sem sucesso, possivelmente devido a baixa quantidade de material obtida após a PCR. Com intuito de concentrar o material amplificado, foi testado a realização de uma reação de Nested-PCR e de SemiNested-

PCR, porém não foi observado amplificação mesmo após o uso destes protocolos. Os resultados obtidos nesta etapa demonstraram que, a metodologia utilizada para a concentração não se mostrou satisfatoriamente eficiente.

Com objetivo de possibilitar o sequenciamento direto de fragmentos longos, foram retomados os testes para a amplificação de todo o genoma viral em uma única reação (11.932 pb) utilizando o kit *Expand Long Template PCR System* (Roche® Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Ao serem realizadas adaptações nas quantidades de enzima e dos diferentes tampões os resultados obtidos nestes ensaios foram promissores (Figura 20) uma vez que geraram bandas com maior intensidade quando comparado aos resultados do primeiro ensaio com este kit (Figura 19)

Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 1,0% da amplificação do genoma completo.

O marcador de peso molecular pode ser visualizado na canaleta 1. Nas canaletas 3 e 5 aparecem o resultado para a combinação Início+FINAL (11.932 pb) para a amostra brbvusp01/06 em duplicata as canaletas de 2 e 4 estão vazias. Os fragmentos superiores a 10kb estão indicados pelas setas vermelhas.

5.4 Quantificação e Sequenciamento

Após a amplificação e purificação dos fragmentos, os mesmos foram quantificados com o equipamento Thermo Scientific NanoDrop™1000 Spectrophotometer_{Thermo} (Thermo

Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos), para serem usados como molde na reação de sequenciamento (Figura 21 e 22).

ND-1000 Data Viewer.vi

File Configuration Data Reports Help

Plots Report Test type: Nucleic Acid

Report Name Max Buffer Size 200 Buffer Mode Save Report & Clear

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.
G2_bov_pol	Default	22/5/2009	14:45	7.55	0.151	0.089	1.69	1.48	50.00	230	0.102
H2_bov_pol	Default	22/5/2009	14:46	9.41	0.188	0.114	1.65	0.96	50.00	230	0.196
G4_bov_pol	Default	22/5/2009	14:47	14.83	0.297	0.176	1.69	0.80	50.00	230	0.369
H4_bov_pol	Default	22/5/2009	14:48	8.12	0.162	0.086	1.89	1.83	50.00	230	0.089
C+ bov_pol	Default	22/5/2009	14:48	6.61	0.132	0.074	1.80	2.17	50.00	230	0.061
C+ bov_N	Default	22/5/2009	14:49	10.78	0.216	0.125	1.73	1.17	50.00	230	0.184
Sagui_1070-05_N	Default	22/5/2009	14:51	26.24	0.525	0.327	1.60	0.64	50.00	230	0.825
Sagui_Polime_1070-05	Default	22/5/2009	14:53	12.57	0.251	0.131	1.92	1.14	50.00	230	0.221
Sagui_Nucleo_1070-05	Default	22/5/2009	14:54	4.60	0.092	0.054	1.69	1.65	50.00	230	0.056

Figura 21. Visualização da quantificação de DNA

A amostra brsgusp32/07 (proveniente de sagui e identificada para o teste como 1070/05) e amostra brbvusp01/06 (identificada para o teste como BOV012/06). A quantidade de DNA está destacada. Cada linha representa um fragmento amplificado.

ND-1000 Data Viewer.vi

File Configuration Data Reports Help

Plots Report Test type: Nucleic Acid

Report Name Max Buffer Size 200 Buffer Mode Save Report & Clear

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.
Bov 012/06 V3	Default	25/5/2009	15:08	100.42	2.008	1.315	1.53	1.12	50.00	230	1.796
Bov 012/06 V3 MMLV Pol	Default	25/5/2009	15:09	113.11	2.262	1.465	1.54	1.11	50.00	230	2.033

Figura 22. Visualização da quantificação de DNA para a amostra brbvusp01/06.

A amostra brbvusp01/06 (identificada para o teste como BOV012/06). A quantidade de DNA está destacada. Cada linha representa um fragmento amplificado.

Os produtos quantificados foram sequenciados e analisados. Inicialmente foram alinhadas as sequências dos genes codificadores para a nucleoproteína e glicoproteína para a observação dos sítios antigênicos. No sítio antigênico I, localizado na região carboxi terminal da nucleoproteína, foram identificadas substituições de aminoácidos nos resíduos 377 a 379, próprias da variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* (Figura 23). No gene

codificador para a glicoproteína apenas foi observada uma substituição no resíduo 218 presente no sítio antígeno IIa (Figura 24).

Figura 23. Ilustração comparativa do sítio antígeno I na região carboxi terminal da nucleoproteína N. Observação das modificações de aminoácidos do sítio antígeno I na região carboxi-terminal da nucleoproteína e observação da Serina conservada entre os vírus da raiva padrão PV (NC_001542), amostra controle bovino brbrvusp01/06 (GU592649) e amostra morcego brdrusp100/07 (GU592648) do Brasil, cão da Guiana (EU293113), raposa da França (EU293115), morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* da Argentina (EU293116) e sagui *Callithrix jacchus* do Brasil (brsgusp32/07), amostras representativas de ciclos de transmissão no Brasil.

Figura 24. Ilustração comparativa dos sítios antígenicos localizados na glicoproteína G. Observação das modificações de aminoácidos nos sítios antígenicos IIB, IIA e III na Glicoproteína entre as amostras de vírus da raiva PV (NC_001542), brbrvusp01/06 (GU592652) e brdrusp100/07 (bovino e morcego *Desmodus rotundus* do Brasil), EU293113 (cão da Guiana), EU293115 (raposa da França), EU293116 (morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* da Argentina) e brsgusp32/07 (sagui *Callithrix jacchus* do Brasil), padrão e amostras representativos de ciclos de transmissão do vírus da raiva.

5.5 Análises Genealógicas

A análise do fragmento de 320 nucleotídeos do gene codificador para a nucleoproteína confirmou a variante genética relacionada à mantida por populações de morcegos hematófagos *D. rotundus* como pode ser visualizada na figura 25.

Figura 25. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para nucleoproteína (parcial).

Análise 320 nucleotídeos da região carboxi terminal da nucleoproteína, reconstruída pelo programa MEGA4 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo "NJ". Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

O sequenciamento e alinhamento dos fragmentos amplificados dos genes N, P, M, G e partes do gene L, resultaram nas análises genealógicas para cada um dos genes (N, P, M, G) e fragmentos (L) de interesse, para a amostra controle brbvusp01/06 e para a amostra de morcego brdrusp100/07, sendo completamente sequenciados e alinhados com todas as sequências completas depositadas no *GenBank* (ANEXO A), que podem ser visualizadas nas figuras 25, 26, 27, 28 (a, b, c), 29 e 30 para a nucleoproteína, 31, 32, 33 (a, b), 34 e 35 para a fosfoproteína, 36, 37, 38 (a, b, c), 39 e 40 para a proteína de matriz, 41, 42, 43 (a, b, c, d), 44 e 45 para a glicoproteína e 47 a 65(a, b, c, d, e) para a polimerase viral.

Segmentos foram obtidos a partir do sequenciamento para as duas amostras estudadas brbvusp01/06 e brdrusp100/07: 1353 nucleotídeos para a nucleoproteína (450 aminoácidos e um códon de terminação), 894 nucleotídeos do gene codificador para fosfoproteína (297 aminoácidos e um códon de terminação), 609 nucleotídeos do gene codificador da proteína de matriz (202 aminoácidos e um códon de terminação), 1575 nucleotídeos correspondentes ao gene codificador para a glicoproteína (524 aminoácidos e um códon de terminação) e fragmentos da polimerase. Os fragmentos descontínuos do gene L para a amostra brbvusp01/06 foram de 801 nucleotídeos (fragmento 1 com 266 aminoácidos, posição 5417 a 6217 da amostra de referência PV, iniciando no primeiro nucleotídeo do códon *start* da amostra brbvusp01/06), 786 nucleotídeos (fragmento 2 com 262 aminoácidos, posição 7202 a 7987 da amostra PV), 864 nucleotídeos (fragmento 3 com 288 aminoácidos, posição 8345 a 9209 da amostra PV) e 2519 nucleotídeos (fragmento 4 com 840 aminoácidos, posição 9369 a 11887 da amostra PV, incluindo o códon de terminação da amostra brbvusp01/06), totalizando 4970 (76,3%) de 6515 nucleotídeos na amostra PV.

Em relação à amostra isolada do morcego brdrusp100/07 foram sequenciados 711 nucleotídeos (fragmento 2a com 236 aminoácidos na posição 7241 a 7951 da amostra PV), 357 nucleotídeos (fragmento 3a com 119 aminoácidos na posição 8765 a 9122 da amostra PV), 801 nucleotídeos (fragmento 4a com 267 aminoácidos na posição 9423 a 10223 da amostra PV), 657 nucleotídeos (fragmento 4b com 219 aminoácidos na posição 10320 a 10977 da amostra PV) e 387 nucleotídeos (fragmento 4c com 129 aminoácidos na posição 11466 a 11852 da amostra PV, incluindo o códon de terminação da amostra brdrusp100/07), o que representa 44,7% (2913 nucleotídeos) da amostra de referência PV.

A região codificante para nucleoproteína compreende 1353 nucleotídeos (450 aminoácidos e um códon de terminação) na posição 71 a 1424 do genoma viral (referência amostra PV – NC_001542). Nas figuras 26 e 27 pode ser visualizado resultado da análise de toda a região codante da nucleoproteína. Na árvore da figura 26 foram destacados em

vermelho o clado onde segregaram todas as amostras pertencentes à variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* (incluindo as amostras deste estudo brbvusp01/06 e brdrusp100/07 também destacadas em vermelho), em azul os dois clados onde se agruparam as amostras do ciclo terrestre de transmissão (inclusive a amostra padrão PV), em azul mais claro o clado onde segregaram as amostras pertencentes à variante mantida pelo morcego insetívoro *T. brasiliensis*, e dois grandes clados (sem destaque de cor) para as amostras oriundas de morcegos não hematófagos.

Figura 26. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para nucleoproteína.

Análise (completa), reconstruída pelo programa MEGA4 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 27. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para nucleoproteína.
 Análise (completa), construída pelo programa Garli e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gamma+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Na árvore reconstruída para a nucleoproteína (Figura 27) aparecem destacados em vermelho o clado onde segregaram todas as amostras pertencentes à variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* (incluindo as amostras deste estudo brbvusp01/06 e brdrusp100/07 também destacadas em vermelho), em azul os dois clados onde se agruparam as amostras do ciclo terrestre de transmissão (inclusive a amostra padrão PV), em azul mais escuro o clado onde segregaram as amostras pertencentes à variante mantida pelo morcego insetívoro *T. brasiliensis*, cinco clados (sem destaque de cor) para as amostras oriundas de morcegos não hematófagos e uma amostra de morcego não hematófago GU644759 segregou isoladamente, além da amostra proveniente de um sagui que também segregou no ciclo aéreo de transmissão.

Com a análise dos aminoácidos da proteína N (Tabela 3) foi possível observar 21 substituições de aminoácidos quando as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 foram comparadas à amostra de referência PV (NC_001542). Nove substituições foram do tipo não conservativa para a amostra brbvusp01/06 (bovino) e dez para a amostra brdrusp100/07 (morcego).

Tabela 3 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína N

Resíduo	brdrusp100/07	brbvusp01/06	PV-NC_001542	Tipo de substituição
40	Serina	Serina	Cisteína	Não Conservativa
50	Histidina	Serina	Asparagina	Não Conservativa / Conservativa
56	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
59	Glicina	Glicina	Cisteína	Conservativa
61	Asparagina	Asparagina	Serina	Conservativa
84	Serina	Serina	Treonina	Conservativa
95	Leucina	Leucina	Valina	Conservativa
106	Asparagina	Ácido Aspartico	Glicina	Não Conservativa/Não Conservativa
110	Ácido Aspartico	Ácido Aspartico	Ácido Glutâmico	Conservativa
112	Arginina	Arginina	Lisina	Conservativa
135	Serina	Serina	Prolina	Não Conservativa
157	Asparagina	Asparagina	Serina	Conservativa
179	Alanina	Alanina	Valina	Conservativa
257	Leucina	Leucina	Isoleucina	Conservativa
332	Treonina	Treonina	Alanina	Não Conservativa
377	Alanina	Alanina	Treonina	Não Conservativa
378	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Treonina	Não Conservativa
379	Treonina	Treonina	Valina	Não Conservativa
397	Serina	Serina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
410	Metionina	Metionina	Isoleucina	Conservativa
433	Treonina	Treonina	Alanina	Não Conservativa

As figuras 28a (resíduo 377), 28b (resíduo 397) e 28c (resíduo 433) mostram três sítios da nucleoproteína onde ocorreu a substituição de aminoácidos da variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* quando comparadas as outras sequências de diferentes variantes. As figuras foram obtidas pela análise dos dados pelo programa MacClade (Maddison e Maddison, 2000).

Figura 28a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 377 da nucleoproteína.

Em azul pode ser vista a Alanina conservada para as amostras brbvusp01/06, brdrusp100/07 e demais amostras da variante mantida pelo morcego hematófago.

Figura 28b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 379 da nucleoproteína.

Em marrom pode ser vista a Treonina conservada para as amostras brbvusp01/06, brdrusp100/07 e demais amostras da variante mantida pelo morcego hematófago.

Figura 28c. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 433 da nucleoproteína.

A Treonina conservada pode ser vista para as amostras brbvusp01/06, brdrusp100/07 e demais amostras da variante mantida pelo morcego hematófago.

A figura 29 obtida pela análise das sequências de nucleotídeos pelo programa MacClade (Maddison e Maddison, 2000) mostra a frequência geral de aminoácidos considerando todas as sequências utilizadas para a reconstrução da árvore filogenética. O aminoácido mais frequente foi a Serina e o menos frequente foi o Triptofano. A figura 30 indica as mudanças de aminoácidos em todos os sítios da nucleoproteína, análise dos dados pelo programa MacClade (Maddison e Maddison, 2000), onde pode ser observado que as maiores taxas de mudanças aconteceram do aminoácido Lisina (K) para Arginina (R), Treonina (T) para Alanina (A) e Valina (V) para Isoleucina (I).

Figura 29. Gráfico com frequência de aminoácidos na nucleoproteína.
Análise para todas as sequências utilizadas na reconstrução da árvore

Figura 30. Gráfico de substituição de aminoácidos na nucleoproteína.
Análise para todas as sequências utilizadas na reconstrução da árvore

A região codificante para fosfoproteína compreende 894 nucleotídeos (297 aminoácidos e um códon de terminação) na posição 1514 a 2407 do genoma. Com a análise dos aminoácidos da proteína P (Tabela 4) foi possível observar um grande número de substituições de aminoácidos, 52 substituições quando a amostra brbvusp01/06 foi comparada à amostra de referência PV (NC_001542) e 51 quando a amostra brdrusp100/07 foi comparada ao padrão.

Tabela 4- Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína P

Resíduo	brdrusp100/07	brbvusp01/06	PV-NC_001542	Tipo de substituição
29	Alanina	Alanina	Asparagina	Não Conservativa
42	Ácido Aspartico	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico	Conservativa
48	Serina	Serina	Asparagina	Conservativa
54	Arginina	Arginina	Glicina	Não Conservativa
57	Glutamina	Glutamina	Histidina	Não Conservativa
61	Ácido Aspartico	Ácido Aspartico	Glicina	Não Conservativa
63	Prolina	Prolina	Serina	Não Conservativa
64	Serina	Serina	Prolina	Não Conservativa
65	Glicina	Glicina	Asparagina	Conservativa
66	Leucina	Prolina	Prolina	Não Conservativa
68	Serina	Serina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
69	Treonina	Treonina	Metionina	Não Conservativa
72	Alanina	Alanina	Valina	Conservativa
75	Serina	Serina	Glicina	Conservativa
77	Cisteína	Cisteína	Tirosina	Conservativa
78	Glutamina	Glutamina	Arginina	Não Conservativa
79	Ácido Glutâmico	Glicina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
86	Alanina	Alanina	Glicina	Não Conservativa
90	Alanina	Alanina	Serina	Não Conservativa
102	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
108	Metionina	Metionina	Isoleucina	Conservativa
109	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
112	Glicina	Glicina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
126	Isoleucina	Valina	Isoleucina	Conservativa
130	Treonina	Treonina	Alanina	Não Conservativa
134	Serina	Serina	Prolina	Não Conservativa
135	Glicina	Glicina	Asparagina	Conservativa
136	Alanina	Alanina	Prolina	Conservativa
141	Leucina	Leucina	Serina	Não Conservativa
142	Lisina	Lisina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
143	Treonina	Ácido Aspartico	Ácido Aspartico	Não Conservativa
144	Arginina	Lisina	Lisina	Conservativa
145	Leucina	Alanina	Serina	Não Conservativa
149	Treonina	Valina	Treonina	Não Conservativa
153	Valina	Valina	Leucina	Conservativa
154	Alanina	Alanina	Lisina	Não Conservativa
159	Serina	Serina	Prolina	Não Conservativa
160	Alanina	Alanina	Treonina	Não Conservativa
161	Serina	Serina	Prolina	Não Conservativa
165	Alanina	Alanina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
168	Prolina	Prolina	Serina	Não Conservativa
171	Alanina	Valina	Alanina	Conservativa
172	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
178	Valina	Valina	Alanina	Conservativa
188	Valina	Valina	Alanina	Conservativa
189	Alanina	Alanina	Treonina	Não Conservativa
195	Prolina	Prolina	Leucina	Conservativa
223	Fenilalanina	Fenilalanina	Leucina	Conservativa
241	Serina	Serina	Alanina	Não Conservativa
252	Histidina	Histidina	Arginina	Conservativa
280	Prolina	Prolina	Serina	Não Conservativa
281	Ácido Aspártico	Ácido Aspartico	Asparagina	Não Conservativa
284	Asparagina	Asparagina	Serina	Conservativa
295	Alanina	Alanina	Treonina	Não Conservativa
297	Prolina	Prolina	Cisteína	Não Conservativa

As amostras estudadas apresentaram 29 substituições não conservativas em comum quando foram comparadas ao padrão além de duas substituições não conservativas apenas na amostra brbvusp01/06 e outras duas substituições não conservativas para a amostra brdrusp100/07.

A figura 31 mostra em azul o ciclo terrestre de transmissão com a amostra referência PV em evidência e em vermelho aparecem as amostras da variante mantida por morcegos hematófagos. As amostras deste estudo brbvusp01/06 e brdrusp100/07 estão salientadas em vermelho.

Figura 31. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a fosfoproteína.

Reconstruída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo "NJ". Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

A figura 32 é uma árvore de máxima verossimilhança, realizada pelo programa GARLi, onde as amostras relacionadas ao morcego hematófago *D. rotundus* aparecem destacadas em vermelho e o ciclo terrestre de transmissão aparece em azul.

Figura 32. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a fosfoproteína.

Reconstruída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 33a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 68 da fosfoproteína.

Em amarelo pode ser vista a Serina conservada para a variante mantida por morcegos hematófagos as setas vermelhas indicam as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07.

Figura 33b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 112 da fosfoproteína.

Em rosa pode ser vista a Glicina conservada para a variante mantida por morcegos hematófagos as setas vermelhas indicam as amostras brbvusp01/06 e brdr100/07.

As figuras 33a e 33b demonstram dois dos três resíduos de aminoácidos específicos para a variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*. O resíduo 61 com uma

Asparagina é primeiro próprio da variante do morcego hematófago. Na figura 33a aparece o resíduo 68 com a Serina e na figura 33b o resíduo 112 com a Glicina.

Figura 34. Gráfico com frequência de aminoácidos na fosfoproteína.
Análise para todas as sequências utilizadas na reconstrução da árvore.

Figura 35. Gráfico de substituição de aminoácidos na fosfoproteína.
Análise para todas as sequências utilizadas na reconstrução da árvore.

A figura 34 mostra a frequência geral de aminoácidos para a fosfoproteína sendo o mais frequente a Serina e o menos frequente a Cisteína. A figura 35 indica as taxas de mudanças de aminoácidos na fosfoproteína, onde pode ser observado que as maiores taxas de mudanças aconteceram do aminoácido Asparagina (N) para Glicina (G), Lisina (K) para Alanina (A) e Valina (V) para Leucina (L).

A proteína de matriz (M) apresentou uma região de 609 nucleotídeos compreendidos entre a posição 2496 e a posição 3104 do genoma viral que codifica 202 aminoácidos e um códon de terminação na posição 2496 a 3104 do genoma.

Na figura 36 em azul aparece o ciclo terrestre de transmissão e em vermelho o clado representante da variante mantida por morcegos hematófagos.

Figura 36. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para proteína de matriz. Reconstruída pelo programa MEGA4 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 37. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para proteína de matriz. Reconstruída pelo programa Garli e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Na figura 37 em vermelho aparecem as amostras relacionadas à variante mantida por morcegos hematófagos e em azul as amostras relacionadas ao ciclo terrestre de transmissão para a proteína de matriz.

Com a análise dos aminoácidos da proteína de matriz (Tabela 5) foi possível as substituições de aminoácidos, 26 substituições sendo oito delas não conservativas para a amostra brdrusp100/07 e dez para amostra brbvusp01/06 quando comparadas à amostra de referência PV (NC_001542).

Tabela 5 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína M

Resíduo	brdrusp100/07	brbvusp01/06	PV-NC_001542	Tipo de substituição
7	Metionina	Metionina	Isoleucina	Conservativa
21	Leucina	Leucina	Prolina	Conservativa
22	Valina	Isoleucina	Valina	Conservativa
26	Prolina	Prolina	Leucina	Conservativa
46	Glicina	Glicina	Serina	Conservativa
50	Metionina	Metionina	Arginina	Não Conservativa
58	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Glicina	Não Conservativa
70	Arginina	Arginina	Glicina	Não Conservativa
80	Asparagina	Asparagina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
82	Leucina	Leucina	Isoleucina	Conservativa
87	Glutamina	Ácido Glutâmico	Histidina	Não Conservativa
90	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
97	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
108	Ácido Glutâmico	Glicina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
109	Glicina	Valina	Glicina	Não Conservativa
110	Metionina	Leucina	Metionina	Conservativa
126	Ácido Aspártico	Glicina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
147	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Asparagina	Não Conservativa
148	Alanina	Alanina	Treonina	Conservativa
154	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
160	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
165	Glutamina	Ácido Glutâmico	Arginina	Não Conservativa
178	Cisteína	Cisteína	Glicina	Conservativa
184	Leucina	Leucina	Metionina	Conservativa
192	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico	Conservativa
199	Valina	Valina	Leucina	Conservativa

As figuras 38a e 38b e 38c, logo a seguir, são exemplos da visualização dos dados pelo MacClade (Maddison e Maddison, 2000) para a proteína de matriz e nelas podem ser vistas três das substituições próprias para a variante genética mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* no aminoácido 82, 148 e no aminoácido 184 respectivamente além do resíduo 192 que nesta variante apresenta um Ácido Aspártico enquanto a amostra PV apresenta um Ácido Glutâmico.

Figura 38a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 82 da proteína de matriz.

Em azul escuro pode ser visado a Leucina para as amostras com variante genética mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* entre elas as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07.

Figura 38b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 148 da proteína de matriz.

Em azul claro pode ser vista a Isoleucina para as amostras com variante genética mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* entre elas as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07, e a Treonina para as demais amostras analisadas.

Figura 38c. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 184 da proteína de matriz. Em azul escuro pode ser vista a Leucina para as amostras com variante genética mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* entre elas as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07, e a Isoleucina para as demais amostras analisadas.

Figura 39. Gráfico com frequência de aminoácidos na proteína de matriz. Análise para todas as sequências utilizadas na reconstrução da árvore.

A figura 39 mostra a frequência geral de aminoácidos para a proteína de matriz sendo o mais frequente a Leucina e o menos frequente a Histidina. A figura 40 indica as taxas de mudanças de aminoácidos na proteína de matriz, onde pode ser observado que as maiores taxas de mudanças aconteceram do aminoácido Valina (V) para Isoleucina (I) / Isoleucina (I) para Valina (V), Leucina (L) para Prolina (P) e de Alanina (A) para Valina (V).

Figura 40. Gráfico de substituições de aminoácidos na proteína de matriz.
Análise para todas as sequências utilizadas na reconstrução da árvore

A partir da análise de nucleotídeos obtida após o sequenciamento de todo o gene codificador para a glicoproteína da amostra controle brbvusp01/06 e a comparação filogenética com dados disponíveis no *GenBank* (ANEXO A) que descrevem genes também completos da glicoproteína pudemos observar na árvore filogenética (figuras 41 e 42) que a amostra brbvusp01/06 segregou juntamente com amostras pertencentes ao ciclo aéreo de transmissão.

Figura 41. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para glicoproteína.

Reconstruída pelo programa MEGA4 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo "NJ". Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 42. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para glicoproteína. Reconstruída pelo programa GARLI e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GRT+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Tabela 6 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína G (Continua)

Resíduo	brdrusp100/07	brbvusp01/06	PV-NC_001542	Tipo de substituição
2	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
3	Leucina	Leucina	Prolina	Não Conservativa
11	Leucina	Fenilalanina	Leucina	Não Conservativa
13	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
14	Serina	Serina	Fenilalanina	Não Conservativa
15	Serina	Serina	Prolina	Não Conservativa
18	Leucina	Leucina	Fenilalanina	Não Conservativa
23	Isoleucina	Fenilalanina	Isoleucina	Não Conservativa
75	Valina	Valina	Metionina	Conservativa
109	Isoleucina	Isoleucina	Treonina	Não Conservativa
132	Glutamina	Glutamina	Histidina	Não Conservativa
137	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico	Ácido Aspártico	Conservativa
152	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
166	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
177	Lisina	Lisina	Asparagina	Não Conservativa
179	Leucina	Leucina	Serina	Não Conservativa
181	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
182	Treonina	Treonina	Alanina	Não Conservativa
201	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Asparagina	Não Conservativa
206	Treonina	Treonina	Metionina	Não Conservativa
213	Serina	Serina	Asparagina	Conservativa
215	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
218	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
223	Glicina	Glicina	Serina	Não Conservativa
224	Lisina	Lisina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
225	Treonina	Isoleucina	Treonina	Não Conservativa
261	Serina	Serina	Alanina	Não Conservativa
262	Isoleucina	Isoleucina	Metionina	Conservativa
266	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Asparagina	Não Conservativa
267	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico	Conservativa
274	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Glicina	Não Conservativa
283	Histidina	Histidina	Arginina	Conservativa
322	Tirosina	Histidina	Histidina	Não Conservativa
365	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
367	Arginina	Arginina	Glicina	Não Conservativa
368	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Glicina	Não Conservativa
373	Prolina	Prolina	Histidina	Não Conservativa
375	Ácido Aspártico	Asparagina	Asparagina	Não Conservativa
408	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Valina	Não Conservativa
427	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Asparagina	Não Conservativa
444	Lisina	Lisina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
445	Glutamina	Glutamina	Arginina	Não Conservativa
455	Serina	Serina	Asparagina	Conservativa
458	Arginina	Lisina	Lisina	Conservativa
460	Leucina	Leucina	Valina	Conservativa
462	Metionina	Metionina	Leucina	Conservativa
463	Isoleucina	Isoleucina	Serina	Não Conservativa
466	Glicina	Glicina	Alanina	Não Conservativa
468	Alanina	Alanina	Treonina	Não Conservativa
469	Treonina	Treonina	Alanina	Não Conservativa
471	Valina	Valina	Metionina	Conservativa
475	Cisteína	Cisteína	Fenilalanina	Não Conservativa
476	Serina	Leucina	Leucina	Não Conservativa
478	Alanina	Alanina	Treonina	Não Conservativa
480	Cisteína	Cisteína	Triptofano	Não Conservativa
483	Treonina	Treonina	Valina	Não Conservativa
484	Lisina	Lisina	Asparagina	Não Conservativa
485	Arginina	Glutamina	Arginina	Não Conservativa
486	Treonina	Treonina	Serina	Conservativa
488	Serina	Serina	Prolina	Não Conservativa
489	Arginina	Arginina	Treonina	Não Conservativa
490	Arginina	Arginina	Glutamina	Não Conservativa
491	Arginina	Arginina	Histidina	Conservativa
492	Ácido Aspártico	Glicina	Asparagina	Não Conservativa
493	Serina	Serina	Leucina	Não Conservativa
494	Arginina	Glicina	Arginina	Não Conservativa
495	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Glicina	Não Conservativa

Tabela 6 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína G (Conclusão)

Resíduo	brdrusp100/07	brbvusp01/06	PV-NC_001542	Tipo de substituição
496	Serina	Leucina	Treonina	Conservativa/ Não Conservativa
497	Ácido Glutâmico	Glicina	Glicina	Não Conservativa
498	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
499	Lisina	Lisina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
501	Treonina	Treonina	Serina	Conservativa
502	Valina	Alanina	Valina	Conservativa
506	Treonina	Treonina	Serina	Conservativa
507	Arginina	Arginina	Glicina	Não Conservativa
509	Valina	Valina	Isoleucina	Conservativa
510	Valina	Valina	Isoleucina	Conservativa
515	Leucina	Leucina	Serina	Não Conservativa
519	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Glicina	Não Conservativa
521	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico	Conservativa
522	Alanina	Alanina	Treonina	Não Conservativa
523	Serina	Arginina	Glicina	Não Conservativa

A tabela 6 compreende as substituições de aminoácidos das amostras brbvusp01/06 (77 substituições) e brdrusp100/07 (75 substituições) em relação à amostra de referência PV. Em negrito na tabela aparecem 55 substituições não conservativas sendo 45 delas para as duas amostras, 4 apenas para o morcego hematófago e 6 apenas para a amostra isolada do bovino.

A glicoproteína apresentou cinco resíduos próprios da variante mantida por morcegos hematófagos, 213 com uma Serina (figura 43a), 367 com uma Arginina (figura 43b), 427 com um Ácido Glutâmico, 475 com uma Cisteína (figura 43c) e 521 com um Ácido Aspártico. Outros três sítios 478 com uma Alanina (figura 43d), 489 com uma Arginina e 493 com uma Serina foram comuns para as variantes relacionadas à *D. rotundus* e *T. brasiliensis*.

Figura 43a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 213 da glicoproteína.

Em amarelo pode ser vista a Serina para as amostras com variante genética mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* entre elas as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07.

Figura 43b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 367 da glicoproteína. Em lilás pode ser vista a Arginina para as amostras com variante genética mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* entre elas as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07.

Figura 43c. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 475 da glicoproteína. Em rosa pode ser vista a Cisteína para as amostras com variante genética mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* entre elas as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07.

Figura 43d. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 478 da glicoproteína. Em azul claro pode ser vista a Alanina para as variantes mantidas por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*.

Figura 44. Gráfico com frequência de aminoácidos na glicoproteína. Análise para todas as sequências utilizadas na reconstrução da árvore

A figura 44 mostra a frequência geral de aminoácidos para a glicoproteína sendo o mais frequente a Leucina e o menos frequente a Glutamina. A figura 45 indica as taxas de mudanças de aminoácidos na proteína de matriz, onde pode ser observado que as maiores taxas de mudanças aconteceram do aminoácido Isoleucina (I) para Treonina (T) e de Serina (S) para Treonina (T).

Figura 45. Gráfico de substituição de aminoácidos na glicoproteína.
Análise para todas as sequências utilizadas na reconstrução da árvore.

A porção inicial da polimerase da amostra brbvusp01/06 foi sequenciada além de outros três fragmentos (fragmento 1 com 801 nucleotídeos, fragmento 2 com 786 nucleotídeos, fragmento 3 com 864 nucleotídeos e fragmento 4 com 2519 nucleotídeos) totalizando 4967 (76,2%) de 6515 nucleotídeos na amostra PV e na amostra brdrusp100/07 foram mapeados 2910 nucleotídeos em 5 fragmentos descontínuos (fragmento 2a com 708 nucleotídeos, fragmento 3a com 357 nucleotídeos, fragmento 4a com 801 nucleotídeos, fragmento 4b com 657 nucleotídeos e fragmento 4c com 387 nucleotídeos) totalizando 2910 (44,6%) de 6515 nucleotídeos na amostra PV.

A figura 46 é um esquema com todos os fragmentos obtidos para a polimerase. Em cada um dos fragmentos foram realizadas as análises de verossimilhança com o MEGA4 e

GARLi gerando 8 árvores para a amostra brbvusp01/06 (figuras 47 a 54) e 10 árvores para a amostra brdrusp100/07 (figuras 55 a 64) em todas elas o ciclo terrestre está identificado em azul e em a vermelho com a variante mantida por *D. rotundus*.

Figura 46. Esquema das regiões sequenciadas para a polimerase viral.

Amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 comparadas à amostra padrão PV-NC_001542.

Figura 47. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.

Análise da porção inicial da proteína L (fragmento 1), reconstruída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 48. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.

Análise da polimerase (parcial) da amostra brbvusp01/06 (fragmento 1), reconstruída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 49. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da proteína L (fragmento 2), reconstruída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 50. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brbvusp01/06 (fragmento 2), reconstruída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 51. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial do fragmento 3, reconstruída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo "NJ". Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 52. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brbvusp01/06 (fragmento 3), reconstruída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 53. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial (fragmento 4), construída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo "NJ". Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 54. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brvusp01/06 (fragmento 4), construída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 55. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 2a), construída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 56. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.
Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 2a), reconstruída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 57. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brusp100/07 (fragmento 3a), reconstruída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 58. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 3a), construída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 59. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 4a), construída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 60. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 4a), construída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 61. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 4b), construída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 62. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 4b), construída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gama+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 63. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase.

Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 4c), construída pelo programa MEGA 4.0 e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “NJ”. Os valores nos principais nós representam os valores de 10000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Figura 64. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para a polimerase. Análise parcial da amostra brdrusp100/07 (fragmento 4c), construída pelo programa GARLi e realizada uma busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo “GTR+gamma+I”. Os valores nos principais nós representam os valores de 1000 réplicas de *bootstrap* superiores a 50%.

Tabela 7 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína L (Continua)

Resíduo	brdrusp100/07	brbvusp01/06	PV-NC_001542	Tipo de substituição
2		Isoleucina	Leucina	Conservativa
8		Fenilalanina	Tirosina	Não Conservativa
17		Serina	Leucina	Não Conservativa
21		Serina	Prolina	Conservativa
24		Asparagina	Treonina	Conservativa
27		Isoleucina	Valina	Conservativa
46		Serina	Prolina	Conservativa
48		Lisina	Arginina	Conservativa
61		Leucina	Tirosina	Não Conservativa
73		Tirosina	Fenilalanina	Não Conservativa
74		Lisina	Arginina	Conservativa
88		Isoleucina	Leucina	Conservativa
93		Alanina	Metionina	Conservativa
107		Tirosina	Histidina	Não Conservativa
115		Lisina	Arginina	Conservativa
122		Ácido Glutâmico	Histidina	Não Conservativa
129		Alanina	Serina	Não Conservativa
136		Cisteína	Leucina	Não Conservativa
139		Ácido Glutâmico	Glicina	Não Conservativa
147		Treonina	Prolina	Conservativa
161		Lisina	Asparagina	Não Conservativa
170		Isoleucina	Treonina	Conservativa
180		Metionina	Isoleucina	Conservativa
189		Glicina	Metionina	Não Conservativa
205		Isoleucina	Valina	Conservativa
207		Glicina	Isoleucina	Não Conservativa
209		Arginina	Lisina	Conservativa
214		Leucina	Fenilalanina	Não Conservativa
217		Lisina	Glutamina	Não Conservativa
227		Asparagina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
230		Leucina	Tirosina	Não Conservativa
235		Glicina	Asparagina	Não Conservativa
252		Alanina	Serina	Não Conservativa
257		Histidina	Leucina	Não Conservativa
260		Isoleucina	Valina	Conservativa
261		Fenilalanina	Leucina	Não Conservativa
628	Valina	Leucina	Leucina	Conservativa
637	Ácido Glutâmico	Valina	Valina	Não Conservativa
645	Arginina	Arginina	Lisina	Conservativa
672	Triptofano	Triptofano	Arginina	Não Conservativa
681	Metionina	Metionina	Alanina	Conservativa
683	Glicina	Glicina	Asparagina	Não Conservativa
706	Glicina	Valina	Valina	Não Conservativa
717	Treonina	Treonina	Isoleucina	Não Conservativa
724	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
728	Glicina	Ácido Glutâmico	Glicina	Não Conservativa
729	Ácido Aspártico	Asparagina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
745	Arginina	Arginina	Glutamina	Não Conservativa
746	Lisina	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
754	Arginina	Serina	Serina	Não Conservativa
760	Leucina	Leucina	Fenilalanina	Não Conservativa
765	Valina	Alanina	Alanina	Conservativa
766	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
771	Cisteína	Serina	Serina	Não Conservativa
774	Valina	Glicina	Glicina	Não Conservativa
776	Metionina	Isoleucina	Isoleucina	Conservativa
794	Asparagina	Treonina	Treonina	Conservativa
815	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
834	Glicina	Metionina	Alanina	Não Conservativa / Conservativa
839	Alanina	Glutamina	Glutamina	Não Conservativa
840	Treonina	Histidina	Histidina	Não Conservativa
842	Leucina	Glutamina	Glutamina	Não Conservativa
1018		Lisina	Treonina	Não Conservativa
1047		Valina	Isoleucina	Conservativa
1059		Arginina	Lisina	Conservativa
1063		Arginina	Lisina	Conservativa

Tabela 7 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína L (Continuação)

Resíduo	brdrusp100/07	brbvusp01/06	PV-NC_001542	Tipo de substituição
1078		Asparagina	Serina	Conservativa
1089		Arginina	Glicina	Não conservativa
1092		Treonina	Prolina	Não Conservativa
1133	Serina	Serina	Treonina	Conservativa
1136	Valina	Valina	Alanina	Não Conservativa
1139	Arginina	Arginina	Glicina	Não Conservativa
1144	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
1158	Serina	Serina	Cisteína	Não Conservativa
1159	Arginina	Arginina	Treonina	Não Conservativa
1206	Asparagina	Asparagina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
1214	Valina	Valina	Isoleucina	Conservativa
1218	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
1252		Arginina	Glicina	Não Conservativa
1255		Alanina	Serina	Não Conservativa
1319		Lisina	Arginina	Conservativa
1321		Leucina	Valina	Conservativa
1325		Glicina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
1327		Leucina	Valina	Conservativa
1328		Serina	Treonina	Conservativa
1336	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico	Conservativa
1342	Arginina	Arginina	Lisina	Conservativa
1344	Asparagina	Asparagina	Isoleucina	Não Conservativa
1346	Glicina	Arginina	Arginina	Não Conservativa
1348	Glicina	Valina	Valina	Não Conservativa
1351	Serina	Serina	Alanina	Não Conservativa
1356	Arginina	Arginina	Glutamina	Não Conservativa
1357	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
1360	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico	Ácido Aspártico	Conservativa
1361	Isoleucina	Fenilalanina	Isoleucina	Não Conservativa
1368	Fenilalanina	Leucina	Fenilalanina	Não Conservativa
1374	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
1378	Arginina	Arginina	Histidina	Conservativa
1388	Tirosina	Serina	Tirosina	Não Conservativa
1399	Serina	Tirosina	Tirosina	Não Conservativa
1401	Ácido Aspártico	Glicina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
1411	Serina	Serina	Glicina	Não Conservativa
1476	Leucina	Leucina	Fenilalanina	Não Conservativa
1478	Glicina	Glicina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
1487	Valina	Valina	Isoleucina	Conservativa
1496	Arginina	Arginina	Lisina	Conservativa
1516	Alanina	Alanina	Valina	Conservativa
1524	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Ácido Aspártico	Conservativa
1535	Serina	Serina	Alanina	Não Conservativa
1556	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
1561	Serina	Glicina	Serina	Não Conservativa
1564	Treonina	Treonina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
1569	Metionina	Metionina	Leucina	Conservativa
1589	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Ácido Aspártico	Conservativa
1590	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Histidina	Não Conservativa
1617		Valina	Treonina	Não Conservativa
1619		Cisteína	Ácido Aspártico	Não Conservativa
1623		Serina	Asparagina	Conservativa
1625		Arginina	Lisina	Conservativa
1626		Metionina	Valina	Conservativa
1627		Tirosina	Serina	Não Conservativa
1628		Serina	Arginina	Não Conservativa
1629		Arginina	Lisina	Conservativa
1630		Metionina	Valina	Conservativa
1631		Leucina	Glicina	Não Conservativa
1653	Alanina	Alanina	Valina	Conservativa
1660	Treonina	Treonina	Alanina	Não Conservativa
1663	Arginina	Arginina	Lisina	Conservativa

Tabela 7 - Substituições de aminoácidos encontradas para a proteína L (Conclusão)

Resíduo	brdrusp100/07	brbvusp01/06	PV-NC 001542	Tipo de substituição
1665	Leucina	Leucina	Fenilalanina	Não Conservativa
1691	Ácido Aspártico	Glicina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
1692	Ácido Aspártico	Glicina	Ácido Aspártico	Não Conservativa
1693	Leucina	Prolina	Leucina	Não Conservativa
1700	Cisteína	Fenilalanina	Cisteína	Não Conservativa
1702	Ácido Glutâmico	Valina	Valina	Não Conservativa
1708	Cisteína	Glicina	Glicina	Conservativa
1714	Leucina	Valina	Valina	Conservativa
1722	Arginina	Arginina	Lisina	Conservativa
1736	Valina	Alanina	Alanina	Conservativa
1746	Ácido Glutâmico	Alanina	Alanina	Não Conservativa
1749	Serina	Serina	Arginina	Não Conservativa
1752	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Histidina	Não Conservativa
1755	Isoleucina	Isoleucina	Valina	Conservativa
1765	Glicina	Triptofano	Triptofano	Não Conservativa
1775	Treonina	Treonina	Alanina	Não Conservativa
1778	Arginina	Arginina	Lisina	Conservativa
1785	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Lisina	Não Conservativa
1789	Metionina	Treonina	Metionina	Conservativa
1801	Alanina	Treonina	Treonina	Não Conservativa
1812	Glutamina	Leucina	Leucina	Não Conservativa
1819	Alanina	Serina	Serina	Não Conservativa
1820	Lisina	Isoleucina	Isoleucina	Não Conservativa
1821	Serina	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Não Conservativa
1839	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Asparagina	Não Conservativa
1844	Prolina	Glutamina	Glutamina	Não Conservativa
1845	Alanina	Histidina	Histidina	Não Conservativa
1846	Metionina	Leucina	Leucina	Conservativa
1847	Alanina	Serina	Serina	Não Conservativa
1852	Valina	Valina	Serina	Não Conservativa
1860		Metionina	Valina	Conservativa
1889		Alanina	Treonina	Não Conservativa
1929		Histidina	Asparagina	Não Conservativa
1934		Arginina	Metionina	Não Conservativa
1949		Prolina	Histidina	Não Conservativa
1961		Alanina	Treonina	Não Conservativa
1966		Serina	Alanina	Não Conservativa
1972		Treonina	Metionina	Não Conservativa
1974		Isoleucina	Valina	Conservativa
1981		Treonina	Asparagina	Não Conservativa
2035	Alanina	Treonina	Treonina	Não Conservativa
2039	Metionina	Metionina	Arginina	Não Conservativa
2044	Arginina	Arginina	Leucina	Não Conservativa
2047	Treonina	Treonina	Valina	Não Conservativa
2055	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Asparagina	Não Conservativa
2057	Alanina	Alanina	Treonina	Não Conservativa
2058	Alanina	Alanina	Serina	Não Conservativa
2065	Cisteína	Arginina	Cisteína	Não Conservativa
2087	Treonina	Arginina	Arginina	Não Conservativa
2089	Arginina	Arginina	Valina	Não Conservativa
2091	Arginina	Arginina	Serina	Não Conservativa
2093	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico	Lisina	Não Conservativa
2097	Lisina	Lisina	Glicina	Não Conservativa
2101	Lisina	Lisina	Arginina	Conservativa
2104	Arginina	Arginina	Histidina	Não Conservativa
2107	Asparagina	Treonina	Asparagina	Não Conservativa
2111	Treonina	Serina	Serina	Conservativa
2113	Lisina	Lisina	Ácido Glutâmico	Não Conservativa
2114	Ácido Aspártico	Ácido Aspártico	Asparagina	Não Conservativa
2126	Cisteína	Serina	Cisteína	Não Conservativa

A tabela 7 mostra o perfil de substituição de aminoácidos para esta região da proteína L. Foram encontradas 93 substituições não conservativas na amostra em brbvusp01/06 (onde 39 substituições foram identificadas em regiões sequenciadas apenas para a amostra

brbvusp01/06 e outras 14 substituições foram identificadas apenas para brbvusp01/06) e 66 substituições não conservativas na amostra brdrusp100/07 (onde 26 substituições foram identificadas apenas em brdrusp100/07) quando comparadas à amostra de referência PV (NC_001542) sendo 40 substituições não conservativas comuns para as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07.

Dezesseite resíduos de aminoácidos da polimerase viral foram identificados como próprios da variante mantida por morcegos hematófagos. Quatorze resíduos com substituições não conservativas: resíduo 8 com Fenilalanina (Figura 65a), 139 com um Ácido Glutâmico, 217 com uma Lisina, 683 com uma Glicina, 1092 com uma Treonina, 1139 com uma Arginina, 1255 com uma Alanina, 1617 e 1619 com uma Valina e Cisteína respectivamente, 1852 com uma Valina, 1889 com uma Alanina, 2057 e 2058 com Alanina e 2089 com uma Arginina; e três resíduos com substituições conservativas: 645 com Arginina (Figura 65b), 1214 com Valina e 1336 com Ácido Aspartico. Outros 13 resíduos 24, 27 (Figura 65c), 61, 122, 170, 1144, 1342, 1374, 1487 (Figura 65d), 1556, 1653, 1665 e 2101 foram relacionados ao ciclo aéreo de transmissão e três resíduos 21, 88 (Figura 65e) e 107 foram comuns para as variantes relacionadas à *D. rotundus* e *T. brasiliensis*.

Figura 65a. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 8 da polimerase viral.

Em azul claro pode ser vista a Fenilalanina para as amostras com variante genética mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* entre elas a amostra brbvusp01/06 e a Tirosina para as demais amostras.

Figura 65b. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 645 da polimerase.

Em rosa claro pode ser vista a Arginina para as amostras do ciclo mantido por morcegos hematófagos entre elas, identificadas com setas vermelhas, as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 e a Lisina para as demais amostras.

Figura 65c. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 27 da polimerase.

Em azul pode ser vista a Isoleucina para as amostras do ciclo aéreo incluindo as amostras brbvusp01/06 e EU311738 (*raccoon*) e a Valina para as demais amostras.

Figura 65d. Ilustração gerada pelo programa MacClade para o resíduo 1487 da polimerase. Em verde pode ser vista a Valina para as amostras do ciclo aéreo incluindo as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 e a Isoleucina para as demais amostras.

Figura 65e. Ilustração gerada pelo programa MacClade, no resíduo 88 da polimerase. Em azul claro pode ser vista a Isoleucina para as amostras da variante mantida por morcegos *Desmodus rotundus* e morcegos *Tadarida brasiliensis*. A seta indica a amostra brbvusp01/06.

Foram identificados trinta e sete sítios conservados com sete ou mais resíduos de aminoácidos ao se comparar as amostras estudadas com a amostra de referência PV. Para a amostra brbvusp01/06 três sítios conservados no fragmento 1, um no fragmentos 2, dezesseis no fragmento 3 e dezessete no fragmento 4, enquanto para a amostra brdrusp100/07 foram identificados um sítio no fragmento 2a, cinco no fragmento 3a, onze no fragmento 4a e um no fragmento 4b. A tabela 8 mostra as trinta e sete regiões dos fragmentos parciais do gene L analisados com mais de sete resíduos de aminoácidos extremamente conservadas para as amostras estudadas que correspondem aos domínios conservados da polimerase viral.

Tabela 8 - Regiões com mais de sete resíduos de aminoácidos conservados entre as amostras estudadas e a amostra de referência PV - proteína L

Resíduos	Domínio	Localização
28 a 45	PNILRNSDYNLNSPLIED	Fragmento 1
182 a 188	LYMNALD	
236 a 251	CLFDRNYTLMLKDLFL	
595 a 605	KLIDRVGTGQGL	Fragmentos 2 e 2a
617 a 626	LDYEKWNHQQ	
646 a 656	RVFSRTHEFFQ	Fragmento 3
708 a 716	LLMIDRESQ	
730 a 742	NQVLCPTYMLSPGLS	
778 a 793	KKEETMCSYDFLIYGK	
795 a 809	PLFRGNILVPESKRW	
976 a 992	TILLKDAIRKALYDEVD	
996 a 1017	NSEFREAILLSKTHRDNFILFL	
1021 a 1042	EPLFPRFLSELFSSSFLGIPES	
1048 a 1057	QNSRTIRRQF	
1104 a 1122	ISWGRKVVGTTVPHPSEML	
1163 a 1189	KGYLGSSTSMSTQLFHAWKVTVNHVV	Fragmentos 3 e 3a
1194 a 1202	SLKESINWF	
1232 a 1241	VFKRTGSALH	
1258 a 1268	PNLLSHISVST	
1116 a 1122	PHPSEML	
1414 a 1424	SPRDYLRGLAR	Fragmentos 4 e 4a
1432 a 1442	ICFLTRMTNIN	
1451 a 1468	SGVISYILLRLDNHPSLY	
1479 a 1486	EIFSIPQK	
1503 a 1514	LCYLQHVLRYSR	
1517 a 1523	ITASPEN	
1525 a 1534	WLWIFSDFRS	
1542 a 1551	LITYQSHLLL	
1571 a 1583	SLMRQVLGGHGED	
1604 a 1613	WVDQEVRRHAA	
1668 a 1690	PLISGLRVVQWATGAHYKLKPIL	Fragmentos 4 e 4b
1723 a 1735	LVFNSLLEVNDLM	
1862 a 1871	SSFSSSELYLR	Fragmento 4
1873 a 1888	SKRGKFFRDAEYLTSS	
1891 a 1903	REMSLVLFNCSSP	
1905 a 1923	SEMQRARSLNYQDLVRGFP	
1950 a 1959	KMVDDLELQR	

As sequências completas e parciais obtidas durante este estudo foram depositadas no GenBank (Banco de Dados de maior reconhecimento e consulta na área) sob os números de entrada bankit1314795 (GU592648 – N de *D. rotundus*), bankit1314806 (GU592649 N do bovino), bankit1314810 (GU592650 – P do bovino), bankit1314811 (GU592651 – M do bovino), bankit1314814 (GU592652 – G do bovino), bankit1436469 (P de *D. rotundus*), bankit1436471 (M de *D. rotundus*), bankit1436472 (G de *D. rotundus*), bankit1314818 (GU592653 – psi do bovino), bankit1314820 (GU592654 – L parcial do bovino).

6 DISCUSSÃO

Enquanto a amostra eleita para o estudo brdrusp100/07 estava sendo cultivada para obtenção do lote de primeira passagem em sistema de cultivo celular, uma amostra isolada de cérebro de um bovino positivo para raiva brbvusp01/06, que foi caracterizada antígenoicamente como mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*, por meio de imunofluorescência indireta, foi utilizada para dar início aos testes de padronização e foi utilizada como amostra controle.

Ambas as amostras foram processadas por imunofluorescência indireta com a utilização do painel de anticorpos monoclonais (CDC/OPAS - PAHO) e por técnicas de biologia molecular seguida de estudo filogenético comparativo de fragmento da nucleoproteína N, com a finalidade de caracterização antigênica e genética dos isolados.

Com a utilização de um painel de anticorpos monoclonais (PAHO, 2000), as duas amostras de vírus da raiva utilizadas, a amostra isolada de bovino brbvusp01/06 (amostra teste para padronização) e a amostra em estudo brdrusp100/07, isolada de *D. rotundus*, foram caracterizadas antígenoicamente como variante antigênica 3 (AgV3) cujo perfil de reação observado confere com o padrão de reação estabelecido pelo painel utilizado (Favoretto et al., 2002).

Tanto para a amostra isolada de bovino (brbvusp01/06) quanto para a amostra em estudo (brdrusp100/07), o conjunto de reações observado contra o painel de anticorpos monoclonais anti-nucleoproteína viral identificou a presença da AgV3, característica de vírus mantido pelo morcego hematófago *D. rotundus* previamente relacionada ao hospedeiro e reservatório descrito nas Américas e particularmente no Brasil (Smith et al., 1992; Mattos et al., 1999; Velasco-Villa et al., 2002; Favi et al., 2002; Favoretto et al., 2002).

A utilização de anticorpos monoclonais tornou possível a observação precisa das diferenças antigênicas, com distinção em sorotipos e subtipos (Sacramento et al., 1991). Esta metodologia vem sendo utilizada por países de todas as regiões do mundo e particularmente nas Américas, onde há mais de dez anos o painel de anticorpos monoclonais utilizado está bem estabelecido, auxiliando na caracterização das variantes de isolados do vírus, identificando muitas vezes o reservatório envolvido.

A análise do gene codificador para a nucleoproteína, por ser uma região extremamente conservada e sintetizada em grande quantidade durante a infecção viral (Banerjee, 1987) permitiu a caracterização genética, uma vez que as amostras estudadas segregaram com outras amostras relacionadas à variante mantida por populações de morcegos hematófagos *D.*

rotundus. A amplificação do gene N permite um método de genotipagem precisa baseado na sequência de nucleotídeos (Sacramento et al., 1991). A sequência nucleotídica da proteína N tem sido muito estudada em isolados representativos de todas as espécies virais (antigos genótipos) de *Lyssavirus* e encontra-se disponível em bancos de dados, permitindo estudos de diversidade genética do vírus da raiva que circula na maioria dos continentes (Bourhy et al., 1993; Kissi et al., 1995; Bandrane e Tordo, 2001).

As análises do fragmento de 320 nucleotídeos compreendidos entre as posições 1157 e 1476 da região carboxi-terminal do gene N foram realizadas para a determinação da variante genética, uma vez que este papel ainda não foi definido para outras proteínas virais. A análise filogenética do fragmento carboxi-terminal da nucleoproteína N revelou que as duas amostras estudadas pertencem à espécie viral *Rabies virus* (antigo genótipo 1) e segregam em um grupo de vírus mantidos por populações de morcegos hematófagos *D. rotundus*.

O sequenciamento foi realizado utilizando a metodologia de *primer walking*, previamente descrita por Tordo et al. (1986b) e Ito et al. (2001b) que, embora tenha se mostrado mais trabalhosa que os kits comerciais, se mostrou eficiente e acessível. A padronização da metodologia foi realizada em uma primeira etapa do estudo. Como os oligonucleotídeos foram degenerados, uma vez que não haviam sequências completas relacionadas à linhagem genética estudada disponíveis no *GenBank* no momento de desenho dos *primers* para a amplificação da variante associada ao morcego hematófago *D. rotundus*, foram utilizados fragmentos menores com o intuito de buscar produtos amplificados de melhor qualidade. As sequências obtidas foram utilizadas como fonte de informações para estabelecer os possíveis padrões de diferenciação de acordo com a região do genoma identificada pelo sequenciamento.

O gene codificador para a nucleoproteína das amostras em estudo brbvusp01/06 (controle bovino) e brdrusp100/07 (morcego hematófago) foram sequenciados e analisados e quando comparados com o grupo de amostras pertencentes a reservatórios terrestres, segregaram em um grupo independente, enquanto que, quando comparado com amostras de morcegos *D. rotundus* ou amostras isoladas de animais, cujas histórias descrevem agressão por este morcego hematófago, procedentes das Américas, apresentou altos valores de similaridade entre as sequências (*Bootstrap*: 100%) demonstrando que pertencem ao grupo de amostras relacionadas a este reservatório e indicando que estas amostras pertencem ao mesmo ciclo de transmissão (Figura 25).

Técnicas moleculares têm permitido verificar uma grande diversidade entre as sequências nucleotídicas obtidas de isolados do vírus da raiva. Estudos demonstrando esta

diversidade foram realizados tanto em regiões geograficamente restritas como no Canadá (Nadin-Davis et al., 1993, 1994), na França (Sacramento et al., 1992), na Venezuela (de Mattos et al., 1996), no México (Mattos et al., 1999; Loza-Rubio et al., 1999; Velasco-Villa et al., 2002); no Chile (Yung et al., 2002), na Bolívia (Favi et al., 2003), na Argentina (Cisterna et al., 2005) e no Brasil (Favoretto et al., 2001; Kobayashi et al., 2005; Favoretto et al., 2006; Carnielli et al., 2006, 2008, 2009a, 2009b) ou ainda em países da África, da Ásia, outros países da Europa e das Américas (Smith et al., 1992; Markotter et al., 2008; McElhinney et al., 2008; Johnson et al., 2009; Singer et al., 2009; Wu et al., 2009; Gong et al., 2010; Hirano et al., 2010; Van Zyl et al., 2010).

Nos estudos de genotipagem com a nucleoproteína, uma amostra recentemente descrita por Delmas et al. (2008) de um cachorro da Guiana (EU293113), a única relacionada à variante em estudo, sequenciada completamente e disponível no *GenBank*, segregou junto com as amostras brbvusp01/06 isolada de um bovino e brdrusp100/07 isolada de um morcego hematófago ambas relacionadas à variante genética mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*. Em sua publicação Delmas et al. (2008) apresentam o histórico de que o cão havia sido agredido por um morcego sem identificação, impedindo o acesso a importante informação sobre o fato do morcego ser hematófago ou não, sendo o foco do trabalho apenas o mapeamento e comparação entre os lissavírus sem qualquer referência à variante genética da amostra em questão.

A tabela 3 apresentou as 21 substituições de aminoácidos observadas na nucleoproteína, encontradas quando as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 foram comparadas à amostra de referência PV (NC_001542), confirmando ser a nucleoproteína como a mais conservada do vírus (Marston et al., 2007). Destas 21 substituições, nove (42,8%) e dez (47,6%) foram não conservativas para a amostra brbvusp01/06 (bovino) e para a amostra brdrusp100/07 (morcego) respectivamente.

O domínio LGKAPDLNKAYKS situado entre os resíduos 43 a 55 se apresentou altamente conservado para todas as sequências utilizadas no *dataset* de comparação com exceção das amostras brasileiras estudadas brdrusp100/07 e brbvusp01/06. Doze domínios de 7 a 21 resíduos de aminoácidos (domínios EYKYP AI entre os resíduos 27 a 33, LGKAPDL entre os resíduos 43 a 49, VEGNWALTGG entre os resíduos 116 a 125, SLYRLSKISGQ entre os resíduos 146 a 156, VEHTLMTTHKMCANW entre os resíduos 182 a 197 e VVTAYEDCSGLVSFTGF entre os resíduos 229 a 245, KQINLTA entre os resíduos 247 a 253, PHSYFIHFRSLGLSGKSPYSS entre os resíduos 282 a 302, FNLIHFVGCYMG entre os resíduos 309 a 320, CAPHEMSVLGGY entre os resíduos 333 a 344, GTFERRF entre os

resíduos 353 a 359 e ALADDGTV resíduos 380 a 387) foram identificados como altamente conservados para todas as sequências de amostras utilizadas para comparação.

Testes com os oligonucleotídeos iniciadores foram realizados para complementar a nucleoproteína (N) e amplificar fosfoproteína (P) e proteína de matriz (M) simultaneamente. Os resultados obtidos foram satisfatórios como pode ser observado na figura 8 (para P e M), sendo que os melhores resultados foram obtidos a partir da amplificação de fragmentos únicos, como esperado, uma vez que dispensa a etapa de purificação anterior ao sequenciamento.

O estudo da fosfoproteína da variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* apresentou uma região codante de 894 nucleotídeos (297 aminoácidos e um códon de terminação), como observado na amostra de referência PV (Tordo et al., 1986b) e em outras amostras disponíveis no *GenBank* (Nadin-Davis et al., 1997; Kobayashi et al., 2007). Ao serem realizadas as análises filogenéticas observamos que as amostras com variante genética mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* (classificação padronizada de acordo com análises da nucleoproteína), segregaram num mesmo clado para a fosfoproteína (Figuras 31 e 32) confirmando a classificação já descrita na literatura para a proteína N. Ao serem analisadas as amostras pertencentes a este clado foi observado que a porção inicial da fosfoproteína que compreende do aminoácido 1 (códon inicial – metionina) ao aminoácido 46 é altamente conservada, como já observado por Kobayashi et al., (2007) com exceção de apenas dois resíduos (29 e 42) nos quais todas as amostras da variante mantida por *D. rotundus* apresentaram substituição dos aminoácidos Asparagina na amostra PV por uma Alanina, Ácido Glutâmico na amostra PV por Ácido Aspártico. Para o clado das amostras pertencentes à variante genética mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* as regiões compreendidas entre os aminoácidos 80 a 125 (exceto os resíduos 85 e 91 para a amostra AF369359 - *T. brasiliensis*), 179 a 221 (exceto para a posição 189 da amostra AF369359 - *T. brasiliensis*) e 258 a 294 também foram muito conservadas, enquanto que, ao se comparar as amostras em estudo com as demais amostras disponíveis no banco de dados observamos que o domínio compreendido entre os aminoácidos 41 a 195 é a região onde aparece maior número de substituições de aminoácidos com apenas duas pequenas regiões dentro deste domínio, altamente conservadas para todas as amostras (do resíduo 43 a 47 - PIEVD e 113 a 118 - RFLKIW).

O domínio rico em lisina FSKKYKF na fosfoproteína descrito por Kobayashi et al. (2007) e identificado como um importante componente de *binding* da região C-terminal da proteína N também se apresentou conservado para as amostras pertencentes ao clado da

variante genética mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*. Na tabela 4 estão as 52 substituições de aminoácidos localizadas quando as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 foram comparadas à amostra de referência PV (NC_001542). Destas 52 substituições, mais da metade (31) foram do tipo não conservativa, ou seja, a mudança se deu por aminoácidos de classes diferentes.

Confirmando Kobayashi et al., (2007) também pudemos observar na posição do aminoácido 145 uma Alanina conservada para amostras pertencentes ao ciclo aéreo e uma Serina conservada para amostras do ciclo terrestre. A Met na posição 20 e as Serinas conservadas nas posições 210 e 271, alvo fosfoceptor, descritas por Nadin-Davis et al., (2002) também foram observadas neste estudo. Os resíduos Ser₆₈ e Gly₁₁₂ foram identificados como padrões de substituição de aminoácidos próprios da variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*. Os resíduos Ala₁₃₆, Val₁₅₃, Lys₁₅₈, Val₁₇₈ foram identificados apenas no clado onde segregaram as amostras pertencentes à variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*, porém as amostras AF369359 - *T. brasiliensis*, AF369362 - *D. rotundus* e AF369363 - *D. rotundus* apresentaram outras substituições nestes resíduos (todos os resíduos na amostra AF369359, sítio 158 na amostra AF369362 e sítio 178 na amostra AF369363).

O domínio MQDDC entre os resíduos 287 a 291 foi conservado em todas as amostras como também observado por Cibulski et al., (2010, comunicação pessoal in Encontro Nacional de Virologia 2010 – dados ainda não publicados)³. A fosfoproteína participa da atividade de replicação do vírus e interage com a polimerase viral (Nadin-Davis et al., 1997) sendo, portanto, necessária uma atenção maior a esta região variável encontrada.

A proteína de matriz, localizada dentro do envelope viral e com interação direta junto à região citoplasmática da glicoproteína, possui uma região codante de 609 nucleotídeos (202 aminoácidos e um códon de terminação), estando associada com a citotoxicidade em células BHK infectadas com linhagens vacinais (Mita et al., 2008), com a transcrição viral (Nadin-Davis et al., 1997) e com a indução de apoptose celular associada com a glicoproteína (Faber et al., 2002). Assim como a núcleoproteína e fosfoproteína, a proteína de matriz também confirmou a classificação genética para variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* (Figuras 36 e 37). Com a análise dos aminoácidos da proteína de matriz (Tabela 5) foi possível observar as substituições de aminoácidos, 26 substituições quando a amostra brbvusp01/06 foi comparada à amostra de referência PV (NC_001542) e 21 substituições

³ Cibulski S. Gramado, RS, 2010 (Encontro Nacional de Virologia).

quando a análise foi realizada para a amostra brdrusp100/07, sendo 20 substituições comuns para as ambas as amostras. Destas 26 substituições 11 foram do tipo não conservativa para a amostra brbvusp01/06, das 21 substituições 8 foram do tipo não conservativa para a amostra brdrusp100/07 e das 20 substituições em comum 6 foram do tipo não conservativas.

Substituições de aminoácidos foram encontradas nas posições 7 (Met), 22 (Ile), 80 (Asn), 82 (Leu), 148 (Ala), 184 (Leu) e 192 (Asp) confirmando Kobayashi et al. (2007). O resíduo Met₇ foi observado para a variante mantida por morcegos hematófagos e apenas para a amostra EF542830 (linhagem vacinal RV 97 - ciclo terrestre de transmissão). O resíduo Asn₈₀ também foi identificado apenas para esta variante e para as amostras DQ875050 (linhagem vacinal MRV – ciclo terrestre de transmissão) e GQ918139 (vírus fixo CVS-11 ciclo terrestre de transmissão). O resíduo Ile₂₂ foi observado para a amostra EU293116 (morcego insetívoro *T. brasiliensis*) e para variante mantida por *D. rotundus* com exceção da amostra estudada brdrusp100/07 (morcego). Este resíduo apresentou ainda diferentes substituições (Alanina e Metionina além da Valina presente na amostra PV) para as demais amostras componentes do *dataset* de análise.

Os resíduos Leu₈₂, Ala₁₄₈, Leu₁₈₄ e Asp₁₉₂ foram particulares para a variante genética mantida por morcegos hematófagos, sendo que todas as quatro substituições específicas observadas foram do tipo conservativa.

O resíduo Gln₈₇ foi identificado apenas para o ciclo aéreo de transmissão. As posições dos resíduos 82, 148 e 184 podem ser visualizadas nas figuras 38a, b e c. Os domínios DLWLPPPEY resíduos 30 a 38, PNGYSF resíduos 64 a 69, NWVYKLRRT resíduos 111 a 119 e IFQWADSRGPLEGEELE resíduos 121 a 137, com exceção da amostra brbvusp01/06 que apresenta uma substituição no resíduo 126 (Ácido Aspártico), foram conservados para todas as amostras analisadas. Estes dois últimos domínios estão inseridos no segmento de ligação à glicoproteína que abrange os resíduos 115 a 151, fato também observado por Cibulski-2010 (comunicação pessoal)⁴.

Foi localizado o domínio rico em prolina (PPPxY) entre os aminoácidos 34 ao 38, envolvido no brotamento, descrito por Harty et al (1999 e 2001) e também citado por Kobayashi et al. (2007). Nas posições 29 (Asp) e 95 (Val) descritas por Shimizu et al. (2006), também abordadas por Mita et al. (2008) para linhagens vacinais. A proteína de matriz da amostra brbvusp01/06, assim como as demais amostras selvagens disponíveis no banco de dados, não apresentou substituição de aminoácidos nestas posições (29 e 95).

⁴ Cibulski S. Gramado, RS, 2010 (Encontro Nacional de Virologia).

O domínio hidrofóbico da proteína de matriz, compreendido entre os resíduos 89 a 107 (MIGLVKVVV), foi altamente conservado para as amostras do ciclo aéreo, que segundo Tordo et al. (1986a), este sítio provavelmente é o responsável pela interação do vírus com a membrana da célula hospedeira.

Em virtude da grande importância da nucleoproteína e da glicoproteína, onde estão situados os 3 sítios antigênicos do vírus da raiva, as proteínas fosfoproteína e de matriz são pouco estudadas (Nadin-Davis et al., 1997), apesar do importante papel que cada uma delas desempenha para o vírus.

A glicoproteína foi completamente sequenciada e apresentou 1575 nucleotídeos e 525 aminoácidos (19 aminoácidos de peptídeo sinal e 452 aminoácidos referente ao ectodomínio, 53 aminoácidos relacionado ao endodomínio e um códon de parada), como descrito por Tordo et al. (1986b) e Sato et al. (2004). A padronização da metodologia utilizada para o sequenciamento da glicoproteína permitiu a interpretação dos resultados obtidos para o gene G. Os oligonucleotídeos utilizados para sequenciar a região codificadora para a glicoproteína funcionaram dentro do esperado, sendo que apenas um dos *primers* (*primer B*) não se mostrou eficiente, provavelmente em virtude da degeneração ou de diferenças entre os genomas da variante mantida por populações de morcegos hematófagos *D. rotundus* e da sequência tomada como base para o desenho dos oligonucleotídeos.

Da mesma maneira que o segmento de 320 nucleotídeos, compreendidos entre as posições 1157 e 1476 do gene codificador para a nucleoproteína, os 1575 nucleotídeos correspondentes ao gene codificador para glicoproteína relacionou as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 às amostras relativas ao ciclo aéreo de transmissão (Figuras 25, 26, 41 e 42).

Na análise comparativa da nucleoproteína e glicoproteína foram identificados os três sítios antigênicos principais: o sítio antigênico I, do aminoácido 374-383 na porção carboxi terminal da nucleoproteína (Figura 22) e os sítios antigênicos II descontínuo dos aminoácidos 34-42 e 198-200 e III contínuo dos aminoácidos 330 ao 338. Nesta região foi possível observar que para as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07, houve substituição de aminoácido nos sítios antigênicos I na nucleoproteína (Figura 23) e IIa na glicoproteína (Figura 24). Também Sato et al. (2004) observaram que no sítio antigênico IIa da glicoproteína outras amostras brasileiras do ciclo aéreo de transmissão apresentaram mudanças de uma Arginina para uma Lisina.

Por ser externa seria esperado que a glicoproteína fosse a primeira alternativa de escape imunológico do vírus, porém, na análise dos sítios antigênicos IIa, IIb e III, localizados nesta proteína, somente pôde ser observada a substituição de aminoácido no sítio IIa quando

comparada à amostra PV padrão ou a outras amostras representantes de outros ciclos endêmicos deste vírus. Ito et al. (2001b) confirmaram a sequência de nucleotídeos dos genes N e G das linhagens vacinais RC-HL (AB009663) e Nishigahara (AB044824) que já tinham sido anteriormente descritas, encontrando apenas um nucleotídeo na posição 4688 do genoma de RC-HL de Glicina para Alanina na fita positiva, após várias passagens em BHK-21. Esta substituição de nucleotídeo mudou um aminoácido de Ácido Glutâmico para Lisina no resíduo 439 da glicoproteína.

O peptídeo sinal de 19 aminoácidos descrito por Tordo et al. (1986b) foi identificado e apresentou alta variabilidade, assim como o Domínio Trans-Membrana situado entre os resíduos 440 a 461 (Sato et al., 2004). Na tabela 6 estão as 82 substituições de aminoácidos das amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 em relação à amostra de referência PV, sendo 67,1% (55) substituições não conservativas e 54,9% (45 substituições não conservativas) para as duas amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 respectivamente.

Sato et al. (2004) observaram os sítios Ser₁₉₄, Arg₃₄₈, Glu₄₀₈, Cys₄₅₆ e Asp₅₀₂ conservados em um grupo de amostras relacionadas a morcegos hematófagos durante um estudo realizado com amostras brasileiras. Estes sítios também foram identificados neste estudo e se mostraram próprios apenas para a variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*.

Dietzschold et al. (1983) e Seif et al. (1985) descreveram pela primeira vez que uma única substituição de uma Arginina no resíduo 333, localizado no sítio antigênico III, determina o grau de patogenicidade das amostras de vírus da raiva, fato também descrito por Faber et al. (2005). Faber et al. (2007) observaram que a substituição da Arg₃₃₃ é mais frequentemente observada em sequências da glicoproteína em vírus fixo que entre as sequências da glicoproteína de amostras selvagens. Neste estudo, as análises para o gene codificador da glicoproteína das amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 demonstraram a presença deste aminoácido no resíduo 333 (Figura 23) confirmando estudos de Sato et al. (2004) e ao contrário dos achados de Sato et al. (2009) que observaram esta substituição em amostras isoladas de morcegos não-hematófagos.

Os domínios GFTCTGVVTEA entre os resíduos 58 a 68, TYTNFVGYYVTTTF entre os resíduos 70 a 82, LRKLVPFGFKAYTI entre os resíduos 304 a 317 e VLIPEMQSSLL entre os resíduos 371 a 381 se mostraram conservados para todas as amostras analisadas. A Lys₃₃₀ descrita por Coulon et al. (1998) como responsável pela ligação do vírus ao neurônio e dois dos três sítios de glicosilação nos resíduos 37-39 (Asn-X-Ser sítio 56-58 se considerado o peptídeo sinal) e 319-321 (Asn-X-Thr sítio 338-340 quando consideramos o peptídeo sinal),

descritos por Anilionis et al. (1981), foram conservados para as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07, também observado por Mochizuki et al (2011) como conservados para a amostra isolada de um morcego hematófago.

Em um dos sítios de glicosilação, 247-249 (Asn-X-Thr sítio 266-268 se considerado o peptídeo sinal), foram observadas uma substituição não conservativa Asn266Asp e uma substituição conservativa Glu267Asp além de uma substituição conservativa no sítio de lipidação no resíduo 479.

Os alinhamentos da região não codante do pseudogene Ψ confirmaram o que foi observado por Wu et al. (2008) de que esta é uma região muito instável. Tordo et al. (1986a) demonstraram que apesar de não codificar para uma proteína específica, esta região é de extrema importância para a infecção viral, podendo agir na redução da eficiência de transcrição da polimerase viral, o que poderia reduzir a expressão e consequentemente aumentar a patogenicidade (Marston et al., 2007).

Após a finalização do estudo das quatro proteínas N, P, M e G e do Pseudogene Psi (Ψ) foram iniciados os testes para amplificação da polimerase viral. Para o sequenciamento da polimerase (*large protein*) foram seguidos protocolos já estabelecidos para esta finalidade conforme descrito anteriormente. Os fragmentos amplificados nesta etapa do trabalho variaram entre 1.130 pb e 2.146 pb e a quantidade de DNA necessária estipulada para a reação de sequenciamento variou de 60 ng para o menor fragmento a 125 ng para o maior fragmento, por reação.

Os testes realizados para a purificação do material amplificado para o sequenciamento não mostraram resultados completamente satisfatórios. Novos testes de purificação com os sistemas de colunas selecionados (*PureLink™ PCR Purification Kit* e *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit Invitrogen®* - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), resultaram na obtenção de um material de excelente qualidade, porém não era mantida a concentração mínima de DNA, suficiente para a realização do sequenciamento, mesmo quando a purificação foi realizada com a utilização do sistema de purificação *ExoSAP-IT®* (GE Healthcare Bio-Sciences Ltd - USB Corporation, Cleveland, OH, Estados Unidos), enzima capaz de selecionar os dímeros formados pelos *primers*. Para que uma grande quantidade de DNA purificado fosse alcançada, foram então realizadas reações de amplificação em quadruplicata. O material foi concentrado e purificado com os diferentes kits, conforme já descritos, com o objetivo de definir o protocolo mais conveniente. A partir desse material amplificado diversas vezes e posteriormente purificado, os testes de sequenciamento foram retomados.

As metodologias empregadas para a síntese de cDNA, com a utilização dos sistemas *SuperScript™ Invitrogen®* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) ou *High Capacity cDNA Archive Kit®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) usadas anteriormente com a nucleoproteína, com resultados satisfatórios, não foram utilizadas uma vez que era de interesse a amplificação de fragmentos longos como o do gene codificador para a polimerase, com aproximadamente 6,5 Kb. Assim sendo, em uma primeira etapa do estudo da polimerase viral foi padronizada e realizada uma síntese de cDNA diferenciada, com a finalidade de obter um produto amplificado de melhor qualidade.

Como o tamanho do gene é um fator limitante para a amplificação do material genético, nesta etapa do trabalho foram necessários inúmeros testes com fragmentos menores, sendo que para as combinações de iniciadores GliPol1F+GliPol2R (2.056 pb), GliPol3F+GliPol3R (1.133 pb), Pol1F+Pol2R (2.146 pb) e Pol3F+Final (1.699 pb) os resultados foram excelentes, confirmando a eficiência dos oligonucleotídeos desenhados.

Os processos de extração, síntese de cDNA (RT) e de amplificação (PCR) para as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 foram realizados concomitantemente para otimização dos resultados, conforme observado em testes anteriores. A realização de uma reação de amplificação para nucleoproteína para confirmar a qualidade do cDNA longo resultou na viabilidade da utilização desta metodologia (Figura 12), uma vez que a síntese de cDNA é uma reação muito mais barata que a clonagem, minimizando os riscos de contaminações que podem ocorrer devido à manipulação de plasmídeos.

Por se tratar de uma proteína multifuncional, a mais importante na replicação e transcrição viral era esperada a observação de poucas mutações nucleotídicas e que esta etapa fosse o passo mais rápido, apesar do tamanho do gene codante da polimerase (mais de 6.000 nucleotídeos). Porém os primeiros testes com a tentativa de amplificação do gene completo não foram promissores, sendo também necessária a amplificação realizada em fragmentos menores, conforme havia sido observado durante o processo de amplificação da proteína G, com a utilização de uma série de combinações de oligonucleotídeos, tendo sido o melhor resultado conseguido com as combinações de *primers* GliPol1F+GliPol1R (Figura 11), GliPol3F+GliPol3R (Figura 12) e GliPol1F+GliPol2R (Figura 13). Com estas combinações foi possível sequenciar a porção inicial de 798 nucleotídeos (266 aminoácidos – fragmento 1) da proteína L para a amostra estudada brbvusp01/06. Todas as combinações de iniciadores amplificaram fragmentos da polimerase viral sendo sequenciados 76,2% (4970 nucleotídeos) da amostra estudada brbvusp01/06 e 44,6% (2910 nucleotídeos) da amostra estudada brdrusp100/07 [porcentagens calculadas em relação aos 6515 nucleotídeos da amostra PV].

Como não foi possível a amplificação de todo o gene, uma análise parcial para os fragmentos amplificados da polimerase foi realizada (Figuras 46 a 64) onde foi mais uma vez observada a distinção entre as amostras que segregam dando origem ao cluster que agrupa as amostras relacionadas aos ciclos aéreo e terrestre de transmissão da raiva. A maioria das sequências de polimerase disponíveis no *GenBank*, inclusive do estudo de Ming et al. (2009) foram estudadas a partir de linhagens vacinais ou de amostras que segregam junto com amostras de variantes genéticas relacionadas ao ciclo terrestre de transmissão (Beckert et al., 2009; Nagaraja et al., 2008). Estudos filogenéticos até então realizados com a polimerase não são capazes de definir a variante genética em virtude do número mínimo de sequências do gene codificador para esta proteína disponíveis no banco de dados, o que torna mais importante ainda o seu estudo, uma vez que Wu et al. (2007) menciona que o gene L pode ser o melhor modelo para análises do tipo “*molecular clock*” ou similares, considerando seu nível de conservação. Wu et al. (2007) em um estudo demonstrou que as análises genealógicas de cada um dos genes do vírus da raiva apresentaram a mesma topologia da análise já conhecida para genotipagem com a nucleoproteína, este fato também pôde ser observado em nossas análises.

Segundo Poch et al. (1990), a polimerase do vírus da raiva apresenta seis blocos conservados quando comparada a polimerases de outros vírus da ordem *Mononegavirales*. Os blocos II e III apresentam mais domínios funcionais.

O bloco I compreende a região entre os resíduos 232 e 423 da amostra PV. No bloco I são descritos três resíduos como estritamente ou conservativamente mantidos (Poch et al., 1990), entretanto o domínio NYTLMLKDLFL(S/A)R entre os resíduos 241 e 253 (amostra de referencia PV) apresentou uma única substituição não conservativa no resíduo 252 onde uma Serina presente na amostra PV foi substituída por uma Alanina na amostra brbvusp01/06. Neste estudo o fragmento 1 foi sequenciado até o resíduo 266 para a amostra brbvusp01/06 não compreendendo os domínios GNSGYEVIKILEPYVVNSLVQ (resíduos 291 a 311 - PV) e VYGCRYRHWGHPYID (resíduos 364 a 377 - PV). O terceiro domínio apresenta uma região importante GHP, resíduos 373-375, onde a Histidina é conformacionalmente exposta e apresenta papel funcional.

O bloco II compreende a região entre os resíduos 504 e 607 e está envolvido no posicionamento e ligação do RNA molde. O fragmento 2 sequenciado para a amostra brbvusp01/06 iniciou a partir do resíduo 595 não sendo possível observar o bloco II neste estudo.

No bloco III, resíduos 608 a 831, estão situados os quatro principais *motifs* (A-D) descritos por Poch et al. (1990) e Schnell e Conzelmann (1995). O *motif* A (AFHLDYEKWNH) entre os resíduos 614 a 626 se mostrou 100% conservado entre as amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 (fragmentos 2 e 2a). O *motif* B (TCWNGQDGGLEGLRQKGWSLVSLLMID) entre os resíduos 686 a 712 abrange um domínio conservado entre os resíduos 693 a 708, foi identificado nas amostras brbvusp01/06 e brdrusp100/07 e no resíduo 706 a amostra brdrusp100/07 apresentou uma substituição não conservativa de uma Valina (amostra PV) para uma Glicina. O *motif* C (VLAQGDNQVL) entre os resíduos 725 a 734 apresenta o penta peptídeo QGDNQ (727-731) que ao ser suprimido no estudo desenvolvido por Schnell & Conzelmann (1995) se mostrou essencial para expressão do gene codificador da polimerase viral. A amostra brdrusp100/07 apresentou o penta peptídeo estritamente conservado em relação a amostra PV entretanto apenas para a amostra brbvusp01/06 foram observadas duas substituições não conservativas nos resíduos 728 (Glicina na PV por Ácido Glutâmico) e 729 (Ácido Áspártico na amostra PV por uma Asparagina). O *motif* D (FRGNILVPESKRW) resíduos 797-809 se mostrou 100% conservado entre todas as sequências do *dataset* analisado.

O bloco IV, resíduos 889 a 1060, rico em Prolina ainda não tem seu papel muito bem descrito, mas possivelmente esteja envolvido na ligação de nucleotídeos (Poch et al., 1990; Marston et al., 2007). O fragmento 3 foi sequenciado para amostra brbvusp01/06 a partir do resíduo 976 sendo possível observar apenas os 84 resíduos finais deste bloco onde o domínio FRGNILVPESKRW (resíduos 1041 a 1053) descrito por Poch et al. (1990) como conservativamente mantido pôde ser observado com apenas uma substituição conservativa no resíduo 1047, uma Isoleucina na amostra PV e uma Valina para a amostra brbvusp01/06.

O bloco V compreendido entre os resíduos 1090 a 1327 apresenta seis domínios previamente descritos por Poch et al. (1990). Os domínios PHPSEML (resíduos 1116 a 1122), GYLGS (resíduos 1164 a 1168) e DFPLEE (resíduos 1224 a 1229) foram 100% conservados em todas as sequências analisadas. O domínio VKRAL, resíduos 1189 a 1193, foi conservado para as amostras da variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus* e os domínios DFMFQ (1283-1287) e FHWHL (1311-1315) não puderam ser observados, pois o fragmento 3 foi sequenciado até o resíduo 1234 para as amostras estudadas (brbvusp01/06 e brdrusp100/07). Segundo Marston et al. (2007) o bloco V apresenta numerosos resíduos invariantes de Cisteína e Histidina fato que foi confirmado nas análises realizadas para os fragmentos sequenciados. O bloco VI é o menos conservado GxGxG (1705-1710) precedido de uma Lisina 19-22 resíduos *upstream* que exerce o papel de poliadenilação ou atividade

proteína kinase (Poch et al., 1990) e finalmente uma região amino-terminal (56-61) altamente conservado também foi identificado nas amostras mantidas por *D. rotundus* e quando comparada à amostra PV foi 100% conservada. Estes domínios de 4 a 7 resíduos são estritamente ou altamente conservados na maioria das análises.

Das 154 substituições de aminoácidos, 93 (60,4%) foram não conservativas para a amostra brbvusp01/07 e das 102 substituições para a amostra brdrusp100/07, 66 (64,7%) foram não conservativas.

Na posição 8 (Figura 65a) apenas a amostra brbvusp01/06 (amostra estudada) e EU293113 (cão da Guiana), únicas relacionadas à variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*, apresentam uma mudança de Tyr (na amostra referência PV-NC_001542) para Phe, assim como em outros treze resíduos com substituições conservativas (Glu₁₃₉, Lys₂₁₇, Gly₆₈₃, Thr₁₀₉₂, Arg₁₁₃₉, Ala₁₂₅₅, Val₁₆₁₇, Cys₁₆₁₉, Val₁₈₅₂, Ala₁₈₈₉, Ala₂₀₅₇, Ala₂₀₅₈, Arg₂₀₈₉) e três com substituições conservativas (Arg₆₄₅ [Figura 65b], Val₁₂₁₄, Asp₁₃₃₆) o que pode sugerir uma assinatura genética para esta variante. Já na posição 27 pôde ser observada uma Isoleucina apenas para as amostras pertencentes ao ciclo aéreo e uma Valina para as demais amostras (Figura 65c) e também os resíduos 24, 61, 122, 170, 1144, 1342, 1374, 1487 (Figura 65d), 1556, 1653, 1665 e 2101 foram relacionados ao ciclo aéreo de transmissão. Os resíduos 21, 88 (Figura 65e) e 107 foram comuns para as variantes relacionadas à *D. rotundus* e *T. brasiliensis*.

Foi possível também observar a polimerase viral, para a amostra estudada brbvusp01/06, e comparar alguns resíduos importantes segundo Ming et al. (2009), como a Cys₇₀, Val₈₄, Ala₉₄, Ile₁₁₈, Ser₁₅₃ e Asp₁₉₁. Destes sítios apenas o aminoácido 94 foi diferente entre a amostra brbvusp01/06 e a amostra de referência PV (NC_001542). Nesta posição a amostra estudada apresenta um aminoácido anterior aos descritos por Ming et al. (2009) onde a amostra de referência PV (NC_001542) não possui uma “dupla metionina” (dois consecutivos códons ATG) no sítio de início descrita por este grupo de pesquisadores. A presença da dupla metionina no sítio de início também foi descrita por Mochizuki et al. (2011), que associou à variantes virais mantidas por morcegos americanos, fato não confirmado uma vez que a dupla metionina, além de observada na amostra estudada brbvusp01/06, SHBRV-18 (AY705303) isolada de um morcego *L. noctivagans* dos Estados Unidos e um guaxinin do Canadá (EU311738), amostras que segregam no ciclo aéreo de transmissão, também pode ser observada em seis cães (FJ712193-5, GU345746, GU345748, GU358653), três ferrets (FJ712196, FJ866835-6), três humano (EF564174, EU643590, GU345747) e duas linhagens vacinais (EU549783, FJ959397) todos isolados na China.

A combinação dos iniciadores Início+FINAL (11.932 pb) e 21g+FINAL (11.877 pb), Início+Pol4R (11.643 pb) e 21g+Pol4R (11.588 pb) também foram testadas utilizando a *Expand Long Template PCR System*[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) com adaptações das quantidades de enzima, apresentando resultados promissores (Figura 20) para a amplificação com Início+FINAL (11.932 pb) de todo o genoma de uma só vez minimizando a necessidade de clonagem e possibilidade de contaminação por plasmídeos.

De acordo com o objetivo proposto no projeto inicial, foram sequenciados completamente quatro genes codificadores de quatro das cinco proteínas do vírus da raiva, além de parte do gene codificador da polimerase viral da variante relacionada e mantida por populações de morcegos hematófagos *D. rotundus* e comparadas filogeneticamente com a amostra PV e outras variantes previamente descritas.

Apesar das quatro primeiras proteínas virais estarem completamente sequenciadas, a metodologia necessária padronizada e a amplificação do material genômico do gene codificador para a polimerase ter se mostrado extremamente eficiente, o sequenciamento do gene codificador para a polimerase deste vírus não foi facilitado pelo conhecimento adquirido durante este estudo como para as demais proteínas. Além disto, poucos trabalhos se dedicaram a um estudo desta importante proteína, indispensável para a replicação de todos os vírus. Os trabalhos que retratam a polimerase viral disponíveis na literatura são antigos (Mellon e Emerson, 1978; Poch et al., 1990) e não especificamente desenvolvidos para o vírus da raiva (Hamaguchi et al., 1983; Horikami et al., 1992).

Apenas muito recentemente alguns grupos têm sequenciado a polimerase ao estudar o vírus da raiva completamente (Delmas et al., 2008; Nagaraja et al., 2008; Beckert et al., 2009; Ming et al., 2009; Mochizuki et al., 2009, 2011), porém sem que relatem especificamente os achados relacionados a esta proteína. Estes grupos não descrevem dificuldades para o estudo da polimerase, como fatores relacionados ao rendimento da reação de PCR e a determinação da concentração ideal de DNA necessário ao sequenciamento, ao contrário do observado durante o desenvolvimento deste estudo.

Os resíduos Ala₃₇₇, Thr₃₇₉, Thr₄₃₃ na nucleoproteína, Asn₆₁, Ser₆₈, Gly₁₁₂ na fosfoproteína, Leu₈₂, Ile₁₄₈, Leu₁₈₄ na proteína de matriz, Ser₂₁₃, Arg₃₆₇, Glu₄₂₇, Cys₄₇₅, Asp₄₇₈ na glicoproteína (Sato et al., 2004) e Phe₈, Glu₁₃₉, Lys₂₁₇, Arg₆₄₅, Gly₆₈₃, Thr₁₀₉₂, Arg₁₁₃₉, Val₁₂₁₄, Ala₁₂₅₅, Asp₁₃₃₆, Val₁₆₁₇, Cys₁₆₁₉, Val₁₈₅₂, Ala₁₈₈₉, Ala₂₀₅₇, Ala₂₀₅₈, Arg₂₀₈₉ na polimerase viral podem ser considerados assinaturas genéticas da variante mantida por *D. rotundus*.

Este trabalho é o primeiro passo para um estudo evolutivo abrangente para o vírus da raiva assim como Delmas et al. (2008) realizou para os Lyssavirus. A polimerase viral ainda necessita de estudos direcionados à conservação, evolução viral e mecanismo de funcionamento. Delmas et al. (2008) questiona a classificação genética com base apenas na identidade de nucleotídeos da proteína N conforme sugerido por Kissi et al. (1995) além da necessidade de novos estudos de polimorfismo em todas as proteínas virais. Davis et al. (2006) ao analisar a dinâmica e a história evolutiva do vírus da raiva descreve que a origem do vírus em morcegos no continente Americano ainda é desconhecida, não excluindo a possibilidade da existência da raiva em morcegos, antes da colonização do Novo Mundo.

Finalmente, o estudo dos morcegos como reservatórios não se restringe ao vírus da raiva, uma vez que Calisher et al. (2006) e Zhengli (2010) relatam a identificação de mais de 80 vírus diferentes em amostras provenientes de morcegos, sugerindo a possibilidade de que os morcegos possam dispor um sistema imune diferenciado ou ainda de alguma atividade antiviral, uma vez que algumas dessas viroses identificadas em morcegos, aparentemente não são letais para estes animais.

Nos últimos cinco anos a raiva na América Latina apresentou uma alteração de perfil epidemiológico, característico de regiões onde a raiva mantida por populações de cães foi controlada, evidenciando a existência de variantes mantidas por animais silvestres, principalmente morcegos. Estes animais são capazes de desempenhar o papel de transmissores ou, algumas vezes, reservatórios deste vírus, tornando as ações de profilaxia e vigilância epidemiológica imprescindíveis para manter o controle da doença e evitar novos surtos de raiva.

7 CONCLUSÕES

O estudo genético da variante do vírus da raiva mantida por populações de morcego *D. rotundus*, isolada de uma amostra deste morcego no Brasil foi desenvolvido durante o período de março de 2007 a novembro de 2010 sendo possível concluir que:

- a) Um protocolo rápido e econômico para a obtenção de cDNA para o vírus da raiva independente de clonagem foi estabelecido e testado mostrando-se eficiente;
- b) Os *primers* desenhados foram eficientes para o sequenciamento de quatro proteínas virais completas e parte da polimerase da variante do vírus da raiva estudada;
- c) Ao se comparar filogeneticamente as amostras estudadas com a amostra padrão da espécie viral *Rabies virus*, além de outras da mesma espécie viral disponíveis no *GenBank*, foi possível observar e corroborar a presença dos ciclos aéreo e terrestre de transmissão, previamente descritos e validados para a nucleoproteína, em cada uma das proteínas e fragmentos estudados;
- d) A análise da sequência de aminoácidos de cada uma das proteínas virais indicou presença de 31 resíduos que possivelmente representem assinaturas genéticas para a variante mantida por morcegos hematófagos *D. rotundus*. Esta análise das substituições não conservativas de aminoácidos nas amostras estudadas brbvusp01/06 e brdrusp100/07 demonstrou que a variabilidade genética segue a ordem decrescente de $P > G > L > M > N$.

REFERÊNCIAS*

- Almeida MF, Martorelli LF, Aires CC, Sallum PC, Massad E. Indirect oral immunization of captive vampires, *Desmodus rotundus*. *Virus Res.* 2005 Jul;111(1):77-82.
- Almeida MF, Martorelli LF, Aires CC, Sallum PC, Durigon EL, Massad E. Experimental rabies infection in haematophagous bats *Desmodus rotundus*. *Epidemiol Infect.* 2005 Jun;133(3):523-7.
- Anilionis A, Wunner WH, Curtis PJ. Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature.* 1981;Nov;294(5838):275-8.
- Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(3):333-7.
- Arellano-Sota C. Biology, Ecology, and Control of the Vampire Bat. *Reviews of Infectious Diseases.* 1988;10(4):S615-S619.
- Baer GM. *The Natural History of Rabies.* 2nd ed. Florida: Boca Raton: CRC Press; 1991. 389 p.
- Badrane H, Tordo N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J Virol.* 2001;75(17):8096-104.
- Banerjee AK. Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiol. Rev.* 1987 Mar; 51(1):66–87.
- Beckert A, Geue L, Vos A, Neubert A, Freuling C, Müller T. Genetic stability (in vivo) of the attenuated oral rabies virus vaccine SAD B19. *Microbiol Immunol.* 2009 Jan;53(1):16-21.
- Belotto AJ. Organization of Mass Vaccination for Dog Rabies in Brazil. *Rev Infect Dis.* 1988 Nov-Dec;10(4):S693-6. Available from: <http://www.jstor.org/stable/4454720> [2011 Feb 20].
- Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo H, Correa E. Overview of rabies in the Americas. *Virus Res.* 2005;111:5-12.

* De acordo com International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://icmje.org> [2007 May 22].

Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A, Lafay F. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol*. 1991;65:4198-203.

Birney EC, Rising JD. Notes on distribution and reproduction of some bats from Kansas, with remarks on incidence of rabies. *Trans Kans Acad Sci*. 1967;80:519-24.

Boulger LR, Porterfield JS. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1958 Sep;52(5):421-4.

Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus Genus. *Virology*. 1993;194:70-81.

Bourhy H, Kissi B, Lafon M, Sacramento D, Tordo N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *J Clin. Microbiol*. 1992 Sep;30(9):2419-26.

Botvinkin AD, Poleschuk EM, Kuzmin IV, Borisova TI, Gazaryan SV, Yager P, Rupprecht CE. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(12):1623-5.

Brasil. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Protocolo para tratamento de raiva humana no Brasil. *Epidemiol Serv Saude*. 2009 Out-Dez;18(4):385-94. doi: 10.5123/S1679-49742009000400008.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde: Coordenação de Doenças transmitidas por vetores e antropozoonoses. Informes técnicos. Brasília, 2005. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_raiva.pdf#search=%22%22Portel%22%20%2B%20raiva%22. [18 ago. 2006].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. 6. ed. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. 816 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de Manejo e Controle. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 1998. 117 p.

Brown LJ, Rosatte RC, Fehlner-Gardiner C, Knowles MK, Bachamnn P, Davies JC, Wandeler A, Sobey K, Donovan D. Immunogenicity and efficacy of two vaccines in wild-caught, captive raccoons. *J Wild Dis*. 2011 Jan;47(1):182-94.

Burnett CD. Bat rabies in Illinois: 1965 to 1986. J Wild Dis. 1989;25(1):10-9.

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. Clin Microbiol Rev. 2006 Jul;19(3):531-45. doi: 10.1128/CMR.00017-06.

Carini A. Sur une grande epizootie de rage. Ann Inst Pasteur. 1911;25:843-6.

Carnieli Jr P, Castilho JG, Fahl Wde O, Véras NM, Timenetsky Mdo C. Genetic characterization of Rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. Virus Res. 2009a Sep;144(1-2):215-24.

Carnieli Jr P, Castilho JG, Fahl Wde O, Véras NM, Carrieri ML, Kotait I. Molecular characterization of Rabies Virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. Virus Res. 2009b Apr;141(1):81-9.

Carnieli Jr P, Fahl Wde O, Castilho JG, Oliveira Rde N, Macedo CI, Durymanova E, Jorge RS, Morato RG, Spíndola RO, Machado LM, Ungar de Sá JE, Carrieri ML, Kotait I. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. Virus Res. 2008 Jan;131(1):33-46.

Carnieli Jr P, Brandão PE, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI, Machado LM, Rangel N, de Carvalho RC, de Carvalho VA, Montebello L, Wada M, Kotait I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. Virus Res. 2006 Sep;120(1-2):113-20.

Carrieri ML, Favoretto SRL, Carnieli P, Queiroz LH, Souza MCAM, Panachao MRI, Takaoka NY, Harmani NMS, Kotait I. *Desmodus rotundus* como transmissor da raiva canina e felina no Estado de São Paulo, 1998-2000. In: Seminário Internacional Morcegos como Transmissores da Raiva; 22-24 de agosto 2000; São Paulo; 2000. p. 42-3.

Castilho JG, Canello FM, Scheffer KC, Achkar SM, Carrieri ML, Kotait I. Antigenic and genetic characterization of the first rabies virus isolated from the bat *Eumops perotis* in Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2008;50:95-9.

Cisterna D, Bonaventura R, Caillou S, Pozo O, Andreau ML, Fontana LD, Echegoyen C, de Mattos C, de Mattos C, Russo S, Novaro L, Elberger D, Freire MC. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. Virus Res. 2005;109(2):139-47.

Constantine DG. Rabies transmission by non-bite route. Public Health Rep. 1962;77:287-9.

- Costa WA, Cunha RS, Bolzan VL, Silva AdeC, Caporale GM, Chaves LB, Oselka GW, Junqueira DA, Panacho MR, Dias RA, Takaoka NY. Immunogenicity and safety of a new Vero cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 2007 Nov;25(48):8140-5.
- Coulon P, Ternaux JP, Flamand A, Tuffereau C. An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons in vivo and in vitro. *J Virol*. 1998 Jan;72(1):273-8.
- Cox JH, Dietzschold B, Schneider LG. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect Immun*. 1977 Jun;16(3):754-9.
- da Rosa EST, Kotait I, Barbosa TFS, Carrieri ML, Brandão PE, Pinheiro AS, Begot AL, Wada MY, De Oliveira RC, Grisard EC, Ferreira M, Lima RJS, Montebello L, Medeiros DBA, Sousa RCM, Bensabath G, Carmo EH, Vasconcelos PFC. Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2006 Aug;12(8):1197-202.
- Davis PL, Bourhy H, Holmes EC. The evolutionary history and dynamics of bat rabies virus. *Infect Genet Evol*. 2006 Nov;6(6):464-73. doi: 10.1016/j.meegid.2006.02.007.
- Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The Fluorescent Antibody. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 88-95.
- Delmas O, Holmes EC, Talbi C, Larrous F, Dacheux L, Bouchier C, Bourhy H. Genomic Diversity and Evolution of the Lyssaviruses. *Plos ONE*. 2008;3(4):e2057. doi: 10.1371/journal.pone.0002057
- Delpietro HA, Gury-Dhomen F, Largui OP, Mena-Segura C, Abramo L. Monoclonal Antibody Characterization of Rabies Virus Strains Isolated in the River Plate Basin. *J Vet Med B*. 1997;44:477-83.
- Diaz AM, Papo S, Rodrigues A, Smith JS. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. *Journal of Veterinary Medicine B*. 1994;41:153-60.
- Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, Lopes AD, Lafon M, Smith CL, Koprowski. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with the pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:70-4. doi: 10.1073/pnas.80.1.70.

Dietzschold B, Rupprecht CE, Tollis M, Lafon M, Mattei J, Wiktor TJ, Koprowski. Antigenic Diversity of the Glycoprotein and Nucleocapsid Proteins of Rabies and Rabies-Related Viruses: Implications for Epidemiology and Control of Rabies. *Rev Infect Dis.* 1988 Nov-Dez;10(Suppl4):S785-98.

dos Santos AS, Lemos MA, Pereira CA, Jorge SA. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells: influence of re-selection on protein expression. *Biotechnol J.* 2009 Nov;4(11):1578-81.

Faber M, Faber ML, Li J, Preuss MA, Schnell MJ, Dietzschold B. Dominance of a nonpathogenic glycoprotein gene over a pathogenic glycoprotein gene in rabies virus. *J Virol.* 2007 Jul;81(13):7041-7.

Faber M, Faber ML, Papaneri A, Bette M, Weihe E, Dietzschold B, Schnell MJ. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J Virol.* 2005 Nov;79(22):14141-8.

Faber M, Pulmanausahakul R, Nagao K, Prosniak M, Rice AB, Koprowski H, Schnell MJ, Dietzschold B. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:16328-32.

Familusi JB, Osunkoya BO, Moore DL, Kemp GE, Fabiyi A. A fatal human infection with Mokola virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1972 Nov;21(6):959-63.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy: The eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press. San Diego-California (USA); 2004. 1162 p.

Favi M, Nina A, Yung V, Fernandez J. Characterization of rabies virus isolates in Bolivia. *Virus Res.* 2003 Nov;97(2):135-40.

Favi M, De Mattos CA, Yung V, Chala E, López LR, De Mattos CC. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. *Emerg Infect Dis.* 2002 Jan;8(1):79-82.

Favoretto SR, De Mattos CC, Morais NB, Araújo FAA, De Mattos CA. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*) from the State of Ceará, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(6):1062-5.

Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EM, Aguiar EA, Silva LH, Sodre MM, Souza MC, Kotait I. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002;44(2):91-5.

Favoretto SR. Antigenic and genetic typification of rabies virus as tool for epidemiological surveillance. Rabies virus detection and phylogenetic studies from human exhumed sample. In: XIV RITA – Rabies in the Americas; 2003; Philadelphia-PA, USA; 2003. p. 8.

Flores-Crespo R. Biologia de murcielagos hematófagos. In: Seminário Internacional Morcegos como Transmissores da Raiva; 22-24 de agosto 2000; São Paulo; 2000. p. 46.

Fraser J, Fang S, Barfoot R, Clayton PT. Idiopathic rhabdomyolysis. *J R Soc Med*. 1996 Dec;89(12):706-7.

Frazatti-Galina NM, Mourão-Fuches RM, Paoli RL, Silva MLN, Miyaki C, Valentini EJG, Raw I, Higashi HG. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 2004;23:511-7.

Fuenzalida E, Palácios R. Un método mejorado para la preparacion de la vacuna antirrabica. *Boll Inst Bacteriol*. 1955;8:3.

Gaudin Y, Tuffereau C, Segretain D, Knossow M, Flamand A. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J Virol*. 1991 Sep;65(9):4853-9.

Gaudin Y, Ruigrok RW, Knossow M, Flamand A. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol*. 1993 Mar;67(3):1365-72.

Goldwasser RA, Kissling RE. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proceedings Society for Experimental Biology and Medicine*. 1958;98:219-23.

Gould AR, Hyatt AD, Lunt R, Kattenbelt JA, Hengstberger S, Blacksell SD. Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. *Virus Res*. 1998 Apr;54(2):165-87.

Gong W, Jiang Y, Za Y, Zeng Z, Shao M, Fan J, Sun Y, Xiong Z, Yu X, Tu C. Temporal and spatial dynamics of rabies viruses in China and Southeast Asia. *Virus Res*. 2010 Jun;150(1-2):111-8.

Hamaguchi M, Yoshida T, Nishikawa K, Naruse H, Nagai Y. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology*. 1983;128:105-17.

Harty RN, Paragas J, Sudol M, Palese P. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *J Virol*. 1999 Apr;73(4):2921-9.

Harty RN, Brown ME, McGettigan JP, Wang G, Jayakar HR, Huibregtse JM, Whitt MA, Schnell MJ. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):10623-9.

Hirano S, Itou T, Shibuya H, Kashiwazaki Y, Sakai T. Molecular epidemiology of rabies virus isolates in Uganda. *Virus Res*. 2010 Jan;147(1):135-8.

Horack HM. Allergy as a factor in the development of reactions to antirabic treatment. *Ammer J Med Sci*. 1939;197:672-82.

Horikami SM, Curran J, Kolakofsky D, Moyer SA. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication *in vitro*. *J Virol*. 1992;66:4901-8.

Hummeler K, Koprowski H, Wiktor TJ. Structure and Development of Rabies Virus in Tissue Culture. *J Virol*. 1967 Feb;1(1):152-70.

Hurst EW, Pawan JL. An outbreak of rabies in Trinidad, without history of bites and with symptoms of acute ascending myelitis. *Lancet*. 1931;2:622-8.

Hurst EW, Pawan JL. A further account of the Trinidad outbreak of acute rabic myelitis. *J. Pathol. Bacteriol*. 1932;35:301-21.

International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>. [2009 Dec 17].

Ito M, Arai YT, Itou T, Sakai T, Ito FH, Takasaki T, Kurane I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoir, dogs and vampire bats. *Virology*. 2001a;284:214-22.

Ito N, Kakemizu M, Ito KA, Yamamoto A, Yoshida Y, Sugiyama M, Minamoto N. A comparison of complete genome sequences of the attenuated RC-HL strain of rabies virus used for production of animal vaccine in Japan, and the parenteral Nishigahara strain. *Microbiol. Immunol.* 2001b;45(1):51-8.

Jackson AC, Wunner WH. *Rabies*. London: Academic Press – Elsevier; 2007. 800 p.

Johnson N, Un H, Fooks AR, Freuling C, Müller T, Aylan O, Vos A. Rabies epidemiology and control in Turkey: past and present. *Epidemiol Infect.* 2010 Mar;138(3):305-12.

Kemp GE, Causey OR, Moore DL, Odelola A, Fabiyi A. Mokola virus. Further studies on IbAn 27377, a new rabies-related etiologic agent of zoonosis in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* 1972 May;21(3):356-9.

King AA, Meredith CD, Thomson GR. The biology of southern African lyssavirus variants. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;187:267-95.

King AA, Turner GS. Rabies: a review. *J Comp Pathol.* 1993 Jan;108(1):1-39.

Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology.* 1995;209(2):526-37.

Kissling RE. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958;98(2):223-5.

Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, Cunha EM, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J Vet Med Sci.* 2005;67(7):647-52.

Kobayashi Y, Okuda H, Nakamura K, Sato G, Itou T, Carvalho AA, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. Genetic analysis of phosphoprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. *J Vet Med Sci.* 2007 Nov;69(11):1145-54.

Koprowski H, Cox HR. Studies on chick-embryo-adapted rabies virus; culture characteristics and pathogenicity. *J Immunol.* 1948;60:533-44.

Kuzmin IV, Hughes GJ, Botvinkin AD, Orciai LA, Rupprecht CE. Phylogenetic relationships of Irkut an West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative

criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res.* 2005 Jul;111(1):28-43.

Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, Rupprecht CE. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res.* 2003;97:65-79.

Lafon M, Herzog M, Sureau P. Human rabies vaccines induce neutralising antibodies against the European bat rabies virus (Duvenhage). *Lancet.* 1986 Aug;30:2(8505):515.

Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science.* 1982 Jan;8;215(4529):182-4.

Lopez RA, Miranda PP, Tejada VE, Fishbein DB. Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle. *Lancet.* 1992 Feb;339(8790):408-12.

Lopes RL, Anaya E, Arenas A, Fernandez M. Tipificacion antigênica del vírus rabico em el Peru. In: IX International meeting on research advances and rabies control in the Americas. Puerto Vallarta, Jalisco, México, December 8-12, 1998. p 40-1.

Loza-Rubio E, Aguilar-Setien A, Bahloul C, Brochier B, Pastoret PP, Tordo N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch Med Res.* 1999;30(2):144-9.

Lord RD. Seasonal Reproduction of Vampire Bats and Its Relation to Seasonality of Bovines Rabies. *Journal of Wildlife Disease.* 1992;28(2):292-4.

Maddison DR, Maddison WP. *MacClade 4: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*, version 4.0. Sunderland: Sinauer Associates; 2000.

Markotter W, Van Eeden C, Kuzmin IV, Rupprecht CE, Paweska JT, Swanepoel R, Fooks AR, Sabeta CT, Cliquet F, Nel LH. Epidemiology and pathogenicity of African bat lyssaviruses. *Dev Biol (Basel).* 2008;131:317-25.

Martorelli LFA, Aguiar EAC, Almeida MF, Durigon EL. Genetic characterization of rabies virus isolates from Sao Paulo State, Brazil, during the period 1989-2000. In: XII International Meeting on Research Advances and Rabies Control in the Americas; November, 12-16 2001, Peterborough, Canada. Peterborough, Canada; 2001. p. 62.

Mattos CA, De Mattos CC, Smith JS, Miller ET, Sara-Papo AV, Osburn BI. Genetic characterization of rabies field from Venezuela. *J Clin Microbiol.* 1996;34(6):1553-8.

Mattos CC, De Mattos CA, Loza-Rubio E, Aguilar-Setién A, Orciari LA, Smith JS. Molecular Characterization of Rabies Virus Isolates from Mexico: Implications for Transmission Dynamics and Human Risk. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:587-97.

Mattos CA, Favi M, Yung V, Pavletic C, De Mattos CC. Bat rabies in urban centers in Chile. *Journal of Wildlife Diseases.* 2000;36(2):231-40.

McElhinney LM, Marston DA, Stankov S, Tu C, Black C, Johnson N, Jiang Y, Tordo N, Müller T, Fooks AR. Molecular epidemiology of lyssaviruses in Eurasia. *Dev Biol (Basel).* 2008;131:125-31. Review.

Mellon MG, Emerson SU. Rebinding of transcriptase components (L and NS proteins) to the nucleocapsid template of vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 1978;Sep;27(3):560-7.

Meredith CD, Prossouw AP, Koch HP. An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. *S Afr Med J.* 1971 Jul;17;45(28):767-9.

Ming P, Du J, Tang Q, Yan J, Nadin-Davis SA, Li H, Tao X, Huang Y, Hu R, Liang G. Molecular characterization of the complete genome of a street rabies virus isolated in China. *Virus Res.* 2009 Jul;143(1):6-14.

Mita T, Shimizu K, Ito N, Yamada K, Ito Y, Sugiyama M, Minamoto N. Amino acid at position 95 of the matrix protein is a cytopathic determinant of rabies virus. *Virus Res.* 2008 Oct;137(1):33-9.

Mochizuki N, Kobayashi Y, Sato G, Itou T, Gomes AA, Ito FH, Sakai T. Complete genome analysis of a rabies virus isolate from Brazilian wild fox. *Arch Virol.* 2009;154(9):1465-88. doi: 10.1007/s00705-009-0475-9

Mochizuki N, Kobayashi Y, Sato G, Hirano S, Itou T, Ito FH, Sakai T. Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a haematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. *J Vet Med Sci.* 2011; Feb 2 [Epub ahead of print].

Moreno JA, Baer GM. Experimental rabies in the vampire bat. *Am J Trop Med Hyg.* 1980;29(2):254-9.

- Nadin-Davis SA, Casey GA, Wandeler AI. A molecular epidemiological study of rabies virus in central Ontario and western Quebec. *J Gen Virol.* 1994 Oct;75(Pt 10):2575-83.
- Nadin-Davis SA, Casey GA, Wandeler AI. Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. *J Gen Virol.* 1993 May;74(Pt 5):829-37
- Nadin-Davis SA, Huang W, Wandeler AI. Polymorphism of rabies viruses within the phosphoprotein and matrix protein genes. *Arch Virol.* 1997;142(5):979-92.
- Nadin-Davis SA, Abdel-Malik M, Armstrong J, Wandeler AI. Lyssavirus P gene characterisation provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. *Virology.* 2002 Jul;5;298(2):286-305.
- Nagaraja T, Madhusudana S, Desai A. Molecular characterization of the full-length genome of a rabies virus isolate from India. *Virus Genes.* 2008 Jun;36(3):449-59.
- Nowak RM. Walker's mammals of the world. 7th ed. Baltimore and London, Johns Hopkins University Press, 2 vols. 397pg, 2003.
- Organização Panamericana de Saúde (OPAS) – Instituto Panamericano de Proteccion de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) Boletín Vigilancia epidemiologica. 1999; vol. XXXI. p 27 e 34.
- Pan American Health Organization (PAHO). Los anticuerpos monoclonales em la caracterizacion y vigilancia de los vírus de La rabia em America Latina y el Caribe. *Pan Am J Public Health.* 2000;8(3):214-7.
- Pasteur, L. Méthode pour prevenir la rage apres morsure. *Comptes R Acad Sci.* 1885; 101:765-72.
- Pasteur L, Chamberland C, Roux E, Thuiller L. Nouveaux faits pour servir à la conaissance de la rage. *Comptes R Acad Sci.* 1882;95:1187-92.
- Pasteur L, Chamberland C, Roux E, Thuiller L. Sur la Rage. *Comptes R Acad Sci.* 1881;92:1259-60.
- Pawan JL. Rabies in the vampire bat of Trinidad with special reference to the clinical course and the latency of infection. *Ann Trop Med Parasitol.* 1936;30:401-22.

Pawan JL. Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and the latency of infection. *Caribb Med J*. 1959;21:137-56.

Perrin P, Portonoï D, Sureau P. Étude de l'adsorption et de la pénétration du virus rabique: interactions avec les cellules BHK-21 et les membranes artificielles. *Ann Virol (Inst Pasteur)*. 1982;v. 133^E, p. 403-22.

Queiroz-Lima E. A transmissão da raiva dos herbívoros pelos morcegos hematófagos da família Desmodontidae. *Ver Depto Nac Prod Anim*. 1934;1:165.

Richardson JH, Ramsey RL, Starr LE. Bat rabies in Georgia, 1956-1965. *Public Health Reports*. 1966;81:1031-5.

Rodrigues YJL, Tamayo JG. Pathogeny of the Experimental Infection with the Rabies Virus in Hematophagous Bat (*Desmodus rotundus*). *Rev Fac Cs Vets*. 2000;41(1-3):71-2.

Rousseau CM, Birditt BA, McKay AR, Stoddard JN, Lee TC, McLaughlin S, Moore SW, Shindo N, Learn GH, Korber BT, Brander C, Goulder PJ, Kiepiela P, Walker BD, Mullins JI. Large-scale amplification, cloning and sequencing of near full-length HIV-1 subtype C genomes. *J Virol Methods*. 2006 Sep;136(1-2):118-25.

Sacramento D, Bourhy H, Tordo N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol Cel Probes*. 1991;6:229-40.

Sato G, Kobayashi Y, Motizuki N, Hirano S, Itou T, Cunha EM, Ito FH, Sakai T. A unique substitution at position 333 on the glycoprotein of rabies virus street strains isolated from non-hematophagous bats in Brazil. *Virus Genes*. 2009 Feb;38(1):74-9.

Sato G, Itou T, Shoji Y, Miura Y, Mikami T, Ito M, Kurane I, Samara SI, Carvalho AAB, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *J Vet Med Sci*. 2004 Jul;66(7):747-53.

Schneider LG, Barnard BJH, Schneider HR Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigations and oral vaccination studies: I. African virus. In: Kuwert E, Merieux C, Koprowski H, Bogel K, editors. *Rabies in the tropics*. Berlin: Springer-Verlag; 1985. p. 47-59.

- Schneider MC, Santos-Burgoa C. Tratamiento contra la rabia humana: un poco de su historia. *Revista de Saúde Pública*. 1994;28(6):454-63.
- Schneider LG, Cox JH. Bat lyssaviruses in Europe. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;187:207-18. Review.
- Schneider MC, Belotto A, Adé MP. Situación epidemiológica de la rabia humana en América Latina en 2004. *Boletín Epidemiológico/OPS*. 2005 Mar;26(1):1-4.
- Schowelter DB. Characteristics of bat rabies in Alberta. *Canadian J Comparative Medicine*. 1980;44:70-6.
- Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J Virol*. 1985;53:926-34.
- Selimov MA, Tatarov AG, Botvinkin AD, Klueva EV, Kulikova LG, Khismatullina NA. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol*. 1989 Dec;33(6):542-6.
- Selimov MA, Smekhov AM, Antonova LA, Shablovskaya EA, King AA, Kulikova LG. New strains of rabies-related viruses isolated from bats in the Ukraine. *Acta Virol*. 1991 May;35(3):226-31.
- Sellers TF. Complications of antirabic treatment. *J Med Am Ga*. 1947;36:30-5.
- Setien AA, Brochier B, Tordo N, De Paz O, Desmettre P, Péharpre D, Pastoret P-P. Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine*. 1998;16(11-12):1122-6.
- Shimizu K, Ito N, Mita T, Yamada K, Hosokawa-Muto J, Sugiyama M, Minamoto N. Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. *Virus Res*. 2007 Feb;123(2):154-60.
- Shope RE, Murphy FA, Harrison AK, Causey OR, Kemp GE, Simpson DIH, Moore DL. Two African Viruses Serologically and Morphologically Related to Rabies Virus. *J Virol*. 1970 Nov;6(5):690-2.
- Silva RA, Rivello GV, Nilsson MR. Isolamento do vírus rábico de morcego não hematófago

da espécie *Phyllostomus hastatus hastatus* (Pallas). Arquivos do Instituto de Biologia Animal, Rio de Janeiro. 1961;4:115-20.

Singer A, Kauhala K, Holmala K, Smith GC. Rabies in northeastern Europe-the threat from invasive raccoon dogs. J Wild Dis. 2009 Oct;45(4):1121-37.

Slate D, Algeo TP, Nelson KM, Chipman RB, Donovan D, Banton JD, Niezgoda M, Rupprecht. Oral rabies vaccination in North America: opportunities, complexities, and challenges. Plos Negl Trop Dis. 2009 Dec;22;3(12):e549.

Smith JS, Orciari LA, Yager PA, Seidel HD, Warner CK. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. J Infect Dis. 1992;166(2):296-307.

Soares RM, Bernardi F, Sakamoto SM, Heinemann MB, Cortez A, Alves LM, Meyer AD, Ito FH, Richtzenhain LJ. A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Jan;97(1):109-11.

Sodré MM, Gama AR, Almeida MF. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010 Mar-Apr;52(2):75-81. doi: 10.1590/S0036-46652010000200004.

Sokol F, Schlumberger HD, Wiktor TJ, Koprowski H. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. Virology. 1969 Aug;38(4):651-65.

Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ, Rupprecht C, Sutker WL, Ksiazek TG, Paddock CD, Guarner J, Shieh WJ, Goldsmith C, Hanlon CA, Zoretic J, Fischbach B, Niezgoda M, El-Feky WH, Orciari L, Sanchez EQ, Likos A, Klintmalm GB, Cardo D, LeDuc J, Chamberland ME, Jernigan DB, Zaki SR; Rabies in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. N Engl J Med. 2005;352(11):1103-11.

Steece RS, Erickson TJ, Siem RA. Chiropteran rabies in Minnesota: 1976-1980. J Wild Dis. 1982;18:487-9.

Steele JH, Fernandez PJ. History of rabies and global aspects. In: Baer GM. The natural history of rabies. 2nd ed. Florida: Boca Raton: CRC Press; 1991.

Sulkin SE, Krutzsch PH, Allen R, Wallis C. Studies on the pathogenesis of rabies in insectivorous bats. I. Role of brown adipose tissue. J Exp Med. 1959 Sep;110:369-88.

Superti, F, Seganti L, Tsiang H, Orsi N. Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cells. Brief Report. Arch Virol. 1984; 81: p. 321.

Superti F, Hauttecoeur B, Morelec MJ, Goldoni P, Bizzini B, Tsiang H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. J Gen Virol. 1986 Jan;67(Pt 1):47-56.

Szanto AG, Nadin-Davis SA, White BN. Complete genome sequence of a raccoon rabies virus isolate. Virus Res. 2008 Sep;136(1-2):130-9. doi: 10.1016/j.virusres.2008.04.029.

Taddei VA. Sistemática de quirópteros. Boletim Instituto Pasteur, São Paulo. 1996;1(2):3-15.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 2007;24:1596-9.

Tordo N, Poch C, Ermine A, Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. Nucleic Acids Res. 1986a;14: 2671-83.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? Proc Natl Acad Sci USA. 1986b Jun;83(11):3914-8.

Tordo, N. Characteristics and molecular biology of rabies vírus. In: Meslin, FX, Kaplan, MM, Koprowski, H. Laboratory techniques in rabies. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 28-51.

Torres S, Queiroz Lima E. A raiva e sua transmissão por morcegos hematófagos infectados naturalmente. Revista Depto Nacional Produção Animal. 1935;2:1-55.

Torres S, Queiroz Lima E. A raiva e os morcegos hematófagos. Morcegos que resistem a infecção tornam-se portadores e eliminadores do vírus? Revista Depto Nacional Produção Animal. 1936;3:165-74.

Uieda W, Hayashi MM, Gomes LH, Silva MMS. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. Boletim Instituto Pasteur, São Paulo. 1996;1(2):17-35.

Van Zyl N, Markotter W, Nel LH. Evolutionary history of African mongoose rabies. *Virus Res.* 2010 Jun;150(1-2):93-102.

Velasco-Villa A, Gomez-Sierra M, Hernandez-Rodriguez G, Juarez-Islas V, Melendez-Felix A, Vargas-Pino F, Velazquez-Monroy O, Flisser A. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):951-8.

Venters HD, Hoffert WR, Schatterday JE, Hardy AV. Rabies in bats in Florida. *Am J Public Health.* 1954 Feb;44(2):182-5.

Von Teichman BF, De Koker WC, Bosh SJ, Bishop GC, Meredith CD, Bingham J. Mokola virus infection: description of recent South Africa cases and review of the virus epidemiology. *J S Afr Vet Assoc.* 1998;69(4):169-71.

Warner CK, Zaki SR, Shieh WJ, Whitfield SG, Smith JS, Orciari LA, Shaddock JH, Niezgoda M, Wright CW, Goldsmith CS, Sanderlin DW, Yager PA, Rupprech CE. Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(3):502-7.

Warrel DA. The clinical picture of rabies in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976;70(3):188-95.

Wiktor TJ, Fernandes MV, Koprowski H. Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI-38. *J Immunol.* 1964;93:353-66.

World Health Organization. World survey of rabies no. 32 for the Year 1996. Geneva: The Organization.

World Health Organization. The World Survey for Rabies N°35 for the year 1999. Geneva: The Organization; 2000.

World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. WHO Technical Report Series 931. Geneva: The Organization; 2005. Available from: http://www.who.int/rabies/trs931_%2006_05.pdf. [2006 Ago 18].

World Health Organization. WHO. 2009. Available from: http://www.who.int/rabies/Global_Rabies_ITH_2008.png [2011 Feb 15].

Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, Chusid MJ, Rupprecht CE. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med*. 2005 Jun;16;352(24):2508-14.

Wu X, Franka R, Velasco-Villa A, Rupprecht CE. Are all lyssavirus genes equal for phylogenetic analyses? *Virus Res*. 2007 Nov;129(2):91-103.

Wu X, Hu R, Zhang Y, Dong G, Rupprecht CE. Reemerging rabies and lack of systemic surveillance in People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*. 2009 Aug;15(8):1159-64.

Wunner WH, Reagan KJ, Koprowski H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *J Virol*. 1984 Jun;50(3):691-7.

Wunner WH, Dietzschold B, Smith CL, Lafon M, Golub E. Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology*. 1985 Jan;140(1):1-12.

Wunner WH. Rabies virus. In: Jackson AC, Wunner WH. Rabies. San Diego: Academic Press; 2002. p. 23-77.

Wunner WH. Rabies virus. In: Jackson AC, Wunner WH. Rabies. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2002. p. 23-68.

Yung V, Favi M, Fernandez J. Genetic and antigenic typing of rabies virus in Chile. Brief report. *Arch Virol*. 2002 Nov;147(11):2197-205.

Zhengli S. Bat and virus. *Protein Cell*. 2010 Feb;1(2):109-14.

Zwickl DJ. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the Maximum Likelihood criterion. Ph.D. Thesis, Texas: The University of Texas at Austin; 2006.

ANEXOS

ANEXO A – Sequências utilizadas nas análises filogenéticas dos genes N, P, M, G e L

Nº Acesso <i>GenBank</i>	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
NC_001542	Rabies PV / Amostra de referência	França	N, P, M, G e L
GU592649 / GU592650 / GU592651 / GU592652 / GU592654	brbvusp01/06 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N, P, M, G e L
	brsgusp32 07 / <i>Callithrix jacchus</i>	Brasil	N, P, M e G
GU592648	brdrusp100/07 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	N, P, M, G e L
AB009663	Rabies virus RC-HL / linhagem vacinal	Japão	N, P, M, G e L
AB083792	Rabies virus strain dg2 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
AB083793	Rabies virus strain BRct3 / <i>Felis catus</i>	Brasil	N parcial
AB083794	Rabies virus strain BRct5 / <i>Felis catus</i>	Brasil	N parcial
AB083795	Rabies virus strain BRhm6 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
AB083796	Rabies virus strain BRdg10 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
AB083797	Rabies virus strain BRdg12 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
AB083798	Rabies virus strain BRdg15 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
AB083799	Rabies virus strain BRbv17 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083800	Rabies virus strain BRhr18 / equino	Brasil	N parcial
AB083801	Rabies virus strain BRhm23 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
AB083802	Rabies virus strain BRpg28 / suíno	Brasil	N parcial
AB083803	Rabies virus strain BRbv30 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083804	Rabies virus strain BRhr31 / equino	Brasil	N parcial
AB083805	Rabies virus strain BRbv32 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083806	Rabies virus strain BRvmbt33 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	N parcial
AB083807	Rabies virus strain BRvmbt34 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	N parcial
AB083808	Rabies virus strain BRsp35	Brasil	N parcial
AB083809	Rabies virus strain BRbv36 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083810	Rabies virus strain BRbv38 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083811	Rabies virus strain BRbv39 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083812	Rabies virus strain BRvmbt41 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	N parcial
AB083813	Rabies virus strain BRbv43 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083814	Rabies virus strain BRbv45 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083815	Rabies virus strain BRvmbt46 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	N parcial
AB083816	Rabies virus strain BRvmbt47 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	N parcial
AB083817	Rabies virus strain BRbv49 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB083818	Rabies virus strain BRbv50 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N parcial
AB085828	Rabies virus strain HEP_Flury / linhagem vicinal	Japão	N parcial
AB010494	Rabies virus Nishigahara N / linhagem vacinal	Japão	N
AB044824	Rabies strain Nishigahara / linhagem vacinal	Japão	N, P, M, G e L
AB052666	Rabies virus glycoprotein / <i>Canis familiaris</i>	Tailândia	G
AB085828	Rabies strain HEP Flury / linhagem vacinal	Japão	N, P, M, G e L
AB110656	Rabies virus BRct3 / <i>Felis catus</i>	Brasil	G
AB110657	Rabies virus BRhm6 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	G
AB110658	Rabies virus BRdg10 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	G
AB110660	Rabies virus BRhr18 / equino	Brasil	G
AB110661	Rabies virus BRpg28 / suíno	Brasil	G

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
AB110662	Rabies virus BRhr31 / equino	Brasil	G
AB110663	Rabies virus BRbv32 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	G
AB110664	Rabies virus BRvmbt 33 / morcego hematófago	Brasil	G
AB110665	Rabies virus BRsp35 / ovino	Brasil	G
AB110666	Rabies virus BRbv39 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	G
AB110667	Rabies virus BRbv45 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	G
AB110668	Rabies virus BRbv49 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	G
AB110669	Rabies virus BRbv50 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	G
AB115921	Rabies virus glycoprotein / <i>Canis familiaris</i>	Indonésia	G
AB117969 / AB291078 / AB291108	Rabies virus BR AL1 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	N, M e P
AB117970 / AB291079 / AB291109	Rabies virus BR AL2 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	N, M e P
AB117971 / AB291080 / AB291110	Rabies virus BR AL3 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	N, M e P
AB117972 / AB291081 / AB291111 / AB496697	Rabies virus BR AP1 / <i>Artibeus planirostris</i>	Brasil	N, M, P e G
AB128149	Rabies strain Ni CE / linhagem vacinal	Japão	N, P, M, G e L
AB201811	Rabies virus / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	N parcial
AB201812	Rabies virus / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	N parcial
AB247412 / AB291088 / AB291118	Rabies virus BRdg317 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	G, M e P
AB247414	Rabies virus BRdg322 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	G
AB247419	Rabies virus BRdg666 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	G
AB247421 / AB291092 / AB291122	Rabies virus BR DR1 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G, M e P
AB247422 / AB291093 / AB291123	Rabies virus BR DR2 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G, M e P
AB247423 / AB291094 / AB291124	Rabies virus BR DR3 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G, M e P
AB247425	Rabies virus BR DR5 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB247428	Rabies virus BR DR8 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB247431	Rabies virus BRfx240 / raposa	Brasil	G
AB247433 / AB291105 / AB291135	Rabies virus BRfx242 / cachorro do mato (<i>Dusicyon sp.</i>)	Brasil	G, M e P
AB247437	Rabies virus BRfx248 / raposa	Brasil	G
AB276307	Rabies virus BRhm16 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	G
AB276308	Rabies virus BRdg101 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	G
AB276309	Rabies virus BRct112 / <i>Felis catus</i>	Brasil	G
AB276310	Rabies virus BRct116 / <i>Felis catus</i>	Brasil	G
AB276311	Rabies virus BRhm528 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	G
AB276312	Rabies virus BRhm529 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	G
AB276313	Rabies virus BRhm530 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	G
AB276314	Rabies virus BRhm531 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	G
AB276315	Rabies virus BRhm671 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	G
AB291082 / AB291112	Rabies virus BRbv303 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	M e P
AB291083 / AB291113	Rabies virus BRbv306 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	M e P
AB291084 / AB291114	Rabies virus BRct112 / <i>Felis catus</i>	Brasil	M e P
AB291085 / AB291115	Rabies virus BRct116 / <i>Felis catus</i>	Brasil	M e P
AB291086 / AB291116	Rabies virus BRct333 / <i>Felis catus</i>	Brasil	M e P
AB291087 / AB291117	Rabies virus BRdg101 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	M e P
AB291089 / AB291119	Rabies virus BRdg335 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	M e P
AB291090 / AB291120	Rabies virus BRdg96 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	M e P

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
AB291091 / AB291121	Rabies virus BRdg97 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	M e P
AB291095 / AB291125 / AB383168	Rabies virus BR EF1 / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	M, P e G
AB291096 / AB291126 / AB383169	Rabies virus BR EF2 / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	M, P e G
AB291097 / AB291127 / AB383170	Rabies virus BR EF3 / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	M, P e G
AB291098 / AB291128 / AB383171	Rabies virus BR EF4 / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	M, P e G
AB291099 / AB291129	Rabies virus BR MM1 / <i>Molossus molossus</i>	Brasil	M e P
AB291100 / AB291130	Rabies virus BR MM1 / <i>Molossus molossus</i>	Brasil	M e P
AB291101 / AB291131	Rabies virus BR NL1 / <i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Brasil	M e P
AB291102 / AB291132	Rabies virus BR NL3 / <i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Brasil	M e P
AB291103 / AB291133	cachorro do mato (<i>Dusicyon sp.</i>)	Brasil	M e P
AB291104 AB291134	cachorro do mato (<i>Dusicyon sp.</i>)	Brasil	M e P
AB291106 / AB291136	cachorro do mato (<i>Dusicyon sp.</i>)	Brasil	M e P
AB291107 / AB291137	cachorro do mato (<i>Dusicyon sp.</i>)	Brasil	M e P
AB362483	Rabies strain BR Pfx1 / <i>Dusicyon sp.</i>	Brasil	N, P, M, G e L
AB373639	Rabies virus BR BAT15 / morcego	Brasil	G
AB373640	Rabies virus BR BAT16 / morcego	Brasil	G
AB373641	Rabies virus m28 07 / <i>Bos taurus</i>	Brasil	G
AB383162	Rabies virus BR BAT3 / morcego	Brasil	G
AB383163	Rabies virus BR BAT15 / morcego não hematófago	Brasil	G
AB383164	Rabies virus BR BAT16 / morcego não hematófago	Brasil	G
AB383165	Rabies virus BR BAT28 / morcego não hematófago	Brasil	G
AB383166	Rabies virus BR BAT29 / morcego não hematófago	Brasil	G
AB383167	Rabies virus BR EA1 / <i>Eumops auripendulus</i>	Brasil	G
AB383172	Rabies virus BR NL2 / <i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Brasil	G
AB428315	Rabies virus CHbv9 / <i>Bos taurus</i>	China	G
AB428322 / AB428333	Rabies virus strain CHbv7 / <i>Bos taurus</i>	China	M e P
AB458794	Rabies virus strain CHdg15 / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	P
AB458796 / AB505888	Rabies virus strain CHdg18 / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	P e M
AB496676	Rabies virus BR A1 / <i>Artibeus sp.</i>	Brasil	G
AB496677	Rabies virus BR A2 / <i>Artibeus sp.</i>	Brasil	G
AB496678	Rabies virus BR AF1 / <i>Artibeus fimbriatus</i>	Brasil	G
AB496679	Rabies virus BR AF2 / <i>Artibeus fimbriatus</i>	Brasil	G
AB496680	Rabies virus BR AL4 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496681	Rabies virus BR AL7 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496682	Rabies virus BR AL8 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496683	Rabies virus BR AL9 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496684	Rabies virus BR AL10 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496685	Rabies virus BR AL11 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496686	Rabies virus BR AL12 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496687	Rabies virus BR AL13 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496688	Rabies virus BR AL14 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496689	Rabies virus BR AL15 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496690	Rabies virus BR AL16 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496691	Rabies virus BR AL17 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496692	Rabies virus BR AL18 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
AB496693	Rabies virus BR AL19 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496694	Rabies virus BR AL20 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496695	Rabies virus BR AL21 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496696	Rabies virus BR AL22 / <i>Artibeus lituratus</i>	Brasil	G
AB496698	Rabies virus BR DR10 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB496699	Rabies virus BR DR11 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB496700	Rabies virus BR DR12 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB496701	Rabies virus BR DR13 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB496702	Rabies virus BR DR14 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB496703	Rabies virus BR DR16 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB496704	Rabies virus BR DR19 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB496705	Rabies virus BR DR20 / <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	G
AB505882	Rabies strain CHdg11 / <i>Canis familiaris</i>	China	M
AB505888	Rabies strain CHdg18 / <i>Canis familiaris</i>	China	M
AB518487	Rabies virus BRct9 / <i>Felis silvestris catus</i>	Brasil	G
AB518488	Rabies virus BRct22 / <i>Felis silvestris catus</i>	Brasil	G
AB518493	Rabies virus BRdg640 / <i>Canis lupus familiaris</i>	Brasil	G
AB518495	Rabies virus BRdg652 / <i>Canis lupus familiaris</i>	Brasil	G
AB571001	Rabies virus isolate MG 17 / <i>Bos taurus</i>	Mongólia	N
AB571009	Rabies isolate MGL 27 / <i>Vulpes vulpes</i>	Mongólia	N
AF033905	Rabies virus strain 9616FRA	França	N
AF045166	Rabies virus pehm3230 / <i>Homo sapiens</i>	Peru	N
AF070449	Rabies virus natural host <i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	N
AF070450	Rabies virus natural host <i>Tadarida brasiliensis</i>	Chile	N
AF155039	Rabies virus strain 3AG	China	N
AF351827	Rabies virus isolate EF1 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351828	Rabies virus isolate EF32 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351829	Rabies virus isolate EF33 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351830	Rabies virus isolate EF22 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351831	Rabies virus isolate EF31 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351832	Rabies virus isolate EF34 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351833	Rabies virus isolate EF12 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351834	Rabies virus isolate ML5 * / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Canadá	N
AF351835	Rabies virus isolate ME1 / <i>Myotis evotis</i>	Canadá	N
AF351836	Rabies virus isolate MC2 / <i>Myotis californicus</i>	Canadá	N
AF351837	Rabies virus isolate ML7 * / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Canadá	N
AF351838	Rabies virus isolate ML6 / <i>Myotis lucifugus</i>	Canadá	N
AF351839	Rabies virus isolate ML4 / <i>Myotis lucifugus</i>	Canadá	N
AF351840	Rabies virus isolate LAN12 / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Canadá	N
AF351841	Rabies virus isolate LAN13 / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Canadá	N
AF351842	Rabies virus isolate LAN8 / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Canadá	N
AF351843	Rabies virus isolate LI / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
AF351844	Rabies virus isolate LB1 / <i>Lasiurus borealis</i>	Canadá	N
AF351845	Rabies virus isolate LC1 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Canadá	N
AF351846	Rabies virus isolate LC2 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Canadá	N
AF351847	Rabies virus isolate DR Braz / <i>Bos taurus</i>	Brasil	N

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
AF351848	Rabies virus isolate CF1 / <i>Canis familiaris</i>	Canadá	N
AF351849	Rabies virus isolate TB1 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
AF351850	Rabies virus isolate IB Ch / morcego insetívoro	Chile	N
AF351851	Rabies virus isolate VV2 / <i>Vulpes vulpes</i>	Canadá	N
AF351852	Rabies virus isolate DRTd2 / <i>Bos taurus</i>	Trinidad	N
AF351853	Rabies virus isolate EF55 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351855	Rabies virus isolate EF19 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351856	Rabies virus isolate LB6 / <i>Lasiurus borealis</i>	Canadá	N
AF351857	Rabies virus isolate LB7 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
AF351858	Rabies virus isolate LC8 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Canadá	N
AF351859	Rabies virus isolate EF57 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351860	Rabies virus isolate EF71 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
AF351861	Rabies virus isolate EF3 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF351862	Rabies virus isolate EF40 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	N
AF360850 / L20673	Rabies virus RAVN1578SK Arctic fox 91RABN1578 / <i>Vulpes vulpes</i>	Canadá	M e N
AF360853	Rabies virus 90RABN9196 / <i>Vulpes vulpes</i>	Canadá	M
AF360855	Rabies virus 93RABN1090 / <i>Alopex lagopus</i>	Canadá	M
AF360856	Rabies virus V125 / <i>Procyon lotor</i>	Canadá	M
AF360857	Rabies virus NY516 / <i>Procyon lotor</i>	Canadá	M
AF369264	Rabies virus V001DG / linhagem vacinal	Canadá	P
AF369323	Rabies virus V015 / <i>Canis familiaris</i>	América do Sul	P
AF369338	Rabies virus 93ON0058BB / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	P
AF369339	Rabies virus 93ON2994BB / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	P
AF369340	Rabies virus 89SK1461BB / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	P
AF369341	Rabies virus 88BC1319BB / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	P
AF369342	Rabies virus V230.BBB / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	P
AF369343	Rabies virus V089.LBB / <i>Myotis sp.</i>	Canadá	P
AF369344	Rabies virus 4887.LBB / <i>Myotis sp.</i>	Canadá	P
AF369345	Rabies virus 4398.SHB / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Canadá	P
AF369346	Rabies virus V077.SHB / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Canadá	P
AF369347	Rabies virus V103.HB / <i>Lasiurus cinereus</i>	Canadá	P
AF369348	Rabies virus V231.RB / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	P
AF369349	Rabies virus 3694.MYO / <i>Myotis sp.</i>	Canadá	P
AF369350	Rabies virus 95ON4905BB / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	P
AF369351	Rabies virus 6832.RB <i>Lasiurus borealis</i>	Canadá	P
AF369352	Rabies virus 7890.LBB / <i>Myotis sp.</i>	Canadá	P
AF369353	Rabies virus 9499.MYO / <i>Myotis sp.</i>	Canadá	P
AF369354	Rabies virus V102.MYO / <i>Myotis sp.</i>	Canadá	P
AF369355	Rabies virus 89SK2317BB / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	P
AF369356	Rabies virus V158.SHB <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Canadá	P
AF369357	Rabies virus 93BC1950BB / <i>Eptesicus fuscus</i>	Canadá	P
AF369358	Rabies virus V179.LBB / <i>Myotis sp.</i>	Canadá	P
AF369359	Rabies virus V235.FTB / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	P
AF369360	Rabies virus V013.IB / morcego Insetívoro	América do Sul	P
AF369361	Rabies virus A1.IB / morcego Insetívoro	América do Sul	P
AF369362	Rabies virus V229.VB / <i>Desmodus rotundus</i>	América do Sul	P

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
AF369363	Rabies virus P10.VB / <i>Desmodus rotundus</i>	América do Sul	P
AF369364	Rabies virus P4.VB / <i>Desmodus rotundus</i>	América do Sul	P
AF369365	Rabies virus B2.VB / <i>Desmodus rotundus</i>	América do Sul	P
AF369366	Rabies virus M4.VB / <i>Desmodus rotundus</i>	América do Sul	P
AF369367	Rabies virus V324.VB / <i>Desmodus rotundus</i>	América do Sul	P
AF369368	Rabies virus V325.VB / <i>Desmodus rotundus</i>	América do Sul	P
AF499686	Rabies strain SRV9 / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
AF533786	Rabies virus CH_TB1271 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Chile	N parcial
AF533800	Rabies virus CH_TB3851 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Chile	N parcial
AF533804	Rabies virus CH_TB4009 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Chile	N parcial
AF533813	Rabies virus CHMy149 / <i>Myotis sp.</i>	Chile	N parcial
AF533814	Rabies virus CHLas2063 / <i>Lasiurus sp.</i>	Chile	N parcial
AF533824	Rabies virus CH_CIHM4312 / <i>Histiotus sp.</i>	Chile	N parcial
AF533828	Rabies virus CHLbtt3589 / <i>Lasiurus sp.</i>	Chile	N parcial
AY039224	Rabies virus isolate 1428 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
AY039229	Rabies virus isolate 132 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
AY170397	Rabies virus isolate 4862 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
AY170400	Rabies virus isolate usefu4886 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
AY170407	Rabies virus isolate 5100 / skunk	Estados Unidos	N
AY170409	Rabies virus isolate 5440 / skunk	Estados Unidos	N
AY170410	Rabies virus isolate 5441 / skunk	Estados Unidos	N
AY170413	Rabies virus isolate 5450 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
AY170415	Rabies virus isolate usmsp4873 / <i>Myotis sp.</i>	Estados Unidos	N
AY170416	Rabies virus isolate 4872 / <i>Myotis sp.</i>	Estados Unidos	N
AY170417	Rabies virus isolate 4891 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
AY233426	Rabies virus / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Argentina	N parcial
AY233427	Rabies virus / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Argentina	N parcial
AY257986	Rabies virus HM88 / <i>Homo sapiens</i>	Tailândia	P
AY352471	Rabies virus isolate 3454cow / <i>Bos taurus</i>	Rússia	N
AY654585	Rabies virus / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
AY654586	Rabies virus / <i>Callithrix jacchus</i>	Brasil	N parcial
AY654587	Rabies vírus / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
AY705373	Rabies virus SHBRV 18 / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Estados Unidos	N, P, M, G e L
AY854595	Rabies virus isolate V924 / <i>Desmodus rotundus</i>	México	N parcial
AY956319	Rabies virus organ recipient / <i>Homo sapiens</i>	Alemanha	N, P, M, G e L
D14873	Rabies virus RAVRCHL / linhagem vacinal	Japão	G
DQ011221	Rabies virus strain 98 / linhagem vacinal	Colômbia	P
DQ149104	Rabies virus 4371fx / raposa	Brasil	N parcial
DQ275559	Rabies virus isolate V825 / <i>Canis familiaris</i>	Canadá	P
DQ447947	Rabies vírus / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
DQ447948	Rabies vírus / <i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	N parcial
DQ447966	Rabies vírus / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
DQ447968	Rabies vírus / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
DQ631835	Rabies vírus / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	N parcial
DQ631837	Rabies vírus / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	N parcial
DQ631838	Rabies vírus / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	N parcial

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
DQ631839	Rabies vírus / <i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	N parcial
DQ875050	Rabies strain MRV / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
DQ875051	Rabies strain DRV / linhagem vacinal	China	N, P, M e L
EF152234	Rabies vírus 10563CthBA 03 / <i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	N parcial
EF152238	Rabies vírus 10568ctPB 03 / <i>Felis catus</i>	Brasil	N parcial
EF152239	Rabies vírus 10564ctPB 03 / <i>Felis catus</i>	Brasil	N parcial
EF152249	Rabies vírus 6968dgPE 05 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
EF152254	Rabies vírus 6980CthPE 05 / <i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	N parcial
EF152261	Rabies vírus 9370dgPE 05 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
EF152263	Rabies vírus 9372dgPE 05 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
EF152264	Rabies vírus 10561dgPB 03 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
EF152274	Rabies vírus 7579CthBA 05 / <i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	N parcial
EF152275	Rabies vírus 8257dgMA 05 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
EF152276	Rabies vírus 8575dgPA 05 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
EF152280	Rabies vírus 9479dgAL 05 / <i>Canis familiaris</i>	Brasil	N parcial
EF194159	Rabies vírus 4372CthPI 03 / <i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	N parcial
EF194163	Rabies vírus 6053CthSE 05 / <i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	N parcial
EF194165	Rabies vírus 6335CthPI 05 / <i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	N parcial
EF206707	Rabies strain ERA / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EF206708	Rabies strain SAD Bern Lysvulpen / linhagem vacinal	República Tcheca	N, P, M, G e L
EF206709	Rabies strain SAD B19 Fuchsoral / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EF206710	Rabies SAD Bern original var 1 / linhagem vacinal	Suíça	N, P, M, G e L
EF206711	Rabies SAD Bern original var 2 / linhagem vacinal	Suíça	N, P, M, G e L
EF206712	Rabies SAD Bern original var 3 / linhagem vacinal	Suíça	N, P, M, G e L
EF206713	Rabies SAD Bern original var 4 / linhagem vacinal	Suíça	N, P, M, G e L
EF206714	Rabies SAD Bern original var 5 / linhagem vacinal	Suíça	N, P, M, G e L
EF206715	Rabies SAD P5 88 Rabifox / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EF206716	Rabies SAD VA1 original / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EF206717	Rabies strain SAD1 3670 var 1 / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EF206718	Rabies strain SAD1 3670 var 2 / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EF206719	Rabies strain SAG 2 / linhagem vacinal	França	N, P, M, G e L
EF206720	Rabies strain SAD Bern Sanafox / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EF363743	Rabies vírus IP3067_04 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
EF363751	Rabies vírus IP5214_04 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
EF363757	Rabies vírus IP7541_05 / <i>Homo sapiens</i>	Brasil	N parcial
EF437215	Rabies isolate NNV RAB H / <i>Homo sapiens</i>	Índia	N, P, M, G e L
EF508140	Rabies vírus isolate PA30 / <i>Procyon lotor</i>	Estados Unidos	N
EF542830	Rabies strain RV 97 / linhagem vacinal	Rússia	N, P, M, G e L
EF564174	Rabies strain CTN181 / <i>Homo sapiens</i>	China	N, P, M, G e L
EU004771	Rabies vírus isolate CHN0615D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004772	Rabies vírus isolate CHN0517D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004773	Rabies vírus isolate CHN0528D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004774	Rabies vírus isolate CHN0532D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004775	Rabies vírus isolate CHN0633D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004776	Rabies vírus isolate CHN0610HD / <i>Homo sapiens</i>	China	P
EU004777	Rabies vírus isolate CHN0635H / <i>Homo sapiens</i>	China	P

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
EU004778	Rabies virus isolate CHN0642D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004779	Rabies virus isolate CHN0701D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004780	Rabies virus isolate CJS0621D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004781	Rabies virus isolate CJS0622D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004782	Rabies virus isolate CJS0523D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004783	Rabies virus isolate CJS0635D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004784	Rabies virus isolate CJS0636D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004785	Rabies virus isolate CJS0538D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004786	Rabies virus isolate CJS0639D / <i>Canis familiaris</i>	China	P
EU004787	Rabies virus isolate CYN0601H / <i>Homo sapiens</i>	China	P
EU004788	Rabies virus isolate CYN0701H / <i>Homo sapiens</i>	China	P
EU182346	Rabies strain RB E3 15 / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
EU182347	Mutant Rabies strain Rb E3 15 5 / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
EU293111	Rabies isolate 8764THA / <i>Homo sapiens</i>	Tailândia	N, P, M, G e L
EU293113	Rabies isolate 9001FRA / <i>Canis familiaris</i>	Guiana	N, P, M, G e L
EU293115	Rabies isolate 9147FRA / raposa	França	N, P, M, G e L
EU293116	Rabies virus isolate 9704ARG / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Argentina	N, P, M, G e L
EU293121	Rabies isolate 8743THA / <i>Homo sapiens</i>	Tailândia	N, P, M, G e L
EU311738	Rabies isolate RRV ON 99 2 / <i>Procyon lotor</i>	Canadá	N, P, M, G e L
EU549783	Rabies strain BD06 / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
EU643590	Rabies strain HN10 / <i>Homo sapiens</i>	China	N, P, M, G e L
EU877067	Rabies strain SAD B19 4th / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EU877068	Rabies strain SAD B19 1st / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EU877069	Rabies strain SAD B19 1st / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EU877070	Rabies strain SAD B19 5th / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EU877071	Rabies strain SAD B19 10th / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
EU886632	Rabies collection 2002 / raposa vermelha	Alemanha	N, P e M
EU886633	Rabies collection 2004 / raposa vermelha	Austria	N, P e M
EU886635	Rabies collection 2005 / raposa vermelha	Alemanha	N, P e M
FJ415313	Rabies virus isolate NeiMeng925 / <i>Nyctereutes procyonoides</i> - <i>Raccoon-dog</i>	China	M e P
FJ465387	Rabies virus 28 00 / <i>Galerella sanguinea</i> (mangusto)	África do Sul	G
FJ465401	Rabies virus 420 90 / <i>Cynictis penicillata</i> (mangusto amarelo)	África do Sul	G
FJ465403	Rabies virus 718 98 / <i>Genetta genetta</i>	África do Sul	G
FJ542364	Rabies virus strain Oaxaca California / <i>Homo sapiens</i>	Estados Unidos	N
FJ577895	Rabies strain Flury LEP C / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
FJ712193	Rabies isolate D01 / <i>Canis familiaris</i>	China	N, P, M, G e L
FJ712194	Rabies isolate D02 / <i>Canis familiaris</i>	China	N, P, M, G e L
FJ712195	Rabies isolate F02 / <i>Canis familiaris</i>	China	N, P, M, G e L
FJ712196	Rabies isolate F04 / <i>Melogale moschata</i> (ferret)	China	N, P, M, G e L
FJ866835	Rabies strain FJ008 / <i>Melogale moschata</i> (ferret)	China	N, P, M, G e L
FJ866836	Rabies strain FJ009 / <i>Melogale moschata</i> (ferret)	China	N, P, M, G e L
FJ913470	Rabies strain ERA VC / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
FJ959397	Rabies strain CTN 1 / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
GQ233040	Rabies virus glycoprotein / <i>Canis familiaris</i>	Índia	G
GQ303556	Rabies virus isolate D9 52 / <i>Canis familiaris</i>	Tailândia	N
GQ472505	Rabies virus strain GXWX / suíno	China	P

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
GQ472549	Rabies virus GXL A / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472550	Rabies virus GXL B / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472551	Rabies virus GXL CC / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472552	Rabies virus GXN 119 / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472553	Rabies virus GXN N2 / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472554	Rabies virus GXN ND / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472555	Rabies virus GXPL / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472556	Rabies virus GXPXD / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472557	Rabies virus GXQZD / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ472558	Rabies virus GXSL / <i>Bos taurus</i>	China	G
GQ472559	Rabies virus GXWX / suíno	China	G
GQ472560	Rabies virus GXYZD / <i>Canis lupus familiaris</i>	China	G
GQ918139	Rabies strain CVS 11 / linhagem vacinal	França	N, P, M, G e L
GU345746	Rabies isolate CQ92 / <i>Canis familiaris</i>	China	N, P, M, G e L
GU345747	Rabies isolate J / <i>Homo sapiens</i>	China	N, P, M, G e L
GU345748	Rabies isolate SH06 / <i>Canis familiaris</i>	China	N, P, M, G e L
GU358653	Rabies isolate GX4 / <i>Canis familiaris</i>	China	N, P, M, G e L
GU565703	Rabies Flury LEP / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
GU565704	Rabies Flury HEP / linhagem vacinal	China	N, P, M, G e L
GU644641	Rabies virus isolate AZ4030 / <i>Antrozous pallidus</i>	Estados Unidos	N
GU644642	Rabies virus isolate AZ1968 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644643	Rabies virus isolate AZ7590 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644644	Rabies virus isolate CA237 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644645	Rabies virus isolate CA29 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644646	Rabies virus isolate CA9242 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644647	Rabies virus isolate CA0120 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644648	Rabies virus isolate CA0253 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644649	Rabies virus isolate CA148 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644650	Rabies virus isolate CA6860 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644651	Rabies virus isolate CA0100 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644652	Rabies virus isolate GA31940 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644653	Rabies virus isolate GA36568 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644654	Rabies virus isolate IA042 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644655	Rabies virus isolate IA381 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644656	Rabies virus isolate IA543 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644657	Rabies virus isolate MI1251 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644658	Rabies virus isolate MI1271 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644659	Rabies virus isolate MI1406 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644660	Rabies virus isolate MI1586 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644661	Rabies virus isolate MI1672 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644662	Rabies virus isolate MI1833 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644663	Rabies virus isolate MI782 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644664	Rabies virus isolate MI784 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644665	Rabies virus isolate MI1209 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644666	Rabies virus isolate MI1328 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644667	Rabies virus isolate MI1865 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
GU644668	Rabies virus isolate MI1905 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644669	Rabies virus isolate MI399 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644670	Rabies virus isolate MI596 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644671	Rabies virus isolate NJ104 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644672	Rabies virus isolate NJ1049 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644673	Rabies virus isolate NJ1212 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644674	Rabies virus isolate NJ511 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644675	Rabies virus isolate NJ949 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644676	Rabies virus isolate VA1623 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644677	Rabies virus isolate VA2057 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644678	Rabies virus isolate WA0355 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644679	Rabies virus isolate WA369 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644680	Rabies virus isolate WA052 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644681	Rabies virus isolate WA173 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644682	Rabies virus isolate WA267 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644683	Rabies virus isolate WA1043 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644684	Rabies virus isolate WA1087 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644685	Rabies virus isolate WA1159 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644686	Rabies virus isolate WA016 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644687	Rabies virus isolate WA1455 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644688	Rabies virus isolate WA1586 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644689	Rabies virus isolate WA1596 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644690	Rabies virus isolate WA1625 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644691	Rabies virus isolate WA50 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644692	Rabies virus isolate WA1770 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644693	Rabies virus isolate WA1833 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644694	Rabies virus isolate WA1858 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644695	Rabies virus isolate WA2017 / <i>Eptesicus fuscus</i>	Estados Unidos	N
GU644696	Rabies virus isolate CA16461 / <i>Lasiurus blossevillei</i>	Estados Unidos	N
GU644697	Rabies virus isolate CA0077 / <i>Lasiurus blossevillei</i>	Estados Unidos	N
GU644698	Rabies virus isolate FL701 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644699	Rabies virus isolate FL854 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644700	Rabies virus isolate GA60243 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644701	Rabies virus isolate MI1625 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644702	Rabies virus isolate NJ2262 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644703	Rabies virus isolate TN132 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644704	Rabies virus isolate TN269 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644705	Rabies virus isolate TN33 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644706	Rabies virus isolate TX4843 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644707	Rabies virus isolate TX6070 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644708	Rabies virus isolate TX2356 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644709	Rabies virus isolate TX5276 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644710	Rabies virus isolate TX5751 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644711	Rabies virus isolate TX5976 / <i>Lasiurus borealis</i>	Estados Unidos	N
GU644712	Rabies virus isolate AZ1838 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644713	Rabies virus isolate AZ5392 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N

Nº Acesso GenBank	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
GU644714	Rabies virus isolate AZ7771 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644715	Rabies virus isolate ID7227 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644716	Rabies virus isolate ID7232 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644717	Rabies virus isolate TN183 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644718	Rabies virus isolate TN410 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644719	Rabies virus isolate WA0524 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644720	Rabies virus isolate WA1617 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644721	Rabies virus isolate WA2085 / <i>Lasiurus cinereus</i>	Estados Unidos	N
GU644722	Rabies virus isolate FL1024 / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
GU644723	Rabies virus isolate FL845 / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
GU644724	Rabies virus isolate FL905 / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
GU644725	Rabies virus isolate FL978 / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
GU644726	Rabies virus isolate FL1165 / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
GU644727	Rabies virus isolate TX4904 / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
GU644728	Rabies virus isolate TX5433 / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
GU644729	Rabies virus isolate TX4350 / <i>Lasiurus intermedius</i>	Estados Unidos	N
GU644730	Rabies virus isolate ID7376 / <i>Lasionycteris noctivagans</i>	Estados Unidos	N
GU644731	Rabies virus isolate FL769 / <i>Lasiurus seminolus</i>	Estados Unidos	N
GU644732	Rabies virus isolate GA7034 / <i>Lasiurus seminolus</i>	Estados Unidos	N
GU644733	Rabies virus isolate TX6197 / <i>Lasiurus seminolus</i>	Estados Unidos	N
GU644734	Rabies virus isolate TX5565 / <i>Lasiurus seminolus</i>	Estados Unidos	N
GU644735	Rabies virus isolate TX5512 / <i>Lasiurus seminolus</i>	Estados Unidos	N
GU644736	Rabies virus isolate TX5850 / <i>Lasiurus seminolus</i>	Estados Unidos	N
GU644737	Rabies virus isolate TX6127a / <i>Lasiurus seminolus</i>	Estados Unidos	N
GU644738	Rabies virus isolate AZ2953 / <i>Lasiurus xanthinus</i>	Estados Unidos	N
GU644739	Rabies virus isolate CA2070 / <i>Lasiurus xanthinus</i>	Estados Unidos	N
GU644740	Rabies virus isolate CA06 / <i>Lasiurus xanthinus</i>	Estados Unidos	N
GU644741	Rabies virus isolate FL1078 / <i>Myotis austroriparius</i>	Estados Unidos	N
GU644742	Rabies virus isolate FL331 / <i>Myotis austroriparius</i>	Estados Unidos	N
GU644743	Rabies virus isolate ID7198 / <i>Myotis californicus</i>	Estados Unidos	N
GU644744	Rabies virus isolate ID7261 / <i>Myotis californicus</i>	Estados Unidos	N
GU644745	Rabies virus isolate WA1502 / <i>Myotis californicus</i>	Estados Unidos	N
GU644746	Rabies virus isolate ID7233 / <i>Myotis evotis</i>	Estados Unidos	N
GU644747	Rabies virus isolate WA2020 / <i>Myotis keenii</i>	Estados Unidos	N
GU644748	Rabies virus isolate MI1100 / <i>Myotis lucifugus</i>	Estados Unidos	N
GU644749	Rabies virus isolate MI1367 / <i>Myotis lucifugus</i>	Estados Unidos	N
GU644750	Rabies virus isolate TN39 / <i>Myotis lucifugus</i>	Estados Unidos	N
GU644751	Rabies virus isolate AZ2857 / <i>Myotis yumanensis</i>	Estados Unidos	N
GU644752	Rabies virus isolate CA828 / <i>Myotis yumanensis</i>	Estados Unidos	N
GU644753	Rabies virus isolate CA957 / <i>Myotis yumanensis</i>	Estados Unidos	N
GU644754	Rabies virus isolate FL1384 / <i>Nycticeius humeralis</i>	Estados Unidos	N
GU644755	Rabies virus isolate AZ1258 / <i>Parastrellus hesperus</i>	Estados Unidos	N
GU644756	Rabies virus isolate CA2167 / <i>Parastrellus hesperus</i>	Estados Unidos	N
GU644757	Rabies virus isolate IN1657 / <i>Perimyotis subflavus</i>	Estados Unidos	N
GU644758	Rabies virus isolate TX5168 / <i>Perimyotis subflavus</i>	Estados Unidos	N
GU644759	Rabies virus isolate CA178 / <i>Corynorhinus townsendii</i>	Estados Unidos	N

Nº Acesso <i>GenBank</i>	Identificação (Hospedeiro / Linhagem)	Origem	Gene
GU644760	Rabies virus isolate AZ2405 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644761	Rabies virus isolate AZ2579 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644762	Rabies virus isolate AZ3086 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644763	Rabies virus isolate AZ6914 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644764	Rabies virus isolate AZ982 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644765	Rabies virus isolate CA0408 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644766	Rabies virus isolate CA0052 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644767	Rabies virus isolate CA0299 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644768	Rabies virus isolate CA15822 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644769	Rabies virus isolate CA15824 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644770	Rabies virus isolate CA1984 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644771	Rabies virus isolate CA2132 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644772	Rabies virus isolate CA268 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644773	Rabies virus isolate CA3054 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644774	Rabies virus isolate CA46 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644775	Rabies virus isolate CA1032 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644776	Rabies virus isolate CA96 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644777	Rabies virus isolate FL148 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644778	Rabies virus isolate GA093 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644779	Rabies virus isolate GA112 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644780	Rabies virus isolate GA135 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644781	Rabies virus isolate GA187 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644782	Rabies virus isolate MS076 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644783	Rabies virus isolate MS079 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644784	Rabies virus isolate TX5775 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644785	Rabies virus isolate TX5922 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644786	Rabies virus isolate TX6344 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644787	Rabies virus isolate TX7244 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU644788	Rabies virus isolate TX5603 / <i>Tadarida brasiliensis</i>	Estados Unidos	N
GU647092	Rabies isolate JX08 45 / <i>Melogale moschata</i>	China	N, P, M, G e L
L20672	Rabies virus RAVN5809FX / Ontario fox	Canadá	N
M13215	Rabies virus RAVMMGN / clones pRb - PV strain	França	N, P, M, G e L
M31046	Rabies virus RAVCGA SAD B19 / linhagem vacinal	Alemanha	N, P, M, G e L
M81059	Rabies virus RAVGPRA street / <i>Canis familiaris</i>	Argélia	G
U22478	Rabies virus 9001GUY / <i>Canis familiaris</i>	Guiana Francesa	N

ANEXO B – Artigo enviado para publicação no *Journal of Virological Methods*.

Journal of Virological Methods

Manuscript Draft

Title: **One-step protocol for amplification of full-length cDNA of the rabies virus genome**

Article Type: Research Paper

Keywords: Rabies Virus

Long cDNA

Sequencing

Method Development

Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction

*** Manuscript**

One-step protocol for amplification of full-length cDNA of the rabies virus genome

Angélica Cristine de Almeida Campos^a, Fernando Lucas Melo^b, Camila Malta Romano^{b,c}, Danielle Bastos Araujo^a, Elenice Maria Sequetin Cunha^f, Débora Regina Veiga Sacramento^{a,e}, Paolo Marinho de Andrade Zanotto^b, Edison Luiz Durigon^a and Silvana Regina Favoretto^{a,d}

- a) Núcleo de Pesquisas em Raiva do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular da Universidade de São Paulo, Av Prof. Lineu Prestes, 1374, sala 225 CEP: 05508-900, São Paulo – Brazil
- b) Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Av Prof. Lineu Prestes, 1374, sala 215 CEP: 05508-900, São Paulo – Brazil
- c) Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Professor Enéas de Carvalho Aguiar, 470, CEP: 05403-000, São Paulo – Brazil
- d) Instituto Pasteur de São Paulo, Av Paulista, 393, CEP: 01311-000, São Paulo – Brazil
- e) Genomic Engenharia Molecular, Rua Itapeva, 500, Cj 5AB, CEP: 01332-903, São Paulo – Brazil
- f) Laboratório de Encefalites do Centro de P&D de Sanidade Animal do Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

camposac@usp.br or srfavoretto@usp.br

Phone: +55 11 3091 7293 or +55 11 7535 7270

SUMMARY

Full-length genome sequencing of the rabies virus is not a routine laboratory procedure. To fully understand the epidemiology, genetic variation and evolution of the rabies virus, full-length viral genomes need to be obtained. For rabies virus studies, cDNA synthesis is usually performed using nonspecific oligonucleotides followed by cloning. When specific primers are used, the cDNA obtained is only partial and is limited to the coding regions. Therefore, the development of methods for synthesizing long cDNA using rabies virus-specific primers is of fundamental importance. A new protocol for the synthesis of long cDNA and the development of 19 new primers are described in this study. This procedure allowed the efficient amplification of the full-length genome of the rabies virus variant maintained by hematophagous bat (*Desmodus rotundus*) populations following the synthesis of a complete long cDNA. Partial sequencing of the rabies virus genome was performed to confirm rabies-specific PCR amplification. Because degenerate primers were employed, this technique can easily be adapted to other variants. Importantly, this new method is faster and less expensive than cloning methods.

Keywords: Rabies Virus, Long cDNA, Sequencing, Method Development, Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction

1. Introduction

The *Rabies virus*, which belongs to the *Lyssavirus* genus of the *Rhabdoviridae* family, has a single-stranded, nonsegmented negative-sense RNA genome of about 12 kb comprising five protein-coding genes, N, P, M, G and L (Tordo, 1996). These genes encode for the nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G) and large, virion-associated transcriptase (L) protein (Tordo et al., 1986a and 1986b; Wunner et al., 1988) and are separated by short intergenic regions and a long pseudogene between the G and L genes. This sequence is flanked by a 3' leader region (Le) and a 5' trailer region (Tr) (Wunner, 2002).

Rabies, an endemic zoonotic virus characterized by acute evolution, is caused by a group of neurotropic viruses that infect domestic and wild animals. Rabies is widely distributed and defies all the available technological resources for control of this disease, resulting in thousands of human deaths worldwide annually. According to the World Health Organization (WHO), rabies is a public health problem that can cause serious environmental and economic damage despite the existence of effective vaccines for human and veterinary use (WHO, 2005).

Species of the Carnivora and Chiroptera orders are recognized as wild reservoirs. *Lyssavirus* strains that are adapted to bats are genetically different from carnivore-related rabies viruses (WHO, 2005). This fact confirms the need to develop methodologies that allow more precise complementary studies concerning the biology and epidemiology of rabies. Corroborating this idea, Faber et al. (2004) mapped the complete genome of *Lasiurus noctivagans*, an important reservoir of the rabies virus in North America. Given the importance of increased understanding of this virus, Delmas et al. (2008), Szanto et al. (2008) and Mochizuki et al. (2009)

recently mapped other variants of the rabies virus: one isolated from an insectivore bat, one from *Procyon lotor* and one from *Dusicyon sp.* respectively.

The rabies virus strain maintained among populations of hematophagous bats (*Desmodus rotundus*), which are a natural reservoir for the virus in the region spanning from Mexico to the north of Argentina, causes economic loss to herds. Furthermore, this strain is transmitted to humans, posing a serious public health problem in several countries, particularly in the Amazon region.

In the early 1980s, the development of molecular biology techniques allowed improved diagnostic tests and epidemiological studies regarding the rabies virus. The detection of viral RNA by reverse transcription followed by polymerase chain reaction amplification (RT-PCR) permits diagnosis in tissue samples (Sacramento et al., 1991; Kamolvarin et al., 1993; Whitby et al., 1997; Nadin-Davis, 1998; Heaton et al., 1999; Black et al., 2000; Smith et al., 2000; Echevarría et al., 2001), even in highly decomposed or formalin-fixed samples, from which viral isolation is impossible (David et al., 2002; Favoretto et al., 2005; Rojas-Anaya et al., 2006; Araujo et al., 2008, Lopes et al., 2010). Several research groups have improved these techniques to optimize molecular studies. It is currently possible to distinguish the 11 viral species of the genus *Lyssavirus* using molecular analysis methods (ICTV, 2009).

For studies involving the rabies virus, cDNA synthesis is usually performed using nonspecific oligonucleotides and cloning. When specific primers are used, only partial cDNA is obtained (Marston et al., 2007; Inoue et al., 2003; Ito et al., 2001a and 2001b).

To create a simple, cost-effective and specific method for studying the Rabies virus, we developed a new protocol for long cDNA synthesis and subsequent

amplification. Specific primers complementary to the different coding regions of the viral genome and intergenic regions were developed.

Several methods for viral RNA transcription exist; however, these methods, which are intended for the study of short gene fragments, are not efficient enough for the analysis of long gene fragments or complete genomes. The methods used for genetic studies of the rabies virus are usually limited to the transcription of coding genes for different viral proteins. The development of methods for synthesizing long cDNA using specific primers for the rabies virus is therefore of great importance.

2. Materials and methods

2.1. Viral Specimens

Five different rabies virus samples from four different variants were selected from the Sample Bank of the Center for Rabies Research/Biosafety Level 3 Laboratory of the Clinical and Molecular Virology Laboratory of the Institute of Biomedical Sciences II at the University of Sao Paulo (ICBII-USP), São Paulo-Brazil and maintained at -70 °C. The sample brdrusp01/09 was isolated from hematophagous bats, and antigenic and genetic identification showed that it was related to the variant maintained among *D. rotundus* bat populations (Accession number GU592648). A **first-passage virus was made in Swiss** albino mouse brains. The sample brsgusp32/07 was isolated from Brazilian marmosets, and antigenic and genetic identification showed a characteristic pattern of variant maintained by marmosets. The sample brmnusp91/05 was isolated from insectivorous bat (*Myotis nigricans*) and segregated with samples isolated from insectivorous bats (Accession number HM173087). The sample brcvusp47/05 was a Challenge Virus Standard maintained in cell culture, and the sample brbvusp01/06 of

bovine origin was previously characterized as a hematophagous bat variant and utilized as a positive control (Accession number GU592649).

2.2. Description of the Oligonucleotide Primers

To determine the complete genome of any rabies virus variant, 19 oligonucleotide primers (Table 1) were designed based on the GenBank published complete genome nucleotide sequence from wild strains (Accession numbers AY705373, AY956319, EF437215) and vaccine strains (AB009663, EF206707, M31046, NC_001542) using OLIGO 6.83 software (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO). The same program was used to analyze the quality of the primers by calculating annealing temperatures and assessing the presence of false base-pairing regions and 'hairpins'.

2.3. Total RNA Extraction

To each fragment of macerated brain, 500 µL of DEPC[®] H₂O was added, and samples were vortex homogenized. Total RNA was extracted using 500 µL of Trizol LS Reagent[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) in an ice bath and refrigerated centrifuge. Two hundred microliters of 25:24:1 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) was then added, and samples were vortex homogenized for 15 seconds, chilled on ice for 5 minutes and centrifuged at 12,000x g at 4 °C for 5 minutes.

After centrifugation, the supernatants were precipitated by adding isopropanol 100% (v/v) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO), and samples were vortex homogenized and incubated on ice for 15 minutes. The mixtures were then

centrifuged at 12,000x g for 15 minutes, supernatants were discarded and the pellets were washed with 1 mL of 75% ethanol (Merck, Darmstadt, Germany). The suspensions were then centrifuged at 7,500x g at 4 °C for 8 minutes. The supernatants were again discarded, and after drying, the sediments were resuspended in 30 µL of DEPC H₂O containing 40 U of ribonuclease inhibitor (RNase OUT, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Quantitation of the extracted RNA was performed using a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

2.4. Reverse Transcription Reaction (RT-PCR) - (cDNA Synthesis)

To synthesize rabies virus long cDNA, the reverse transcription (RT) reaction methodology described below was developed:

Twenty-five microliters of extracted RNA was added to 2 µL of 10 mM dNTP (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and 5 µL of antisense primer (10 pmol/µL), which anneals at the end position of the genome (5' extremity). These samples were then incubated at 65 °C for 5 minutes. Nineteen microliters of a second mixture containing 200 U of Reverse Transcriptase (RT) (MMLV - Moloney-murine leukemia virus/Super Script™ – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), 8 µL of enzyme buffer (50 mM tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 4 mM DTT, 40 U of ribonuclease inhibitor (RNase OUT, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and H₂O DEPC (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) were added. The first stage of transcription was performed at 45 °C for 105 minutes. An additional 200 U of RT (MMLV/Super Script™ – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) was then added, and the reaction was incubated for another 105 minutes. After this final reverse transcription step, RT

was inactivated at 70 °C for 15 minutes followed by an incubation of 20 minutes at 37 °C.

2.5. Polymerase Chain Reaction - (PCR Amplification)

To amplify each viral gene individually, PCRs were performed using cDNA diluted in 10x reaction buffer, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 50 pmol of each primer, 2.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and H₂O DEPC in a final volume of 50 µL.

In addition to the primers presented in Table 1, a pair of previously described primers (Smith et al., 1995) was also used to amplify and sequence part of the nucleoprotein coding region.

Amplifications were carried out using the following cycling conditions: samples were preheated for 5 minutes at 95 °C, subjected to 35 cycles of denaturation for 45 seconds at 94 °C, primer annealing for 45 seconds at temperatures between 45 °C and 58 °C depending on the pair of primers employed (Table 1) and primer extension for 90 seconds at 72 °C, and terminated with a final extension step for 5 minutes at 72 °C before being held at 4 °C in a MasterCycler Gradient Eppendorf thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Each PCR experiment included samples lacking RNA template as negative controls and H₂O as contamination controls. The amplified products were identified by 1.5% agarose gel electrophoresis (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and visualized by ethidium bromide [0.5 µg/mL] (Edt Br, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO) staining under UV light. One kilobase DNA markers (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canada) were used to determine the size of each product. The results obtained were subsequently documented.

Double-stranded PCR-amplified products were purified using the ExoSAP-IT system (GE Healthcare Bio-Sciences Ltd - USB Corporation, Cleveland, OH) according to the manufacturer's instructions.

To amplify the full-length rabies genome, 300 ng of long cDNA were diluted in 10x reaction buffer, 25 mM dNTP Mix, 40 pmol of each primer (Inicio + Pol 4R), and 2.5 U of Expand Long DNA polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in a final volume of 50 μ L.

The thermal cycling conditions were as follows: 1 cycle of 2 minutes at 94 $^{\circ}$ C, 20 cycles of 10 seconds at 94 $^{\circ}$ C, primer annealing for 30 seconds at temperatures between 62 $^{\circ}$ C to 54 $^{\circ}$ C with a decrease of -0.5 $^{\circ}$ C per cycle and 10 minutes at 68 $^{\circ}$ C, 25 cycles of 10 seconds at 94 $^{\circ}$ C, 30 seconds at 53 $^{\circ}$ C and 10 minutes at 68 $^{\circ}$ C and a final extension step of 10 minutes at 68 $^{\circ}$ C. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and the sizes of products were estimated based on their electrophoretic mobilities relative to those of the 1 kb DNA ladder (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

2.6. Sequence Reaction and Purification

Products were quantitated using a Thermo Scientific NanoDropTM 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), and 30-100 ng of each product were added to microtubes containing 2 μ L of 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3.2 pmol of primer, 2 μ L of ABI PRISM DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Big Dye v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA) and DEPC water in a final volume of 10 μ L.

The homogenized mixture was placed in a MasterCycler Gradient Eppendorf thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), denatured for 5 minutes at 96 $^{\circ}$ C,

and subjected to 25 cycles of 10 seconds at 96 °C, 15 seconds at 50 °C and 4 minutes at 60 °C.

The excess dideoxynucleotide terminators were removed with the Applied Biosystems Big Dye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in accordance with the manufacturer's recommendations.

Purified samples were subjected to electrophoresis in POP6 polymer using an automatic sequencer ABI-PRISM model 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The samples were automatically tracked using the Automatic DNA Analyzer software package of the ABI-PRISM model 3100.

2.6.1. Processing and Alignment of the Rabies Virus Sequences

The nucleotide sequences obtained from individual gene fragments generated after long cDNA amplification was analyzed using the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.html) to confirm amplification of the specific product.

3. Results

RNAs were quantitated using a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). The RNA concentrations obtained were above 145.42 ng/μL.

The quantity of each cDNA used in PCR reactions was based on the size of the fragment to be amplified. One hundred fifty nanograms of cDNA were used for nucleoprotein, glycoprotein and polymerase, while quantities between 80-150 ng of cDNA were sufficient for amplification of phosphoprotein and matrix genes.

Positive PCR results were obtained for each rabies genes and for the entire viral genome of the five samples studied and positive control, confirming the viability of long cDNA synthesis (Figures 1).

Figure 1 shows the amplification of the N, P, M, G and L genes generated from the long cDNA. Amplification of the nucleoprotein gene using the Inicio + 304 primers produced a single amplicon of 1,550 bp. The primer pairs NPM1F + NPM1R and NPM2F + NPM2R were used to amplify the phosphoprotein and matrix genes, generating fragments of 1,147 bp and 1,224 bp, respectively. As expected, the glycoprotein amplicon was detected at 2,164 bp. A partial amplification of L-polymerase using the Pol 3F + Final primers was also detected, resulting in a product of 1,699 bp.

The complete amplification of the rabies virus genome using the primer pair Inicio + Pol 4R produced a single amplicon of 11,622 bp.

To confirm rabies-specific PCR amplification, each product was submitted to direct sequencing of both strands. Following purification, the amplified material was quantitated. For the N, P, M and G genes, between 10 and 30 ng of each purified PCR product was used, while for the polymerase, between 10 and 100 ng of the PCR product was required. Sequence comparisons revealed extensive nucleotide sequence identity between amplified products and representative *Lyssaviruses* belonging to genotype 1.

4. Discussion

Since the first complete sequence of the fixed rabies virus strain was published in 1986 (Tordo et al. 1986), there have been numerous reports documenting partial rabies genome characterization. The reason for this is that

generating a single, nearly full-length PCR amplicon using RNA as the template has been relatively difficult. A good strategy for amplification and sequencing of nearly full-length cDNA is therefore needed.

The aims of this study were to optimize a method for synthesizing long cDNA of the rabies virus using a specific primer at the 5' trailer position and to develop new primers that can be employed either for amplification or sequencing based on sequences deposited in GenBank. Previous studies have reported primers that were designed based for a specific group of samples. The primers presented in this paper were designed to be able to detect most rabies virus strains. Based on current knowledge of the rabies virus, these primers bind conserved regions of the genome (Tordo et al., 1986), but contain degenerate oligonucleotides. This feature allows the primers to be used for many variants isolated from different animals. Additionally, melting temperatures near 55 °C were evaluated to abolish some secondary structural elements and prevent interference with the activity of RT.

Optimal conditions for reverse transcription and PCR amplification were defined, resulting in a simple, sensitive, fast and effective assay for sequencing of nearly full-length rabies virus cDNA from all fresh samples and samples maintained at -70°C. Because long cDNA synthesis is performed only once, while synthesizing cDNA for each viral gene would entail repeating the process at least five times, the methods reported here proved to be less expensive and faster than the currently used protocols (Ito et al., 2001; Mochizuki et al., 2009). The fact that samples are manipulated only once also minimizes the risk of contamination or mixed samples, resulting in improved quality control. Moreover, long cDNA synthesis is extremely efficient, allowing for amplification of the complete viral genome, including the 3' leader region.

Previously reported methods are more complex, can introduce bias and require PCR products to be cloned with a commercially available cloning kit. These methods are more time-consuming and require special equipment, reagents and lab space, resulting in increased cost. Furthermore, in the method described here, the number of reverse transcription reactions is reduced: instead of five gene-specific reactions, this method uses a single reaction. Therefore, this new methodology provides a viable alternative that can be introduced and implemented in any molecular biology laboratory to map the complete genome of the rabies virus.

Studies using the long cDNA are being conducted by several research groups (Marston et al., 2007; Rousseau et al., 2006). The optimization of the time dedicated to laboratorial practice and these techniques will make larger scale analyses possible. It is important to note that PCR amplifications performed using a long cDNA as a template ensure that all fragments amplified come from the same virion instead of from a whole population. Further, this method consists in synthesize a long cDNA molecule and it is ideal for studying the epidemiology of the rabies virus as our results already reflect the currently circulating virus. Finally, this method results in synthesis of a long cDNA molecule, it can be adapted for other viruses, including flavivirus and retroviruses.

The development of new primers and new methodologies that lead to the standardization of laboratory procedures allows a broader variety of questions to be addressed. New data must be obtained to elucidate the role of circulating viral variants and their interaction with their host. Thus, increased numbers of phylogenetic studies will provide a better knowledge of viral evolution and allow for improved decision making regarding the epidemiological control of the rabies virus.

Acknowledgements

This work was supported by Sao Paulo Research Foundation - FAPESP Process: 07/01843-0.

5. References

Araujo, D.B., Langoni, H., Almeida, M.F., Megid, J., 2008. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. *BMC Res. Notes.* 4;1:17.

Black, E.M., McElhinney, L.M., Lowings, J.P., Smith, J., Johnstone, P., Heaton, P.R., 2000. Molecular methods to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat lyssaviruses. *J Virol Methods.* 87(1-2):123-31.

David, D., Yakobson, B., Rotenberg, D., Dveres, N., Davidson, I, Stram, Y., 2002. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet. Microbiol.* 20;87(2):111-8.

Delmas, O., Holmes, E.C., Talbi, C., Larrous, F., Dacheux, L., Bouchier, C., Bourhy, H., 2008. Genomic Diversity and Evolution of the Lyssaviruses. *Plos ONE*; 3(4): e2057. doi:10.1371/journal.pone.0002057.

Echevarría, J.E., Avellón, A., Juste, J., Vera, M., Ibáñez, C., 2001. Screening of active lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. *J. Clin. Microbiol.* 39(10):3678-83.

Faber, M., Pulmanusahakul, R., Nagao, K., Prosniak, M., Rice, A.B., Koprowski, H., Schnell, M.J., Dietzschold, B., 2004. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 101, 16.328-16.332.

Favoretto, S.R., Martorelli, L.F., Elkhoury, M.R., Zargo, A.M., Durigon, E.L., 2005. Rabies virus detection and phylogenetic studies in samples from an exhumed human. *Clin. Infect. Dis.* 1;41(3):413-4.

Heaton, P.R., McElhinney, L.M., Lowings, J.P., 1999. Detection and identification of rabies and rabies-related using rapid-cycle PCR. *J. Virol. Methods.* 81(1-2):63-9.

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>. Accessed in 17/12/2009.

Inoue, K., Shoji, Y., Kurane, I., Iijima, T., Sakai, T., Morimoto, K., 2003. Na Improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J. Virol. Methods.* 107:229-236.

Ito, M., Arai, Y.T., Itou, T., Sakai, T., Ito, F.H., Takasaki, T., Kurane, I., 2001a. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoir, dogs and vampire bats. *Virology.* 284:214-22

Ito, N., Kakemizu, M., Ito, K.A., Yamamoto, A., Yoshida, Y., Sugiyama, M., Minamoto, N., 2001b. A comparison of complete genome sequences of the attenuated RC-HL strain of rabies virus used for production of animal vaccine in Japan, and the parenteral Nishigahara strain. *Microbiol. Immunol.* 45(1), 51-58.

Kamolvarin, N., Tirawatnpong, T., Rattanasiwamoke, R., Tirawatnpong, S., Panpanich, T., Hemachudha, T., 1993. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Infect. Dis.* 167(1):207-10.

Lopes, M.C., Venditti, L.L., Queiroz, L.H., 2010. Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *J. Virol. Methods.* 164(1-2):19-23. *Epub* 2009 Nov 18.

Marston, D.A., McElhinney, L.M., Johnson, N., Müller, T., Conzelmann, K.K., Tordo, N., Fooks, A.R., 2007. Comparative analysis of the full genome sequence of

European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 4):1302-14.

Mochizuki, N., Kobayashi, Y., Sato, G., Itou, T., Gomes, A.A.B., Ito, F.H., Sakai, T., 2009. Complete genome analysis of a rabies virus isolate from Brazilian wild fox. *Arch. Virol.* 154(9):1475-88. *Epub* Aug 23, 2009.

Nadin-Davis, S.A., 1998. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. *J. Virol. Methods.* 75(1):1-8.

Rojas-Anaya, E., Loza-Rubio, E., Banda-Ruiz, V.M., Hernández-Baumgarten, E., 2006. Use of reverse transcription polymerase chain reaction to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:98-101.

Rousseau, C.M., Birditt, B.A., McKay, A.R., Stoddard, J.N., Lee, T.C., MCLAughlin, S., Moore, S.W., Shindo, N., Learn, G.H., Korber, B.T., Brander, C., Goulder, P.J., Kiepiela, P., Walker, B.D., Mullins, J.I., 2006. Large-scale amplification, cloning and sequencing of near full-length HIV-1 subtype C genomes. *J. Virol. Methods.* 136(1-2):118-25. *Epub* May 15, 2006.

Sacramento, D., Bourhy, H., Tordo, N., 1991. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol. Cel. Probes.* 6:229-40.

Smith JS. Rabies virus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover R, editors. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington: American Society for Microbiology Press; 1995. p. 997-1003.

Smith, J., McElhinney, L.M., Heaton, P.R., Black, E.M., Lowings, J.P., 2000. Assessment of template quality by the incorporation of an internal control into a RT-PCR for the detection of rabies and rabies-related viruses. *J. Virol. Methods.*

84(2):107-15.

Szanto, A.G., Nadin-Davis, S.A., White, B.N., 2008. Complete genome sequence of a raccoon rabies virus isolate. *Virus Res.* 136(1-2):130-9. *Epub* 2008 Jun 11, [doi:10.1016/j.virusres.2008.04.029](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.029).

Tordo, N., Poch, C., Ermine, A., Keith, G., Rougeon, F., 1986. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83(11):3914-8.

Tordo, N., Poch, C., Ermine, A., Keith, G., 1986. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Res.*, v. 14, p.2671-2683.

Tordo, N., 1996. Characteristics and molecular biology of rabies vírus. *In* MESLIN, FX; KAPLAN, MM; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, p.28-51.

Whitby, J.E., Heaton, P.R., Whitby, H.E., O'Sullivan, E., Johnstone, P., 1997. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods.* 69(1-2):63-72.

World Health Organization, 2005. WHO Expert Consultation on Rabies. WHO Technical Report Series 931. Geneva: The Organization; *In* http://www.who.int/rabies/trs931_%2006_05.pdf. Accessed in 18/08/2006.

Wunner, W.H., Larson, J.K., Dietzschold, B., Smith, C.L., 1988. The molecular biology of rabies viruses. *Rev. Infect. Dis.* 10 Suppl 4:S771-84. Review.

Wunner, W.H., 2002. Rabies virus. *In* JACKSON, AC; WUNNER, WH. **Rabies**. 2Ed. San Diego: Academic Press, p.23-68.

Fig. 1. Ethidium bromide stained 1.5% agarose gels of amplicons generated from different host samples: brdrusp01/09, brsgusp32/07, brmnusp91/05, CVS strain (brusp47/05), brbvusp01/06 and negative control, respectively. Lanes 1 and 20: DNA size marker 1Kb (Invitrogen). Lanes 7, 13, 19, 26 and 32: negatives controls. Lanes 2 to 6: partial PCR nucleoprotein products (765 pb) amplified with primers SeqN and 304; lanes 8 to 12: PCR phosphoprotein products (1,147 pb) amplified with primers NPM1F and NPM1R; lanes 14 to 18: PCR matrix products (1,224 pb) amplified with primers NMP2F and NPM 2R; lanes 21 to 25: PCR glycoprotein products (2,164 pb) amplified with primers GlycoA and GlycoD; lanes 27 to 31: PCR products of 1,699 pb from partial L protein that were amplified with primers sets Pol3F and Final.

Fig. 2. Agarose gel 1% stained with ethidium bromide of two amplicons from rabies virus complete genome using long cDNA. Lane 1: DNA size marker 1Kb (Invitrogen); lane 2: negative control; lanes 3 and 4: bruspdr01/09 and positive control PCR products of 11,622 bp amplified with primers sets Inicio and Pol 4R.

Table 1 – Oligos for the amplification and sequencing of rabies virus genome

Primer	Gene Position	Polarity	Sequence	Use	Annealing temperature
Início_Posição1_F	1-22 Leader	+	ACgCTTAACAACAARATCARAg	PCR and Sequencing	55 °C
SEQ_NuleoPr_F.750	749-766 Nucleoprotein	+	ggCACAgTWgTCACTgCT	PCR and Sequencing	55 °C
NPM_1_F.1342	1342-1361 Nucleoprotein	+	TgTCTCAgTCAgYTCCAATC	PCR and Sequencing	55 °C
NPM_1_R.2479	2480-2501 Phosphoprotein	-	gTTCATYTTATCAgTggTgTTg	PCR and Sequencing	55 °C
NPM_2_F.2207	2207-2226 Phosphoprotein	+	ATgAACCTTgATgAYATAgT	PCR and Sequencing	50 °C
NPM_2_R.3428	3428-3447 Glycoprotein	-	ggRCAGCTgAgRTgATgTAT	PCR and Sequencing	50 °C
Glyco_F_pcr – A	3284-3303 Intergenic M-G	+	CTATCAACATCCCTCAAARg	PCR and Sequencing	55 °C
Glyco_F_Sato_pcr – C	3219-3237 Intergenic M-G	+	CgCTgCATTTTTRTCARAgT	PCR and Sequencing	55 °C
Glyco_R_pcr – D	5426-5443 Pseudogene ψ	-	CgggTCATCATARACCTC	PCR and Sequencing	55 °C
Glyco_seqF_1	3987-4007 Glycoprotein	+	gACTTgSggMTTgTRgATgA	PCR and Sequencing	55 °C
Glyco_seqR_1	4120-4138 Glycoprotein	-	gATCMggRgggCACCATT	PCR and Sequencing	55 °C
Glyco_seqF_2	4120-4138 Glycoprotein	+	AAATggTgCCCYCKgATC	PCR and Sequencing	55 °C
Glyco_seqR_2	4520-4538 Glycoprotein	-	TCCAACARYTCCATATgTT	PCR and Sequencing	55 °C
Glyco_seqF_3	4370-4390 Glycoprotein	+	ggACTTggAACgARRTCATCC	PCR and Sequencing	55 °C
Glyco_seqR_3	4637-4656 Glycoprotein	-	gAgAYCTgTTTgTGMACATC	PCR and Sequencing	55 °C
GliPol_1_R.6270	6270-6287 Glycoprotein	-	AgTTTCCRCACATRgACA	PCR and Sequencing	55 °C
Pol_3_F.10226	10225-10242 L Protein	+	gATCARgARgTKCgCCAT	PCR and Sequencing	56 °C
Pol_4_R.11616	11616-11636 L Protein	-	TCCAgTgAgATgAVAgACTCA	PCR and Sequencing	56 °C
PosicaoFINAL_R.11904	11904-11924 Trailer	-	ACgCTTAACAAATAACAACA	RT-PCR and Sequencing	56 °C

ANEXO C – Premiação - Menção Honrosa

Menção Honrosa recebida durante o XXI Encontro Nacional de Virologia, 2010.