

ANÁLISE MOLECULAR DE VÍRUS DA RAIVA CIRCULANTE NO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO, ENTRE 1999 E 2004.

JOELER VARGAS DANTAS JUNIOR

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dr. José Paulo Gagliardi Leite
Dra Phyllis Catharina Romijn

Rio de Janeiro

2006

ANÁLISE MOLECULAR DE VÍRUS DA RAIVA CIRCULANTE NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO, ENTRE 1999 E 2004

JOELER VARGAS DANTAS JUNIOR

Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado:

Prof.^a _____

Dra Márcia Cristina Ribeiro Andrade (Doutor em Ciências)

Prof. _____

Dr Marcos Bryan Heinemann (Doutor em Ciências)

Prof. _____

Dr. José Paulo Gagliardi Leite (Philosophy Doctor)

Rio de Janeiro

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Dantas Junior, Joeler Vargas

Análise Molecular de Vírus da Raiva Circulante no Estado do Rio de Janeiro, Entre 1999 e 2004./ Joeler Vargas Dantas Junior. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2006.

xii, 70 p., il., tab.

Tese em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2006. Orientadores: José Paulo Gagliardi Leite e Phyllis Catharina Romijn.

1. Vírus da Raiva 2. RT-PCR. 3. Sequenciamento 4. Análise Molecular.

I. Título.

DEDICATÓRIA

A meus **pais Joeler e Rosemary**, pelo amor em todos momentos, apoio incondicional, amizade, conselhos sempre importantes e me ensinar o respeito e a honestidade.

Ser carioca é não gostar de levantar cedo, mesmo tendo obrigatoriamente de fazê-lo; é amar a noite acima de todas as coisas, porque a noite induz ao bate-papo ágil e descontínuo; é trabalhar com um ar de ócio, com um olho no ofício e outro no telefone, de onde sempre pode surgir um programa; é ter como único programa o não tê-lo; é estar mais feliz de caixa baixa do que alta; é dar mais importância ao amor que ao dinheiro.

Vinícius de Moraes

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, por sua amizade e ter me aceito como seu orientando.

A Dra Phyllis Catharina Romijn, pela amizade e orientação.

Ao Professor Dr. Cláudio de Moraes Andrade, pela sua amizade, orientação e iniciação ao mundo da virologia.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto de Araújo, pela confiança e apoio nos primeiros passos na estrada da pesquisa.

Ao Professor Dr. Marcos Bryan Heinemann e a Professor Dra Adriana Cortez, pela ajuda sem a qual a realização deste trabalho seria mais difícil.

Aos amigos do LVC Alexandre Madi Fialho, Alexandre de Pina Costa, Ana Maria Pinto, Carmen Baur, Débora Tavares, Edson Pereira Filho, Fabiana Fioretti Martins Ferreira, Filipe Aníbal Costa, Flávia Guimarães, Francisca Alves Pereira dos Santos, Gilmar de Mattos Alcântara, Irene Trigueiro Araújo, Marcelle Figueira Marques da Silva, Maria da Penha Trindade Pinheiro Xavier, Marilda M^a Santos Almeida, Marize Pereira Miagostovich, Matias Victoria Monteiro, Mônica Simões Rocha Ferreira, Niele Costa, Regianne Guedes Delfino, Rosane Maria Santos Assis, e Tulio Machado Fumian pela amizade, apoio neste empreendimento, bons momentos de convivência no laboratório e fora dele, ajuda na bancada com os reagentes, equipamentos, suporte informático e no seqüenciamento.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ.

A Dra. Emilia Suchmacher, pelo apoio e incentivo.

RESUMO

Neste estudo foram utilizadas 70 amostras de tecido encefálico congelado de animais, com o diagnóstico positivo para vírus da raiva pela imunofluorescência direta (IFD) e pelo teste biológico (TB), enviados ao Banco de Germoplasma do Laboratório de Biologia Animal (LBA) da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO – RIO). Estas amostras foram provenientes de diversos municípios do estado do Rio de Janeiro. Das 70 amostras analisadas 50 foram utilizadas para testar um protocolo de RT-PCR e 33 utilizadas na análise genética do vírus da raiva circulantes no estado do Rio de Janeiro.

O protocolo testado de amplificação genômica, precedida de transcrição reversa (RT-PCR) para o gene da nucleoproteína de vírus da raiva e vírus relacionados ao vírus da raiva, teve como objetivo a utilização desta metodologia em laboratórios onde são realizadas investigações para a detecção de vírus da raiva. Foram utilizadas 50 amostras de tecido encefálico de animais (44 bovinos, 5 eqüinos e 1 quiróptero). Nas 50 amostras analisadas pela RT-PCR se observou os amplicons de 606 pb, correspondendo a região da nucleoproteína (N) investigada e demonstraram a especificidade do protocolo. Houve concordância nas três provas de diagnósticas utilizadas. Uma amostra negativa na prova de imunofluorescência direta, apresentou positividade tanto na prova biológica e quanto na RT-PCR.

Trinta e três amostras isoladas de 27 bovinos, 05 eqüinos e 01 quiróptero, foram analisadas com base no seqüenciamento direto de amplicons de 514 pb da região codificadora da nucleoproteína (N). As seqüências foram verificadas quanto ao seu parentesco genético e evolucionário. Os dados indicam que não existem diferenças genéticas significativas entre as amostras isoladas de diferentes hospedeiros e regiões geográficas do estado do Rio de Janeiro, durante os últimos seis anos. Os resultados indicam, provavelmente, que a variabilidade observada ocorre em virtude de modificações sinônimas. Apesar da estabilidade genética do gene da nucleoproteína (N) é importante um contínuo esforço de monitoração da diversidade dos genes das amostras de campo de vírus da raiva, pois modificações genéticas podem acarretar eventuais falhas vacinais.

ABSTRACT

In this study were used 70 samples of animal frozen encephalic tissue, with positive diagnosis for Rabies Virus by Direct Immunofluorescence (DIF) and by biological test, sent to Germoplasm Bank of Animal Biology Laboratory (ABL) belonged to the Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO – RIO). These samples were provenient of many countys of Rio de Janeiro State. From 70 analyzed samples, 50 were used to test an RT-PCR protocol and 33 were used in the genetic analysis of circulating Rabies Virus in Rio de Janeiro State.

The genomic amplification preceded of Reverse Transcription (RT-PCR) protocol tested for the Rabies Virus and Rabies related viruses nucleoprotein gene had as purpose the use of this methodology in laboratories where are made investigations for the detection of Rabies Virus. A total of 50 samples of animal encephalic tissue were used (44 cattle, 05 horses and 01 bat). In the 50 samples analysed by RT-PCR was observed amplicons of 606 bp, corresponding to the investigated nucleoprotein region and showing the protocol specificity. There was an agreement in the three diagnostic probes used. One sample, negative for the direct immunofluorescence, presented positivity for both biological probe and RT-PCR.

A total of 33 samples isolated of 27 cattle, 05 horses and 01 bat were analyzed based on the direct sequencing of the 514 bp amplicons, provenient of the nucleoprotein (N) coding region. The sequences had their genetic and evolutionary relationship studied.

Data indicate that there are no significant genetic differences among the samples isolated from different hosts and geographic regions of Rio de Janeiro State, during the last six years.

The results indicate, probably, that the observed variability occur due to synonymous modifications. Although the genetic stability of the nucleoprotein (N) gene is important, a continuous effort in monitoring of the countryside Rabies Virus samples genes, because genetic modifications may cause eventual vaccine-failure.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL – microlitro

μM – micromolar

CaCl_2 – cloreto de cálcio

cDNA – ácido dextribonucleico complementar

CVS - Challenger Vírus Standard

dXTPs – desoxiribonucleotídeos

DTT - Dithiothreitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IFD – imunofluorescência direta

MgCl_2 – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

$^{\circ}\text{C}$ – graus centígrados

PA – pró-análise

PB – pares de bases

pH – concentração de íons hidrogênio livre

RJ – Rio de Janeiro

RNA – ácido ribonucléico

RT-PCR - reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa

TB – teste biológico

Tris – hidroximetil-tris-aminometano

U – unidades

UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS	
FIGURA 1. Mapa do estado do Rio de Janeiro indicando os municípios de origem das amostras hachurados.	18
FIGURA 2. Eletroforese de amplicons em gel de agarose da região da nucleoproteína de vírus da raiva.	24
FIGURA 3. Eletroforese de amplicons em gel de agarose da região da nucleoproteína de vírus da raiva.	25
FIGURA 4. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da nucleoproteína N do vírus da raiva.	26
FIGURA 5. Tradução e alinhamento das seqüências de aminoácidos da nucleoproteína N do vírus.	35
FIGURA 6. Dendograma da relação genealógica entre as amostras de vírus da raiva, utilizando seqüências de nucleotídeos para o gene da nucleoproteína. A árvore foi reconstruída pelo algoritmo de Neighbor-joining usando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros. Os números representam os valores de “ <i>bootstrap</i> ” com 1000 réplicas.	39

LISTA DE QUADROS	
QUADRO 1. Amostras de vírus da raiva de acordo com as espécies de origem, ano de coleta e municípios de procedência.	16
QUADRO 2. Seqüências nucleotídicas obtidas junto ao GenBank utilizadas para análise genéalogica.	19
QUADRO 3. Seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação da região codificadora da nucleoproteína do vírus rábico.	20

SUMÁRIO	
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 HISTÓRICO	1
I.2 CLASSIFICAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO VIRION	2
I.3 PATOGENIA	5
I.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	7
I.5 EPIDEMIOLOGIA	8
II. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	13
III. OBJETIVOS	15
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	16
IV.1 MATERIAIS	16
IV.2 MÉTODOS	19
V. RESULTADOS	24
V.1 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA	24
V.2 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS	25
V.3. RECONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA	38
V.4. ANÁLISE DOS GRUPOS	40
VI. DISCUSSÃO	41
VI.1. IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO DIAGNÓSTICO	41
VI.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	43
VII. CONCLUSÕES	46
VIII. PERSPECTIVAS	47
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	
ANEXO 1 Artigo - Reverse transcription-polymerase chain reaction	57
ANEXO 2 Artigo - Molecular Analysis of Rabies Virus	61

I. INTRODUÇÃO

I.1 Histórico

As histórias da Medicina Humana e Veterinária, no que diz respeito às doenças infecto-contagiosas, estão intimamente correlacionadas pois, Famílias e Gêneros de bactérias, de vírus e de alguns parasitas, podem ter como hospedeiro definitivo tanto o Homem quanto animais. Apesar de muitas bactérias, vírus e parasitas serem espécie-específicas, a metodologia utilizada nos testes de bioquímica e de sorológica são similares, fazendo com que a Microbiologia Médica e Veterinária avancem conjuntamente (Baer apud Kimura, 2000).

No Velho e no Novo Mundo existe uma prece suplicando a um santo a proteção contra os cachorros de rua: “São Roque, São Roque, não deixe que este cachorro me morda”. Um código Mesopotâmia pré-mosaico, que data de 23 séculos A.C., menciona uma passagem no anoitecer dos tempos sobre os perigos das mordidas de cachorros: “se o cachorro é mal e as autoridades avisam ao dono e este não prende o animal e o cão morde um homem causando sua morte, o proprietário do animal deverá pagar 40 “sekels” de prata. Se o cão morder um escravo e este morrer, o proprietário do cão deverá pagar 15 “sekels” de prata” (Mattos *et al.* apud Fields, 2001).

A Raiva tem uma grande e interessante História. Desde a Antigüidade Plutarco declara que, segundo Atenodories, a Raiva foi primeiramente observada em humanos na época de Asclepiade, o descendente da divindade da medicina Esculapio. Action, um famoso caçador da mitologia, concluiu ao encontrar Diana e seus servos mortos na banheira, que eles teriam sido mortos por cães raivosos. Na Iliada, Homero se referia a Raiva, quando mencionava Sirius, a estrela cão de Orion, exercendo uma influência maligna sobre a saúde humana. A estrela cão Sirius foi associada aos cães raivosos em todo o Mediterrâneo oriental, Egito e Roma. Os gregos tiveram uma divindade especial em sua mitologia para neutralizar os efeitos da Raiva, chamado Aristeu, filho de Apolo (Steel & Fernandez apud Baer, 1991).

Demócrito fez o primeiro registro de Raiva canina em 500 A.C.. Aristóteles, no século IV A.C., escreveu na História Natural dos Animais, livro 8, capítulo 22: “Os cães sofrem de loucura. Isso faz com que eles tornem-se muito irritados e todos os animais que eles morderem tornam-se doentes” (Steel & Fernandez apud Baer, 1991).

Os Gregos chamavam Raiva de *lyssa* ou *lytta*, o que significava “loucura”. A doença no homem foi descrita como hidrofobia, na qual a pessoa doente era atormentada ao mesmo tempo com sede e medo de água. A palavra latina Raiva vem do sânscrito antigo *rabhas* que significa estar violento (Steel & Fernandez apud Baer, 1991).

No Brasil, a primeira notificação de Raiva em herbívoros ocorreu no sul do país, em Santa Catarina, no período de 1906 a 1908. Esta epizootia, chamada de Epizootia de Biguaçu, foi estudada por Parreiras e Figueiredo em 1911, médicos do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (Marcovitz *et al.* apud Corra, 2005).

Wiktor & Clark (1975), relatam que, no início do século, Noguchi e Levaditi em 1913, registraram que o vírus da raiva poderia ser mantido em fragmentos de cérebro, medula oblonga e gânglio espinhais de animais infectados experimentalmente e que, provavelmente, replicava-se *in vitro*.

Segundo Kissling (1958), Vieuchange e colaboradores em 1956, foram os primeiros a propagar vírus da raiva em cultura de tecido de origem não neural. Kissling (1958) relatou a passagem seriada de vírus fixo e de rua em células de tecido primário de rim de hamster.

Webster & Dawson (1935) introduziram a inoculação intracerebral em camundongos albino suíço para o isolamento de vírus da raiva, e esta prova biológica é usada, rotineiramente, até os dias atuais, sendo recomendada pela Organização Mundial de Saúde como prova confirmatória.

I.2. Classificação e Composição do Virion

I.2.1 Classificação

Vírus da raiva pertencem a Ordem *Mononegavirales*, Família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Os membros da família *Rhabdoviridae* são agrupados com base em sua forma cônica ou de projétil, como são visualizados na microscopia eletrônica (M.E.). Seus hospedeiros são os vertebrados (primordialmente mamíferos e peixes), invertebrados (primordialmente artrópodes) e plantas. Seis gêneros são reconhecidos: *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, que possuem vertebrados como hospedeiro; *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*, identificados em vegetais (Smith, 1996; Mattos *et al.* apud Fields, 2001).

I.2.1.1 Gênero *Lyssavirus*

No gênero *Lyssavirus* são conhecidos sete genótipos: genótipo I (*virus da raiva*); genótipo II (*virus do morcego Lagos*); genótipo III (*virus Mokola*); genótipo IV (*virus Duvenhage*); genótipos V e VI (*Lyssavirus do morcego Europeu [EBL 1 e 2]*); genótipo VII (*Lyssavirus do morcego Australiano*) (Black *et al.*, 2000). Recentemente estes sete genótipos foram divididos em dois filogrupos. O filogrupo 1 é formado pelos genótipos I, IV, V, VI e VII e o filogrupo 2 pelos genótipos II e III (Badrane *et al.* 2001).

Os sorotipos e os genótipos dos vírus pertencentes ao gênero *Lyssavirus*, compartilham um alto grau de similaridade entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos e causam doença clinicamente indistinguível da encefalite por *virus da raiva* clássico. A identificação específica só é possível com o uso de anticorpos monoclonais, teste de neutralização com soro vírus-específico e, mais recentemente, através da tipificação genética (Smith, 1996; Black *et al.*, 2000).

O genótipo I (*virus da raiva* clássico) tem distribuição mundial. O *Virus do morcego Lagos* (GT II), *virus Mokola* (GT III) e *virus Duvenhage* (GT IV), parecem ter a sua distribuição limitada à África enquanto que os *Lyssavirus do morcego Europeu-1* (EBL1 – GT V) e *Lyssavirus do morcego Europeu-2* (EBL2 – GT VI) têm sido encontrados apenas na Europa. Todos os genótipos, com exceção dos *Lagos bat virus*, podem causar encefalopatia em seres humanos. As enfermidades causadas pelos vírus relacionados com *virus da raiva*, são clinicamente indistinguíveis da Raiva clássica. (Black *et al.*, 2000).

Análises recentes de nucleotídeos e aminoácidos da região da nucleoproteína (N) de EBL resultaram em sua divisão em genótipos EBL1 e EBL2. Uma subdivisão adicional em EBL1 mostrou a existência de duas linhagens filogenéticas distintas, *a* e *b*. Os EBL1*a* e os EBL1*b* são freqüentemente isolados e possuem ampla distribuição. Os vírus EBL1 foram isolados inicialmente em morcegos do gênero *Eptesicus sp.* enquanto que os EBL2 tem sido identificados apenas em *Myotis sp.* Não existem evidências claras de animais terrestres com infecção natural por EBL (Black *et al.*, 2000). A análise com anticorpos monoclonais, específica para a proteína do nucleocapsídeo (N), mostrou um grande parentesco entre os *Lyssavirus* EBL1 e EBL2 e o vírus da raiva.

No que se refere ao genótipo VII à comparação da proteína N, fosforoproteína P, proteína matriz M e glicoproteína G, mostraram que os *Lyssavirus* do morcego australiano (ABLV) estão mais relacionados com genótipo I, vírus clássico da Raiva, do que com os outros membros do gênero *Lyssavirus*. O percentual de similaridade entre as proteínas do ABLV, quando comparadas com PV (amostra de vacina Pasteur), foram: 92% proteína N, 75% proteína P, 87% proteína M e 75% proteína G. Análise filogenética das seqüências do gene que codifica a proteína N mostrou nitidamente que os ABLV representam um novo genótipo, o genótipo VII, no gênero *Lyssavirus* (Gould *et al.*, 1998).

Após a descoberta de *Lagos bat vírus* e de *Mokola vírus*, a África foi considerada o lugar de origem do gênero *Lyssavirus* e os quirópteros a primeira ordem de mamíferos afetada na rota de evolução a partir de plantas e artrópodes dos *Rhabdovirus* (Kuzmin *et al.*, 2005).

I.2.2 Composição do Virion

I.2.2.1. Genoma viral e morfologia

O genoma viral é constituído por um RNA de fita simples, de polaridade negativa, com 12.000 nucleotídeos, codificando cinco proteínas: uma RNA-polimerase RNA dependente (proteína L de 190 kDa), uma glicoproteína de superfície simples (proteína G 65 a 80 kDa), uma nucleoproteína (N de 58 a 62 kDa), uma fosforoproteína (NS ou M1 de 35 a 40 kDa) e uma proteína matriz (M ou M2 de 22 a 25 kDa) (Smith, 1996; Tordo, 1996).

O virion pode ser dividido em duas unidades estruturais, uma central formada por um cilindro denso que é o ribonucleocapsídeo helicoidal e outra que se constitui num fino envelope (8 nm de largura) que envolve este cilindro. O ribonucleocapsídeo helicoidal é extremamente compacto o que indica que o escape da fita pela base plana durante a degradação parcial do virion é uma extraordinária casualidade (Tordo apud Meslin, 1996).

A partícula infecciosa é composta por uma camada externa com projeções na superfície entre 6 e 7 nm de comprimento com a extremidade em forma de espícula. As projeções estão localizadas em uma unidade de membrana bilaminada, a qual cobre toda a partícula, exceto em sua base plana, onde o virion sofre, freqüentemente, invaginação formando um canal axial (Schneider & Diringier, 1976).

Como todos os vírus RNA fita simples negativas não segmentadas, o genoma de *virus da raiva* é transcrito para uma forma positiva monocistrônica e então o genoma completo é replicado e serve de molde para síntese de novos genomas RNA negativos (Tordo *et al.* 1986).

A morfogênese dos vírus da raiva é basicamente similar tanto *in vivo* quanto em *in vitro* e é caracterizada por dois eventos: formação da matriz que contém uma massa não organizada de fitas de proteínas do ribonucleocapsídeo e o envelope da partícula viral que ocorre durante o brotamento na membrana plasmática (Schneider & Diring, 1976).

A partícula viral tem estrutura em forma de projétil, com 75 nm de diâmetro por 100-300 nm de comprimento. Variações do comprimento podem ser encontradas entre as amostras de vírus: Challenge Virus Standard (CVS) normalmente é maior do que PV ou pode possuir partículas de interferência defectivas (DI) que podem ocorrer quando há uma grande intensidade de replicação viral (Tordo *apud* Meslin, 1996).

A montagem do virion é geralmente associada com a presença de matriz característica, isto é, o corpúsculo de inclusão. O desenvolvimento da matriz no interior do citoplasma de células infectadas forma uma estrutura homogênea fora dos limites dos componentes celulares, substituindo-os. A fita de ribonucleoproteínas parece um fino filamento que vai gradualmente engrossando e dando indicação de periodicidade. A formação do virion é vista com a maior aproximação destes filamentos a agregados ribossômicos. Em contraste com as infecções causadas por vírus de rua, *in vivo* ou *in vitro*, as infecções por vírus fixo raramente exibem partículas virais no interior da matriz, apesar dos altos títulos encontrados no tecido. Essa característica morfológica tem sido utilizada para diferenciar amostras selvagens de amostras fixas e pode indicar um processo diferente de maturação (Schneider & Diring, 1976).

I.3. Patogenia

De acordo com Dietzschold *et al.* (1985), a replicação de vírus da raiva *in vivo* é quase que inteiramente restrita ao tecido nervoso, sendo o neurotropismo a principal característica da infecção por este vírus. Após inoculação intramuscular, partículas de vírus da raiva provavelmente se replicam nas células musculares estriadas e posteriormente, nas

terminações nervosas sem mielina dos nervos motores e disseminam-se pelos nervos periféricos subindo pela medula espinhal até o cérebro (Hemachudha *et al.*, 2002).

Os mecanismos básicos envolvidos na patogenia e os fatores que determinam a manifestação da doença após a infecção não são bem conhecidos mas, provavelmente, concorrem múltiplos fatores, incluindo a competência imunológica do hospedeiro (Dietzschold *et al.* 1985).

Ao contrario de muitas outras infecções virais, nas quais os anticorpos neutralizantes limitam a dispersão dos vírus, *in vitro*, a infecção pelos vírus da raiva ocorre de célula a célula apesar da presença de anticorpos neutralizantes, demonstrando que este mecanismo de disseminação ocorre na infecção natural (Dietzschold *et al.* 1985).

Estudos com uma variante apatogênica em células neuroblastoma, indicaram que a glicoproteína (G) é a principal determinante da patogenia dos vírus. A variante antigênica (RV194-2), selecionada por sua resistência à neutralização pelo anticorpo monoclonal 194-2, exibiu patogenicidade alterada em rato adulto, mudança que corresponde à substituição de um aminoácido na molécula da glicoproteína na posição 333. Esta alteração também foi observada na amostra apatogênica dos vírus fixos Flury Hep e Kelev, que também são resistentes à neutralização por este anticorpo monoclonal. Assim, a substituição do aminoácido na posição 333 parece ser o marcador molecular do fenótipo apatogênico. A mais importante diferença biológica *in vivo* entre a ação de vírus patogênicos e apatogênicos é a extensão da sua dispersão no sistema nervoso central (SNC). Os vírus apatogênicos são de natureza significativamente menos neuro-invasiva (Dietzschold *et al.* 1985).

Os vírus rapidamente se disseminam entre as terminações do sistema nervoso periférico sendo, deste modo, expostos apenas transitoriamente ao sistema imune. Uma vez no neurônio, as partículas virais são transportadas no axônio de forma centrípeta. A primeira parte do cérebro a ser infectada é a medula, seguindo-se o hipotálamo e o córtex. Durante o último estágio da infecção todo o SNC é infectado, assim como certos tecidos externos como as glândulas salivares, que permitem a transmissão da infecção pelo animal infectado. (Meslin *et al.*, 1996).

I.4. Diagnóstico Laboratorial

I.4.1. Transporte do espécime

É fundamental respeitar certas regras quando se envia uma amostra para diagnóstico e, em particular para a investigação do vírus da raiva. O acondicionamento deve garantir a boa conservação do material, requisito essencial para um bom diagnóstico laboratorial além de proteger as pessoas do serviço de transporte que, normalmente, não estão imunizados contra o vírus da raiva. Deve-se insistir, também, na importância e clareza da ficha de informação que acompanha cada amostra. Em caso de espécimes em decomposição, deve ser enviados o bulbo, a medula espinhal e certos nervos cranianos (principalmente o nervo óptico) frequentemente estão em melhor estado de conservação (Bourhy & Sureau, 1991).

I.4.2. Imunofluorescência

O teste de imunofluorescência direta (IFD) com impressão do cérebro é a base para o diagnóstico da Raiva. Entretanto, a sensibilidade do teste fica comprometida quando o material já se encontra em decomposição. Este é um dos problemas em países tropicais onde o material em geral, não é conservado adequadamente no campo e demora a chegar ao laboratório (Kamolvarin *et al.*, 1993).

Quando do envio de materiais provenientes de bovinos ao laboratório de diagnóstico, deve-se enviar também porções da medula, além do corno de Amon, cerebelo e córtex. A medula revelou segundo Kimura, (2000), um índice maior de positividade em relação aos demais tecidos na IFD, o que justifica a necessidade de sua inclusão entre os materiais a serem coletados.

I.4.3- Prova biológica

Considerando que nem sempre são encontrados corpúsculos de Negri nos encéfalos de animais acometidos pela Raiva, nos casos em que IFD for negativa é importante investigar a presença de vírus infeccioso mediante inoculação em animais (Tierkel & Atanasiu, 1996). O camundongo albino suíço é o espécime padrão para esta prova (Atanasiu, 1975).

I.4.4- Técnicas moleculares

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) aumentou muito a eficiência de detecção de polimorfismos no DNA ou RNA, traduzida em redução do tempo de execução, dos experimentos, do seu custo e da sua complexidade. Antes da PCR, a detecção de polimorfismos só era possível com a utilização de sondas marcadas radioativamente ou quimicamente (Matioli & Passos-Bueno, 2004).

A técnica da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) é uma metodologia rápida, sensível e específica, podendo ser aplicada como um protocolo alternativo para o diagnóstico de rotina da Raiva (Sacramento *et al.*, 1991). A RT-PCR oferece um alto nível de sensibilidade quando comparado com a prova de IFD, tanto para tecidos normais quanto para tecidos em decomposição. Os amplicons obtidos podem ainda ser utilizados para seqüenciamento e posterior análise genética, facilitando a identificação da origem de vírus no diagnóstico de rotina e a relação epidemiológica entre as diferentes espécies (Black *et al.*, 2000; Romijn *et al.*, 2003).

Bourhy *et al.* (1999) estudando o gene *N* demonstraram a adaptabilidade da metodologia de RT-PCR tanto para diagnóstico quanto para genotipagem e análise genética. Soares *et al.* (2002), desenvolveram uma metodologia de RT-PCR para a região do gene *N*, que mostrou ser sensível e específica para o diagnóstico da Raiva em amostras oriundas de diversas espécies de hospedeiros.

I.5. Epidemiologia

Na epidemiologia da virose identifica-se, um ciclo silvestre que, eventualmente, extrapola para o ambiente doméstico, geralmente rural, e um ciclo urbano. Os ciclos podem se entrelaçar, afetando as várias espécies de mamíferos (Marcovitz *et al.* apud Coura, 2005). Loza-Rubio *et al.* (1999) afirmam que na América Latina existe a sobreposição geográfica de dois principais ciclos epidemiológicos da Raiva: (a) o ciclo terrestre, onde o cão é o principal transmissor da Raiva a humanos; (b) o ciclo aéreo, onde o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é o principal transmissor da Raiva aos bovinos.

Os casos de Raiva humana e canina nas Américas estão aparentemente diminuindo, porém a expansão da doença a partir dos reservatórios selvagens para os animais domésticos, selvagens e humanos vem sendo notificados com maior frequência, sendo,

portanto preocupação das autoridades sanitárias. A Raiva transmitida através da mordida de cães ainda é a maior preocupação em Saúde Pública, tanto nas Américas como em outros continentes (Wunner, 2005). A transmissão da virose por certas espécies de animais selvagens é um risco potencial em vários países das Américas, e os morcegos são a segunda forma mais comum de transmissão da Raiva a humanos, sendo o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) a espécie mais importante na América Latina (Belloto, 2005). Enquanto que a incidência de Raiva transmitida por animais domésticos, principalmente cães, está diminuindo no Brasil e em outros países das Américas, a notificação de casos de Raiva transmitida por morcegos, seguido de outros animais silvestres, está aumentando significativamente (Favoretto *et al.* 2000).

Uma das maiores dificuldades que se apresenta no controle de enfermidades de importância para a Saúde Pública e Sanidade Animal é a manutenção de condições adequadas para um diagnóstico de situação, precoce o suficiente para evitar ocorrência de surtos (através de medidas de prevenção e profiláticas) ou impedir sua difusão (imunização) (Belloto apud Kimura, 2000).

Destaca-se ainda que, dentro do atual quadro sócio-econômico do ambiente rural, a prevenção de zoonoses passa a ter um contexto muito mais amplo e apresenta resultados diretos e indiretos surpreendentes. O pecuarista, principalmente o que desenvolve atividades em nível familiar, passa a perceber não apenas maiores lucros econômicos, mas associando-se a este a melhoria da Sanidade Animal. Assim sendo, promove a saúde de seus familiares e da região e, a longo prazo, eleva seu padrão de vida (Belloto apud Kimura, 2000).

A manutenção da Raiva na natureza possivelmente está diretamente relacionada com os animais silvestres que servem como reservatórios ou transmissores naturais da doença. Um transmissor deve ter alta suscetibilidade aos vírus e deve poder desenvolver uma interação com outros hospedeiros que seja favorável à transmissão da doença antes de sua morte. A identificação da fonte primária de transmissão da infecção pode facilitar as medidas de controle ou tentativas de erradicação (Johnson *et al.*, 2004). Atualmente, a raposa vermelha é o principal hospedeiro da Raiva na Europa, os morcegos são os principais reservatórios dos *Lyssavirus* raiva relacionados (genótipos II, IV, V e VI), além de também estarem envolvidos na transmissão do genótipo I (Meslin *et al.*, 1996); enquanto

que na América do Norte tem importância o *Procyon lotor* (quaximim). Nos países em desenvolvimento o cão é o transmissor mais importante, contudo existem espécies selvagens envolvidas (Meslin *et al.*, 1996).

As partículas de vírus da raiva, normalmente, são introduzidas através da saliva em ferimentos causados por mordidas. Contudo tem ocorrido infecções causadas por aerossóis e lambidas na pele ou mucosa que são extremamente raras (Hemachudha *et al.*, 2002).

No Brasil, a Raiva tem sido notificada em 22 estados, com diferenças importantes no controle da doença, de acordo com as peculiaridades de cada uma destas unidades federadas (Araújo, 2000). De 1995 a 1999, 44,0% dos casos de Raiva ocorreram na região Nordeste, 32,0% na região Norte, 12,0% na região Centro-Oeste e 12,0% na região Sudeste. No período de 1996 a 1999 os números de casos de Raiva humana se mantiveram numa média de 26casos/ano. A região Sul não registra casos de Raiva humana desde 1987 (Araújo, 2000). No ano de 2000 foram notificados 18 casos, com o estado do Maranhão sendo responsável pela notificação 39,0%, seguido por Rondônia (16,0%), Acre (11,0%) e Pernambuco, Pará, Ceará, Bahia, Mato Grosso e Goiás (6,0%) . Nestes relatos o cão foi responsável pela transmissão de 73,0% dos casos, seguido pelo morcego com 10,0% e pelo gato com 5,0% (Araújo, 2000). Nos anos de 2004 e 2005 foram notificados 43 casos, o estado do Pará responsável pela notificação de 24 casos e o estado do Maranhão pela notificação de 19 casos de Raiva humana, sendo o morcego *Desmodus rotundus* o responsável pela transmissão (Anonymous, 2006).

Dados do Ministério da Saúde mostram que no Brasil, nos últimos 10 anos, aproximadamente, 15% dos casos de Raiva notificados em seres humanos foram transmitidos por morcegos. A vigilância epidemiológica mostrou que a Raiva ocorre em dois ambientes distintos: **o urbano**, tendo o cão como principal animal transmissor; **o silvestre** com diferentes espécies animais tidas como reservatórios ou transmissores, variando de acordo com a região considerada (Favaretto *et al.*, 2000).

No caso específico do estado do Rio de Janeiro, há duas décadas estão sendo verificados novos casos de Raiva em herbívoros. Órgãos oficiais de pesquisa e defesa animal do estado do Rio de Janeiro também têm detectado os vírus da raiva em quirópteros, transmitindo a enfermidade para animais domésticos e silvestres (Kimura *et al.*, 1988; Romijn & Kimura, 1996; Kimura *et al.*, 1998; Romijn *et al.*, 2003).

I.5.1. Epidemiologia molecular

Assim como os dados epidemiológicos de campo, o conhecimento da variante antigênica envolvida é de extrema importância nos estudos dos diferentes ciclos da Raiva (Favoretto *et al.*, 2000).

Além da tipificação de vírus por um painel de anticorpos monoclonais, hoje em dia também tem sido utilizadas técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento de nucleotídeos, para a tipificação e estudos genéticos das amostras de vírus da raiva (Johnson *et al.*, 2004).

A comparação entre as seqüências do vírus *Mokola* e amostras de vírus PV permitiram o delineamento de regiões conservadas dentro dos genomas de *Lyssavírus*. Assim sendo, foram desenvolvidos iniciadores (primers) para a amplificação da nucleoproteína (*N*), glicoproteína (*G*) ou o pseudogene (Sacramento *et al.*, 1991; Tordo *et al.*, 1996; Bourhy *et al.*, 1999). Cada uma destas três regiões alvo podem fornecer informações epidemio-moleculares relevantes: i) o gene que codifica a nucleoproteína (*N*) e a glicoproteína podem ser utilizados para estudos de diagnóstico, taxonomia, genotipagem e desenvolvimento de imunobiológicos; ii) o pseudo-gene pode também ser utilizado para genotipagem e epidemiologia molecular.

Em seus estudos taxonômicos e evolucionários, Bourhy *et al.* (1999) utilizaram o gene *N* para realizar comparações de vírus da raiva com vírus raiva-relacionados, identificados no passado de acordo com sua reatividade com anticorpos monoclonais. Devido ao papel importante da proteína *N* em induzir imunidade, em particular contra infecção por *Lyssavirus* heterólogos, o gene *N* pode ser considerado um alvo adequado para a comparação de amostras por períodos de evolução relativamente longos (Dietzschold *et al.*, 1985).

Bourhy *et al.* (1999) verificaram que através do sequenciamento do gene *N* foi possível a identificação de mutações importantes nos sítios antigênicos de amostras isoladas de casos de falhas vacinais ou de terapia em animais ou seres humanos. Além disso, as linhagens distintas pelas análises evolutivas correlacionaram-se com a sua origem geográfica e definiram relações filogenéticas com amostras selvagens. Segundo Schaefer *et al.* (2005), subpopulações de vírus da raiva aparentemente desenvolvem mecanismos de

adaptação para hospedeiro específico, que pode ser detectado por alteração conservadas no gene *N*.

Em 1996, na Austrália, um primeiro caso de Raiva foi identificado em uma fêmea de morcego-raposa voadora (*Pteropus alecto*). Em virtude de apresentar sintomatologia semelhante ao caso anterior, foi feita uma revisão em uma amostra de 1995 dos arquivos de tecidos em parafina, detectando-se então o segundo caso, em uma fêmea da mesma espécie. Estudo comparativo da seqüência de proteínas do nucleocapsídeo dos *Lyssavirus* conhecidos com as proteínas de vírus reportado no trabalho (*Lyssavirus pteropid-PLV*), demonstrou que o PLV tem 75% de homologia com LBV, 75% com do EBL₂ e 79% com o vírus da vacina Pasteur. Em relação aos aminoácidos, observou-se 85% homologia com EBL₁ e LBV, 92% com vírus da raiva, 89% com Duv e 93% com o EBL₂. A análise filogenética da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos mostrou que estes vírus estão intimamente relacionados com o EBL assim como com a amostra de vírus de rua clássico (Fraser *et al.*, 1996).

A base da epidemiologia molecular é a RT-PCR, uma importante ferramenta para classificação das doenças virais, incluindo vírus da raiva e fornecendo um melhor entendimento entre os parentescos epidemiológicos (David *et al.*, 2000.), conforme Schaefer *et al.*(2005), demonstram em seu trabalho, a maioria das amostras originárias de bovinos eram veiculadas por morcegos hematófagos. Esta metodologia poderia ser usada com sucesso pelos laboratórios de rotina no diagnóstico por ser rápida, específica, ter uma alta sensibilidade, evitar o uso de animais de laboratório e identificar variantes conhecidas e desconhecidas (Dantas Junior. *et al.*, 2004; Bordignon *et al.*, 2005).

II. Relevância do estudo

A compreensão da evolução natural e da diversidade de patógenos deve ser considerada um pré-requisito para a definição de uma estratégia de controle global. A classificação de vírus dentro de determinada família até pouco tempo era baseada essencialmente em aspectos morfológicos e sorológicos. O desenvolvimento de técnicas analíticas confiáveis e rápidas em biologia tem levado ao uso, cada vez mais freqüente, de metodologias moleculares como ferramentas de investigação (Anonymous, 1998).

A análise de seqüências de nucleotídeos de vírus tem demonstrado a existência de polimorfismo que anteriormente não haviam sido reconhecidos pelos métodos virológicos clássicos e, portanto, ausentes no sistema de nomenclatura taxonômica corrente. Estas diferenças antigênicas e genéticas permitem caracterizações de espécies e sub-espécies, que estão sendo cada vez mais usadas para o agrupamento ou separação de amostras e definindo linhagens, variantes, tipos, subtipos, agrupamentos, biótipos e genótipos (Anonymous, 1998).

O estabelecimento desta diversidade permite a análise da base molecular de tropismo, patogenia e imunologia de diversos vírus. Também permite a caracterização de amostras e a identificação de reservatórios em diferentes áreas, de forma a monitorar a evolução geográfica do microrganismo na natureza. Este monitoramento, juntamente com estudos imunológicos referentes a reações cruzadas com linhagens vacinais, utilizando-se amostras de surtos passados e presentes, fornece informações para o manejo local e para o estabelecimento de diferentes estratégias de controle das enfermidades causadas por vírus da raiva (Anonymous, 1998).

A Raiva é considerada uma doença re-emergente e atualmente morrem mais pessoas pela infecção pelos vírus da raiva do que por infecção por febre amarela, dengue e encefalite japonesa (Hemachudha *et al.*, 2002). Um mecanismo de controle poderia ser o esquema preventivo em viajantes a países em desenvolvimento onde a Raiva é endêmica (Krauser *et al.*, 2005) Os riscos da Raiva urbana devem ser considerados, pois trabalhos realizados por Batista-Morais *et al.* (2000) e Almeida *et al.* (2001), demonstram a presença da Raiva em animais silvestres levados ao domicílio, sendo considerados de estimação, colocando em risco de infecção animais domésticos e o Homem. Deve-se considerar ainda

a disseminação de vírus da raiva pelos morcegos (Schneider & Diringer, 1976; Passos *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999, Anonymous, 2006).

Considerando-se que os casos de Raiva transmitidos por quirópteros têm aumentado nos últimos anos, a realização de estudos moleculares de amostras de vírus da raiva, isolados de herbívoros oriundos de focos de Raiva, permitirão identificar melhores estratégias de ação para o controle da enfermidade e o desenvolvimento de imunoproliféricos mais eficazes para o controle da Raiva (Romijn *et al.*, 2003).

A Raiva tem causado um grande prejuízo econômico ao afetar os animais destinados à produção, principalmente na América Latina. No Brasil, os rebanhos de bovinos e eqüinos têm sido gravemente afetados por esta zoonose. A resposta imunológica deficiente é uma consequência da negligência dos proprietários dos rebanhos quanto à forma correta de vacinação. De fato, o controle efetivo da Raiva em herbívoros depende de uma vacinação rotineira e do controle populacional de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (De Oliveira *et al.*, 2000).

As perdas econômicas causadas pela zoonose foram estimadas por Feital (1998): - **Perdas diretas** - produção leiteira: US\$ 4.718.347,20, correspondente a 9.436.694 de litros de leite não produzidos; produção de carne US\$ 1.060.013,00, correspondentes a 42.400 arrobas não produzidas; - **Perdas indiretas** - US\$ 8.667.540,30 correspondendo a 150% do total das perdas diretas, com a espoliação sangüínea, perda de peso, depreciação do couro, bezeros não produzidos, etc. Para o poder público a perda estimada foi de cerca de US\$ 2.600.262,09, referente a impostos não recolhidos devido à perda na produção. O total de perda foi estimado em aproximadamente US\$ 17.046.162,59. Por exemplo, no Estado de Santa Catarina, o rebanho bovino tem tido uma perda de 30.000 animais/ano, causando um prejuízo de US\$ 300,000 anuais (Bordignon *et al.*, 2005).

III. OBJETIVOS

III.1. Geral

Contribuir na implementação de técnicas moleculares para o diagnóstico da Raiva utilizadas nos laboratórios de diagnóstico da virose no estado do Rio de Janeiro e caracterização molecular de vírus da raiva circulantes no estado do Rio de Janeiro entre 1999 e 2004.

III.2. Específicos

- Demonstrar que a RT-PCR é um método alternativo rápido e específico para o diagnóstico da presença de vírus da raiva;

- Realizar o seqüenciamento dos amplicons obtidos pela RT-PCR na região da nucleoproteína (N);

- Realizar análise genealógica das amostras de vírus da raiva estudadas.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Materiais.

➤ Amostra-Padrão de vírus da raiva.

A amostra de CVS 31.2 de vírus da raiva, mantido por passagens em cérebro de camundongo e estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)/Fiocruz.

➤ Amostras de campo de vírus da raiva.

Foram utilizadas 70 amostras de tecido encefálico congelado de animais positivos para vírus da raiva pela imunofluorescência direta (IFD) e pelo teste biológico (TB), descritos no Quadro 1 (59 bovinos, 09 eqüídeos, 02 quirópteros), enviados ao Banco de Germoplasma do Laboratório de Biologia Animal (LBA) da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO – RIO). Estas amostras foram provenientes de diversos municípios do estado do Rio de Janeiro (Quadro 1).

As amostras de campo foram codificadas, recebendo um número de registro, seguido da abreviação do nome do município de procedência e, de três letras, indicando a espécie hospedeira da qual o RNA viral foi isolado (Quadro 1).

A Figura 1, retrata o mapa do estado do Rio de Janeiro com seus municípios. Os municípios de procedência das amostras estão hachurados.

➤ QUADRO 1. Amostras de vírus da raiva de acordo com as espécies de origem, municípios de procedência e ano de coleta.

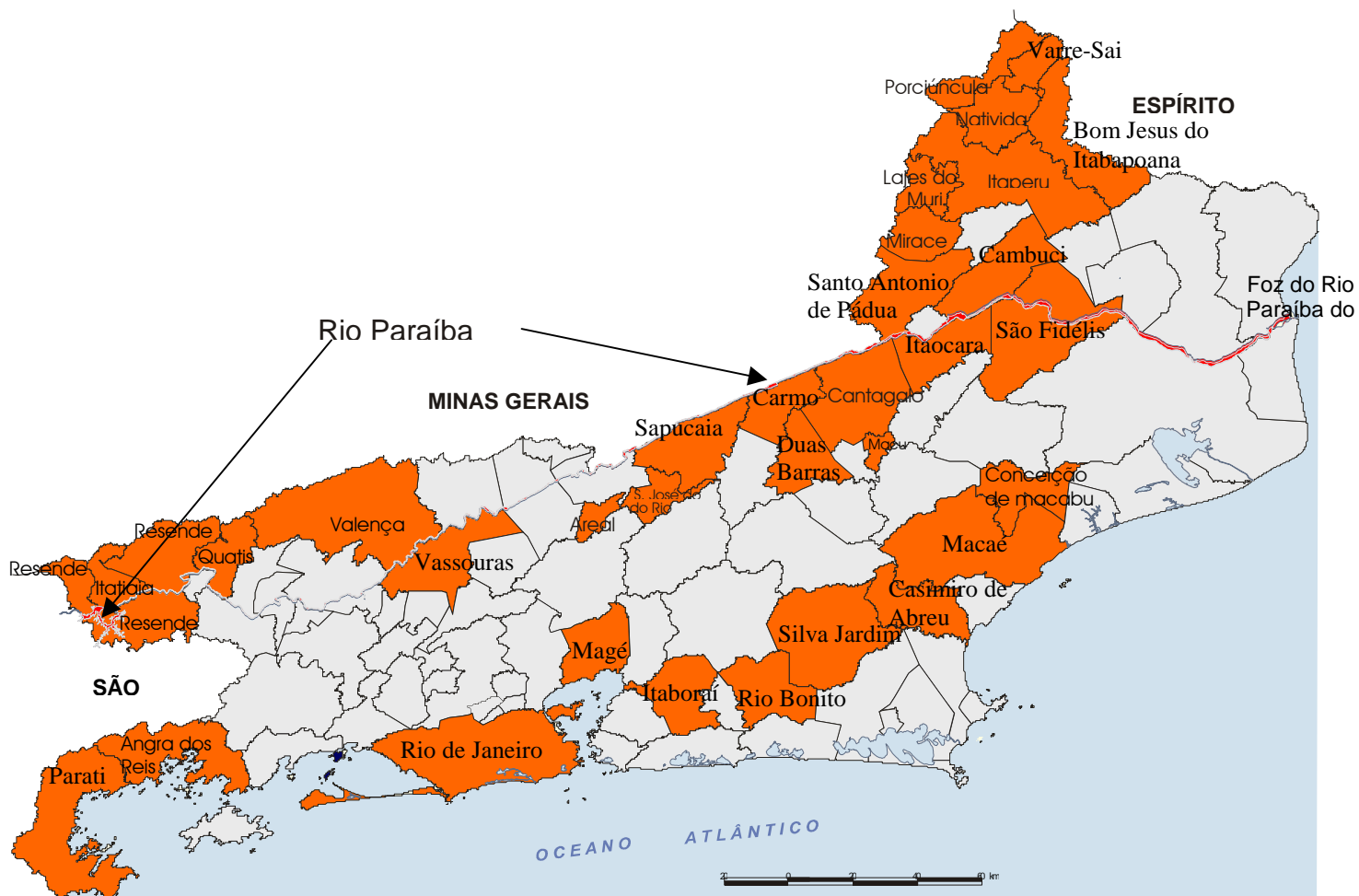
AMOSTRAS	ESPÉCIES	MUNICÍPIOS	ANO	Protocolo RT-PCR
01padbov	Bovino	Santo Antonio de Pádua	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
02padbov	Bovino	Santo Antonio de Pádua	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
03cmabov	Bovino	Conceição de Macabu	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
04quabov	Bovino	Quatis	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
05itapbov	Bovino	Itaperuna	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
06canbov	Bovino	Cantagalo	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
07itapbov	Bovino	Itaperuna	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
08itapbov	Bovino	Itaperuna	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
09magbov	Bovino	Magé	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
10mirbov	Bovino	Miracema	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
11magbov	Bovino	Magé	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
12magbov	Bovino	Magé	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
13magbov	Bovino	Magé	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
14casbov	Bovino	Casemiro de Abreu	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
15padbov	Bovino	Santo Antonio de Pádua	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
16padbov	Bovino	Santo Antonio de Pádua	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
17magbov	Bovino	Magé	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
19quabov	Bovino	Quatis	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997
24mirbov	Bovino	Miracema	1999	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
3litaegu	Eqüino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
32itapbov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
33mirbov	Bovino	Miracema	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.

34itabov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
35varbov	Bovino	Varre-Sai	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
37itabov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
38varbov	Bovino	Varre-Sai	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
39magbov	Bovino	Magé	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
40itabov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
41jarbov	Bovino	Silva Jardim	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
42itabov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
43itabov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
44itabov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
46itapbov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
47macbov	Bovino	Macaé	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
48itapbov	Bovino	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
49itbbov	Bovino	Itaborai	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
50itbbov	Bovino	Itaborai	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
51itapqui	Quiróptero	Itaperuna	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997.
52resbov	Bovino	Resende	2000	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
53itaequ	Equino	Itaperuna	2001	Heaton <i>et al.</i> 1997
54itaobov	Bovino	Itaocara	2001	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
56porbov	Bovino	Porciuncula	2001	Heaton <i>et al.</i> 1997
57carequ	Equino	Carmo	2001	Heaton <i>et al.</i> 1997
58carbov	Bovino	Carmo	2001	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
59itabov	Bovino	Itatiaia	2001	Heaton <i>et al.</i> 1997 e Heinemann <i>et al.</i> 2002
60dbabov	Bovino	Duas Barras	2001	Heaton <i>et al.</i> 1997
61camequ*	Equino	Cambuci	2001	Heaton <i>et al.</i> 1997
62vasbov	Bovino	Vassouras	2001	Heinemann <i>et al.</i> 2002
67murequ	Equino	Lajes do Muriaé	2001	Heinemann <i>et al.</i> 2002
77resbov	Bovino	Resende	2001	Heinemann <i>et al.</i> 2002
85porbov	Bovino	Porciuncula	2002	Heinemann <i>et al.</i> 2002
88janequ	Equino	Rio de Janeiro	2002	Heinemann <i>et al.</i> 2002
92natbov	Bovino	Natividade	2002	Heinemann <i>et al.</i> 2002
100itapbov	Bovino	Itaperuna	2002	Heinemann <i>et al.</i> 2002
113itapbov	Bovino	Itaperuna	2002	Heinemann <i>et al.</i> 2002
114angbov	Bovino	Angra dos Reis	2002	Heinemann <i>et al.</i> 2002
117valbov	Bovino	Valença	2002	Heinemann <i>et al.</i> 2002
132prebov	Bovino	São José do Rio Preto	2003	Heinemann <i>et al.</i> 2002
134sapbov	Bovino	Sapucaia	2003	Heinemann <i>et al.</i> 2002
136parbov	Bovino	Parati	2003	Heinemann <i>et al.</i> 2002
140arebov	Bovino	Areal	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002
142carbov	Bovino	Carmo	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002
145angbov	Bovino	Angra dos Reis	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002
146fidbov	Bovino	São Fidélis	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002
149murqui	Quiróptero	Lajes do Muriaé	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002
151janequ	Equino	Rio de Janeiro	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002
155bonequ	Equino	Rio Bonito	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002
157itabbov	Bovino	Bom Jesus de Itabapoana	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002
158macubov	Bovino	Macuco	2004	Heinemann <i>et al.</i> 2002

Legenda município de: ang = Angra dos Reis, are = Areal, dba = Duas Barras, cam = Cambuci, can = Cantagalo, car = Carmo, cma = Conceição de Macabu, cas = Casemiro de Abreu, itb = Itaborai, ita = Itatiaia, itab = Bom Jesus de Itabapoana, itap = Itaperuna, itao = Itaocara, jan = Rio de Janeiro, mur = Lajes do Muriaé, mac = Macaé, mag = Magé, macu = Macuco, nat = Natividade, qua = Quatis, res = Resende, bon = Rio Bonito, pad = Santo Antonio de Pádua, por = Porciuncula, pre = São José do Rio Preto, sap = Sapucaia, fid = São Fidélis, jar = Silva Jardim, val = Valença, var = Varre-Sai, vas = Vassouras. bov = bovino; equ = equídeos; qui = quiróptero

* amostra negativa pela imunofluorescência direta.

➤ **FIGURA 1.** Mapa do estado do Rio de Janeiro indicando os municípios de origem das amostras (hachurados).



Fonte: Companhia de Desenvolvimento Indust. do est. Rio de Janeiro
Disponível em: <http://www.codin.rj.gov.br>. Acesso em: 09 jun. 2006.

- **QUADRO 2.** Sequências de nucleotídeos de vírus da raiva obtidas no GenBank e utilizadas na análise genealógica.

ESPÉCIE	ORIGEM	NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO
<i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	Af357285
<i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	Ab201805
<i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	Ab083814
<i>Desmodus rotundus</i>	Brasil	Ab083807
<i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	Ab201812
<i>Eptesicus furinalis</i>	Brasil	Ab201813
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Brasil	Ab201807
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Brasil	Ab201806
<i>Molossus molossus</i>	Brasil	Ab201816
<i>Molossus molossus</i>	Brasil	Ab201815
<i>Molossus abrausgi</i>	Brasil	Ab201818
PV	França	X03673
CVS	Inglaterra	Ay102992
SAD	Alemanha	M31046

IV.2. Métodos.

IV.2.1. Amplificação do gene N de vírus da raiva pela RT-PCR

IV. 2.1.1. Extração do RNA viral

A extração do RNA foi realizada diretamente de uma suspensão a 10% de tecido cerebral (segundo protocolo descrito por Koprowski apud Meslin *et al.* 1996), pelo método do TRIzol™ (LifeTechnologies), conforme a recomendação do fabricante, realizado no L BA. da PESAGRO-RIO, como descrito:

IV. 2.1.2. Preparação da suspensão (10%) da amostra

- Colocar três grama de amostra em Gral e triturar;
- Adicionar 29 mL de PBS pH 7.2 em tubo 13 X 100 mm (Corning).
- Agitar a amostra triturada para homogeneizar.
- Centrifugar por 5 min. a 150 - 200 x g.
- Transferir o sobrenadante (+/- 4 mL) para um tubo e desprezar o restante em hipoclorito de sódio a 5%.

IV. 2.1.3. Extração pelo TRIzol™

- Colocar 250 µL da suspensão a 10% em tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL.
- Adicionar 750 µL de TRIzol™, homogeneizar em agitador por 15 s.
- Incubar a amostra por 5 min entre 15 e 30 °C.

- Adicionar 200 µL de clorofórmio P.A. (Merck).
- Agitar os tubos em homogeneizador por 15 s.
- Incubar por 3 min. entre 15 e 30 °C.
- Centrifugar a 12.000 x g /15 min. entre 2 e 8 °C.
- Transferir a fase aquosa para novo tubo coletor (500 µL).
- Adicionar 500 µL de álcool isopropílico P. A. homogeneizar por inversão.
- Incubar por 10 min. entre 15 e 30 °C.(ou 2 horas a –20 °C).
- Centrifugar a 12.000 x g /10 min. entre 2 e 8 °C.
- Desprezar o sobrenadante.
- Adicionar 1.000 µL de etanol P. A. a 75%.
- Agitar em homogeneizador e centrifugar a 7.500 x g /5 min. entre 2 e 8 °C.
- Desprezar o sobrenadante e deixar secar por 20 min.
- Suspender em 20 µL de água destilada Ultra Pura (DNase, RNase free Gibco™).
- Colocar em banho-maria 15 min. a 37 °C.
- Manter a –70 °C até o momento de uso.

IV. 2.1.4.Oligonucleotídeos Iniciadores

Foram utilizados iniciadores (Quadro 3), descritos por Heaton *et al.* (1997) e Heinemann *et al.* (2002), que originaram amplicons de 600 e 804 pares de base (pb), respectivamente.

Para o seqüenciamento foram utilizados, individualmente, os mesmo iniciadores da RT-PCR descritos por Heinemann *et al.* (2002).

➤ **QUADRO 3.** Seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação da região codificadora da nucleoproteína de *vírus da raiva*.

INICIADORES	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO NO GENOMA*	AMPLICONS
sense JW12 ⁺	5`ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG 3`	55-73	600 pb
anti-sense JW6 ⁺ (DPL)	5`CAATTCGCACACATTTTGTG 3`	660-941	
anti-sense JW6 ⁺ (E)	5`CAGTTGGCACACATCTTGTG 3`	660-641	
anti-sense JW6 ⁺ (M)	5`CAGTTAGCGCACATCTTATG 3`	660-641	
sense P1 [#]	5`CTA CAA TGG ATG CCG ACA AGA 3`	66-86	804pb
anti-sense P2 [#]	5`CCT CAA AGT TCT TGT GGA AGA 3`	849-869	

As letras entre parênteses indicam o genotipo para o qual o iniciador foi desenhado: DPL: vírus duvenhage, E: vírus ebbs 1 e 2, M: vírus mokola.

*A posição no genoma segundo seqüência do vírus PV.

⁺Iniciadores JW: Heaton *et al.* (1997)

[#]Iniciadores P: Heinemann *et al.* (2002)

IV.2.1.5. Síntese de cDNA através da reação com a Transcriptase Reversa (RT).

Para a síntese do cDNA, com volume final de 20 μL , foram usados 2 μL de tampão 10x (InvitrogenTM), 1,6 μL de dNTP (50 mM), 0,8 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,12 μL de DTT (100mM - InvitrogenTM), 0,12 μL de RNAsin (InvitrogenTM), 1,0 μL dos iniciadores (10 pmol) sense JW12 (protocolo desenvolvido por Heaton *et al.*, 1997) e anti-sense P2 (protocolo desenvolvido por Heinemann *et al.*, 2002), 1,0 μL (200 unidades) da enzima transcriptase reversa (InvitrogenTM), 8,36 μL de água destilada ultra pura (InvitrogenTM), 5 μL de RNA da amostra previamente incubada por 10 min. a 75 °C. A reação foi realizada à 42 °C por 60 min em termociclador PTC – 100TM Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

IV.2.1.6. Amplificação do cDNA através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

O cDNA obtido no item III.2.1.5, foi amplificado pela PCR. A reação foi realizada em um volume final de 50 μL , com 5,0 μL de tampão 10x (InvitrogenTM), 4,0 μL de dNTP (50 mM), 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM - InvitrogenTM), 1,0 μL de cada iniciador (10 pmol), 0,25 μL (1,25 Unidades) da enzima *Taq* DNAPolimeras (InvitrogenTM) e 30,25 μL (protocolo Heaton *et al.*, 1997) ou 32,25 μL (protocolo Heinemann *et al.*, 2002) de água destilada ultra pura (InvitrogenTM).

Para a reação de PCR foi usando um Termociclador PTC – 100TM Peltier Thermal Cycler (MJ Research), que realizou os seguintes ciclos: segundo Heaton *et al.* (1997): 01 ciclo de 10 min a 95 °C; 05 ciclos de 1,30 min. a 95 °C, 1,30 min. a 45 °C, 20 s. a 50 °C e 1,30 min. a 72 °C; 40 ciclos de 30 s. a 95 °C, 1,00 min. a 45 °C, 20 s. a 50 °C e 1,00 min. a 72°C; 01 ciclo de 30 min. a 95 °C, 1,30 min. a 45°C e 20 s. a 50 °C; um ciclo final de 10 min. a 72 °C. Segundo Heinemann *et al.* (2002): 01 ciclo de 5 min. a 95 °C, 40 ciclos de 45 s. a 94 °C, 1 min. à 55 °C e 1,30 min. a 72 °C, um ciclo final de 10 min. à 72 °C.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese (100 volts por 2 hora) em gel de agarose (InvitrogenTM) a 1,5% em tampão TBE 1X (InvitrogenTM). Dois μL do corante azul de bromofenol 10X (0,3% azul de bromofenol, 65%, sacarose, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 - Invitrogen[®]) foi adicionado 10 μL do produto da PCR. impregnado por brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e analisados em processador de imagem UVP-Bioimaging Systems, modelo Pro-Series Captures Kit MV.

Controles positivos e negativos foram introduzidos desde o preparo da suspensão a 10% e durante todos os procedimentos deste estudo. Todos os cuidados e precauções para o trabalho com metodologia de amplificação foram estritamente seguidos, sendo cada etapa realizada em áreas distintas. Evitando o aparecimento de resultados falso positivo.

IV.2.2.Purificação do fragmento amplificado

Os amplicons do gene da nucleoproteína obtidos pela PCR, foram purificados utilizando-se o kit comercial QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN Inc. Valencia CA. USA), de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente:

- Adicionar em tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, cinco volumes do tampão PB para um volume do produto da PCR e agitar.
- Verter para uma coluna de centrifugação, provida de tubo coletor, a mistura e centrifugar a 10.000 x g/60 s.
- Desprezar o filtrado, adicionar 750 µL de tampão PE e centrifugar por 60 s.
- Descartar o filtrado e centrifugar a 10.000 x g/60 s.
- Transferir a coluna para um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, adicionar 30 µL de tampão EB, aguardar um minuto e centrifugar a 10.000 x g/60 s.
- Desprezar a coluna e manter o filtrado em geladeira.

Após a purificação, os amplicons foram quantificados em gel de agarose a 1,5% utilizando como padrão o “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen®).

IV.2.3. Reação de Seqüenciamento.

Na reação de seqüenciamento, foi utilizado o kit comercial BigDye 3.1 TM terminator – Applied Biosystems. A reação foi executada utilizando o protocolo descrito a seguir:

Para cada reação utilizou-se: 2,0 µL de Terminator ready reaction mix; 2,0 µL Tampão Save Money 5x; 1,0 µL do iniciador anti-sense (10 pMol); 12,0 µL de DNA (24 ng).

Após homogeneização, a reação foi transferida para o termociclador PTC – 100™ Peltier Thermal Cycler (MJ Research), onde foi realizado 01 ciclo de 96 °C por 1,0 min., 40 ciclos de 96 °C por 15 s., 53 °C por 15 s. e 60 °C por 4 min.

Após a amplificação, o DNA foi purificado através da precipitação com isopropanol, conforme protocolo abaixo.

- Para cada 10 µL do produto da reação de seqüenciamento adicionar 40 µL de isopropanol 65% extemporâneo.
- Homogeneizar por inversão.
- Incubar à temperatura ambiente por 15 min ao abrigo da luz.
- Centrifugar a 14000 x g/ 25 min a temperatura ambiente.
- Descartar o sobrenadante cuidadosamente por inversão.
- Lavar o sedimento com 300 µL de etanol 60% extemporâneo.
- Centrifugar a 14000 x g/ 10 min a temperatura ambiente.

- Descartar o sobrenadante com auxílio da pipeta.
- Secar o sedimento no termobloco a 80°C por 2 min. para evaporar o etanol residual.
- Armazenar a -20°C ao abrigo da luz.

IV.2.4. Seqüenciamento do gene da Nucleoproteína (N) de vírus da raiva.

Os produtos purificados da reação de seqüenciamento, foram ressuspensos em formamida e submetidos à eletroforese em seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

IV.2.5. Alinhamento das seqüências do gene da Nucleoproteína (N) de vírus da raiva e Análise Genética.

Após determinar as seqüências de nucleotídeos dos amplicons através da reação de seqüenciamento, as mesmas foram submetidas ao programa computacional PHRED (<http://adenina.biomol.unb.br>) para análise da qualidade de leitura dos cromatogramas. Como critério de validação de qualidade, somente as leituras que tiveram pontuação maior ou igual a 20 foram aceitas.

O ponto de corte maior ou igual a 20 significa que a probabilidade de determinada base estar errada é de uma em mil. Após a análise de qualidade de cada uma das seqüências, estas foram submetidas ao programa computacional CAP3 (<http://adenina.biomol.unb.br>) para a montagem das seqüências consensos.

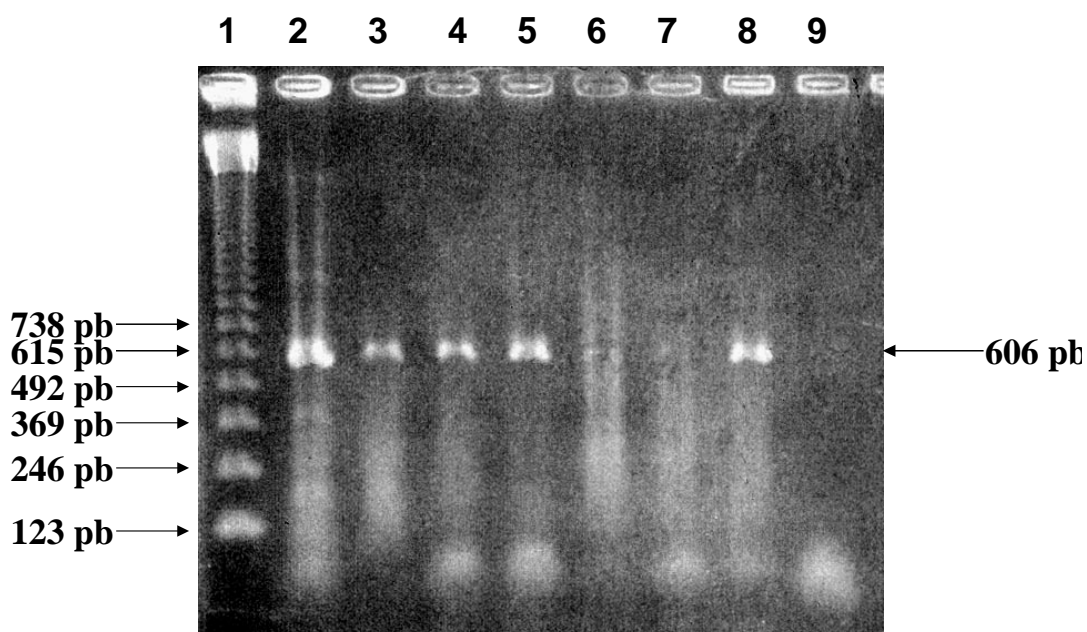
Após a análise da qualidade, as seqüências foram alinhadas e editadas no BioEdit Sequence Alignment Editor (version 6.0.5.2). Para a análise genética foi utilizado o programa MEGA3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis – version 3.1). As distâncias calculadas entre as seqüências foram analisadas através do algoritmo de neighbor-joining, baseado no método de estimativa de distância de Kimura 2 parâmetros para nucleotídeos. Realizou-se a análise de “*bootstrap*” com 1000 repetições. As amostras de referência e protótipos para os genes em estudo foram obtidos a partir do GenBank do National Center for Biotechnology Information, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Quadro 2).

V. RESULTADOS

V.1. Amplificação do cDNA das amostras de vírus da raiva pela PCR

➤ A Figura 2 representa o resultado da amplificação do cDNA de vírus da raiva utilizando os iniciadores JW6 e JW12. Dentre as 50 amostras analisadas, 50 foram positivas pela prova biológica e pela RT-PCR e destas, 49 foram positivas pela imunofluorescência direta.

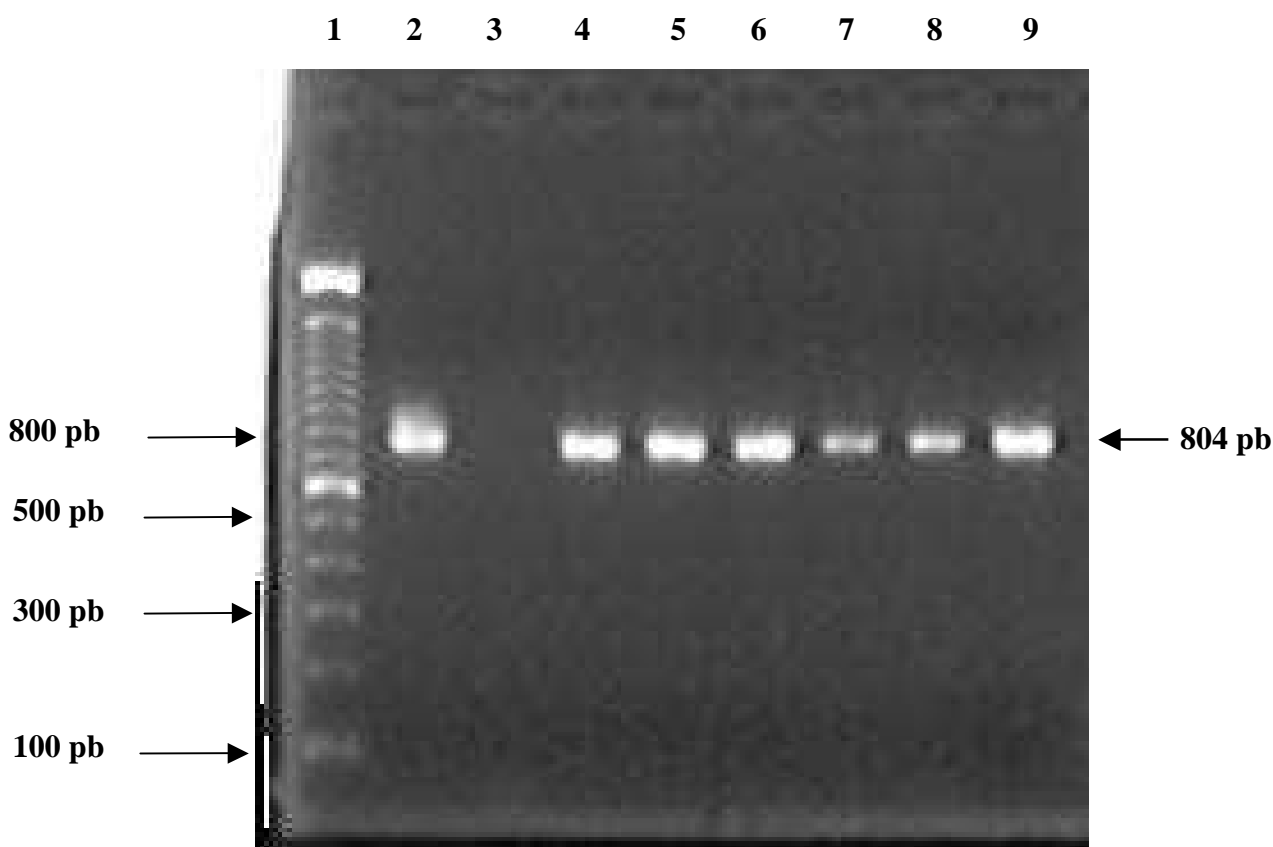
FIGURA 2. Eletroforese de amplicons em gel de agarose da região da nucleoproteína de vírus da raiva utilizando os iniciadores JW6 e JW12.



coluna 1 – padrão de massa molecular de 123pb (Life Technologies); **colunas 2, 3, 4, 5, 6 e 7** – amostras positivas; **coluna 8** - controle positivo (CVS - INCQS/ Fiocruz); **coluna 9**- controle negativo.

➤ A Figura 3 está representado o resultado da amplificação do cDNA de vírus da raiva utilizando os iniciadores P1 e P2. . Dentre as 33 amostras analisadas, 33 foram positivas pela imunofluorescência direta, prova biológica e pela RT-PCR.

FIGURA 3. Eletroforese de amplicons em gel de agarose da região da nucleoproteína de vírus da raiva utilizando os iniciadores P1 e P2.

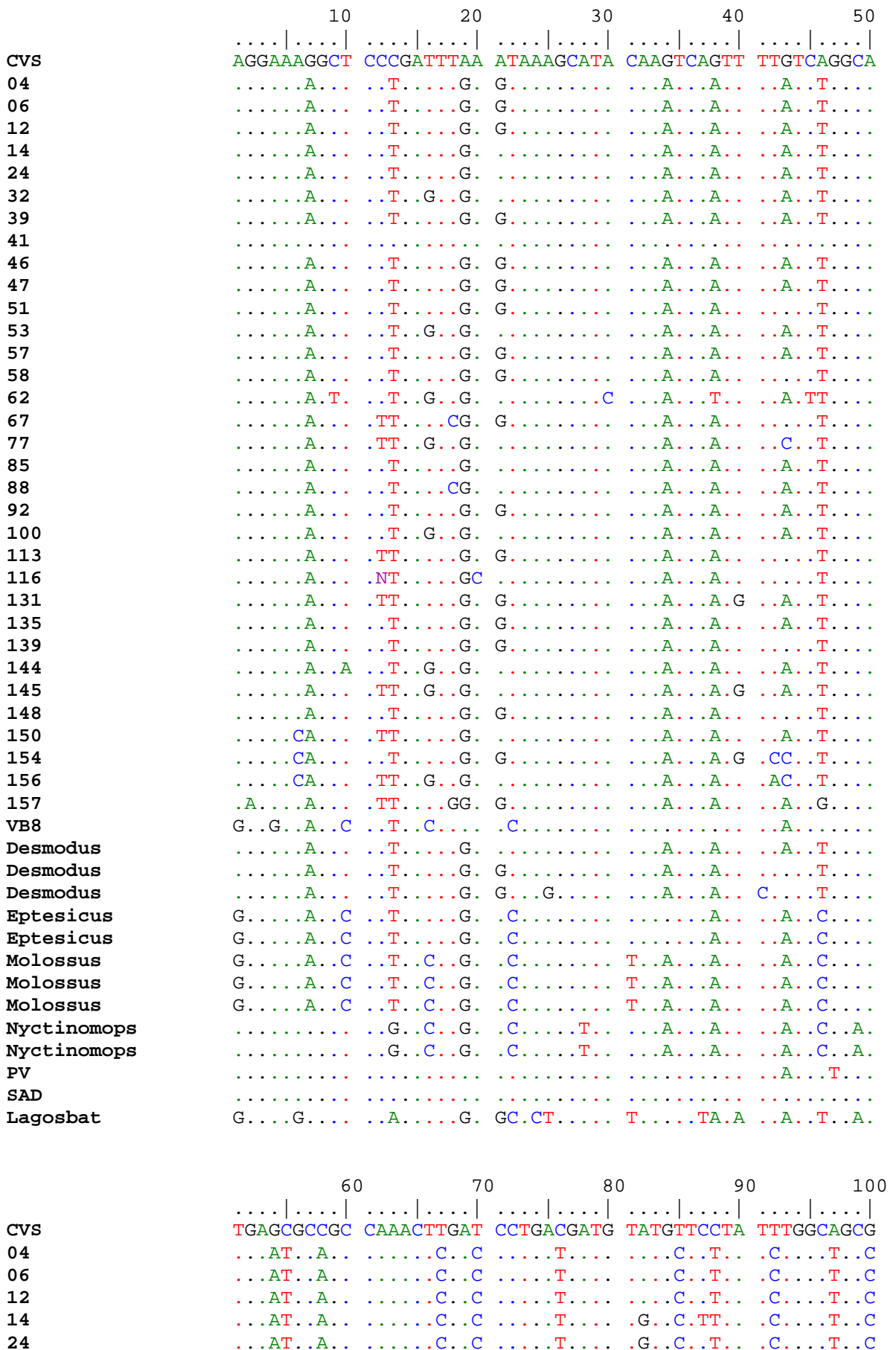


coluna 1 - padrão de massa molecular de 100pb (Life Technologies);
colunas 2, 4, 5, 6, 7 e 8 - amostras positivas; **coluna 9** - controle positivo (CVS - INCQS/ Fiocruz); **coluna 3** - controle negativo.

V.2. Alinhamento das Sequências das Amostras do vírus da raiva.

Os resultados dos alinhamentos das seqüências nucleotídicas das amostras de vírus da raiva e sua tradução em resíduos de aminoácidos encontram-se nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

FIGURA 4. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da nucleoproteína N de vírus da raiva.



```

32      ...A...A... ..A..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
39      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
41      ...T... ..C...T...
46      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
47      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..T
51      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
53      ...A...A... ..A..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
57      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
58      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
62      ...A...A... ..A..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
67      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
77      ...AT..A... ..A..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
85      ...AT..A... ..C..C ..C..T... ..C..T.. .C...T..C
88      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..T
92      ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
100     ...A...A... ..A..C ..G..T... ..C..T.. .C...T..C
113     ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
116     ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
131     ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
135     ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
139     ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
144     ...A...A... ..A..C ...T... ..C..T.. .C...GT..T
145     ...AT..A... ..A..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
148     ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
150     ...AT..A... ..C..C ..C..T... ..C..T.. .C...T..C
154     ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
156     ...A...A... ..A..G ...T... ..C..T.. .C...T..C
157     ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
VB8     ...A... ..G... ..T... ..C... ..A
Desmodus ...A...A... ..A..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
Desmodus ...AT..A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
Desmodus ...A...A... ..C..C ...T... ..C..T.. .C...T..C
Eptesicus ...AT..A... ..G... ..C... ..T... ..G..C..T.. .C... ..T
Eptesicus ...AT..A... ..G... ..C... ..T... ..G..C..T.. .C... ..T
Molossus  ...AT..A... G..G..C..C ...T... ..C..T.. .C..A... ..T
Molossus  ...AT..A... G... ..C..C ...T... ..C..T.. .C..A... ..T
Molossus  ...AT..A... G..G..C..C ...T... ..C..T.. .C..A... ..T
Nyctinomops ...AT..A... ..G... ..C... ..T... ..C..T.. .C..A... ..C
Nyctinomops ...AT..A... ..G... ..C... ..T... ..C..T.. .C..A... ..C
PV        ... ..G...
SAD       ... ..A...
Lagosbat  ...A...T... T..G..G..C ..A..T... ..C..T.. ..T..C

```

```

                               110           120           130           140           150
CVS      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
04      GCAATGCAGT TTTTGGAGGG GACATGTCCG GAAGACTGGA CCAGCTATGG
06      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
12      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
14      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
24      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
32      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
39      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
41      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
46      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
47      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
51      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
53      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
57      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
58      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
62      .G..... .C..... AT.....T .G..... .T.....
67      .G..... .C..A..... AT.....T .G..... .T.....
77      .G..... .C..A..... AT.....T .G..... .T..T.....

```

85	..G.....	.C.....	A.....	T..G.....
88	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
92	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
100	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
113	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
116C.A.....	AT.....	T..G.....
131	..G.....	.C.A.....	AT.....	T..G.....
135	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
139	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
144	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
145	..G.....	.C.A..A.	AT.....	T..G.....
148	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
150	..G.....	.C.....	A.....	T..G.....
154	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
156	..G.....	.C.....	AT.....	TT..G.....
157	..G.....	.C.A.....	AT.....	T..G..G.....
VB8C.....
Desmodus	..G.....	AC.....	AT.....	T..G.....
Desmodus	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
Desmodus	..G.....	.C.....	AT.....	T..G.....
EptesicusC.....	AGT.....	T.....	A.....
EptesicusC.....	AGT.....	T.....	A.....
MolossusC.....	A..AGT.....	T..T..T.....	T.....C..
MolossusC.....	A..AG.....	T..T.....	T.....C..
MolossusC.....	A..AGT.....	T..T.....	T.....C..
Nyctinomops	T..C.....	AGT..C..C	T.....
NyctinomopsC.....	AGT..C..C	T.....
PV
SAD
Lagosbat	..T.....	AC..C..C	AGTC..C..A	T.....TG..T.....

	160	170	180	190	200
CVS	AAATCGTGATT	GCACGAAAAG	GAGATAAGAT	CACCCCAGGT	TCCCTGGTGG
04	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
06	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
12	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
14	...C...A..T..G..G.	...C.....	...G..A.	...T..T...	
24	...C...A..T..G..G.	...C.....	...G..A.	...T..T...	
32	...C...A..T..G..G.	...C.....	...A.	...T..T...	
39	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
41T.....	
46	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
47	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
51	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
53	...C...A..T..G..G.	...C.....	...A.	...T..T...	
57	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
58	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
62	...C...A..T..G..G.	...C.....	...A.	...T..T...	
67	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
77	...C...A..T..G..G.	...C.....	...A.	...T..T...	
85	...C...A..T..G..G.	...C.....	...G..A.	...T..T...	
88	...C...A..T..G..G.	...C.....	...G..A.	...T..T...	
92	...T...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
100	...C.A..A..T..G..G.	...C.....	...G..A.	...T..T...	
113	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
116	...C...A..T..G..G.	...C.....	...G..A.	...T..T...	
131	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
135	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
139	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	
144	...C...A..T..G..G.	...C.....	...A.	...T..T...	
145	..T..C...A..T..G..G.	...C.....	...A.	...T..T...	
148	...C...A..T..G..G.	...C.....	...T..G..A.	...T..T...	

150 ...C...A..T..G..G.C..... ..G.A. ..T..T....
 154 ...T...A..T..G..G.C..... ..G.A. ..T..T....
 156 ...C.A..A..T..G..G.C..... ..G.A. ..T..T....
 157 ...C...A..T..G..G.C..... ..T.G.A. ..T..T....
 VB8 ...C..... ..A..... ..T..T....
 Desmodus ...C...A..T..G..G.C..... ..A..... ..T..T....
 Desmodus ...C...A..T..G..G.C..... ..T.G.A. ..T..T....
 Desmodus ...C...A..T..G..G.C..... ..G.A..... ..T..T....
 Eptesicus ...C.A... ..G..G..G.C..... ..AA..... ..T..T....
 Eptesicus ...C.A... ..G..G..G.C..... ..AA..... ..T..T....
 Molossus ...C...A..AAG.GG.C..... ..T...AG ..T..T....
 Molossus ...C...A..A.G.GG.C..... ..AG..... ..T..T....
 Molossus ...C...A..GAAG.GG.C..... ..T...AG ..T..T....
 Nyctinomops...T...A.....GG.C..... ..A..... ..T..T....
 Nyctinomops...T...A.....GG.C..... ..A..... ..T..T....
 PV T.....
 SAD ...T..... ..T.....
 Lagosbat G...C.T..A..GAA...G.A.CT.. T..T..T.A. GT.T..A.A.

	210	220	230	240	250
CVS	AGATAAAACG	TACTGATGTA	GAAGGGAATT	GGGCTCTGAC	AGGAGGCATG
04	.C...G...GG.....
06	.C...G...GG.....
12	.C...G...GG.....
14	.C...G...	..G...GA...	..G.....
24	.C...G...	..G...GA...	..G.....
32	.C...G...GA...	..G.....
39	.C...G...GG.....
41
46	.C...G...GG.....
47	.C...G...GG.....
51	.C...G...GG.....
53	.C...G...GA...	..G.....
57	.C...G...GG.....
58	.C...G...GG.....
62	.C...G...GA...	..G.....
67	.C...G...GG.....
77	.C...G...GA...	..G.....
85	.C...G...	..G...GA...	..G.....
88	.C...G...	..G...GA...	..G.....
92	.C...G...GG.....
100	.C...G...GA...	..G.....
113	.C...G...GG.....
116	.C...G...GA...	..G.....
131	.C...G...GG.....
135	.C...G...GG.....
139	.C...G...GG.....
144	.C...G...GA...	..G.....
145	.C...G...GA...	..G.....
148	.C...G...GG.....
150	.C...G...	..G...GA...	..G.....
154	.C...G...	..G...GA...	..G.....
156	.C...G...GA...	..G.....
157	.C...G...GG.....
VB8	..C.G...GA
Desmodus	.C...G...GA...	..G.....
Desmodus	.C...G...GG.....
Desmodus	.C.C.G...GG.A...	..G.....
Eptesicus	.C.C.G...	..CA...GC	..A...	..G.T...
Eptesicus	.C.C.G...	..CA...GC	..A...	..G.T...
Molossus	.C...G...	..A...GA...	..G.....
Molossus	.C...G...	..A...G	..A...	..A...	..G.T...

Molossus .C...G... .A...GA...G.....
 Nyctinomops .C...G... A...A.C.GA...G..T...
 Nyctinomops .C...G... A...A.C.GA...G..T...
 PV
 SAD
 Lagosbat .C...CTA. A..GA...GA.CA... ..GGCA

	260	270	280	290	300	
CVS	GAAC	TGACAA	GAGACCCCAC	TGTCCCTGAG	CATGCGTCCT	TAGTCGGTCT
04	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
06	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
12	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
14	..T.....	.G.....T..	..TT.G...A..TC	.G..T..C..	
24	..T.....	.G.....T..	..TT.G...A..TC	.G..T..C..	
32	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
39	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	...T..C..	
41	
46	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
47	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
51	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
53	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
57	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
58	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
62	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
67	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
77	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
85	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
88	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
92	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
100	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
113	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
116	..GT.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
131	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
135	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
139	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
144	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
145	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
148	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
150	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
154	..GT.....	.G...AT..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
156	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
157	..GT.....	.G...AT..	..TT.A...A..TC	.G..T..CT.	
VB8G.....T..	..T.....TC	
Desmodus	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
Desmodus	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
Desmodus	..GT.....	.G.....T..	..TT.A...A..TC	.G..T..C..	
Eptesicus	..GT.....TT.A..AA..T.	.G..T.....	
Eptesicus	..GT.....TT.A..AA..T.	.G..T.....	
Molossus	..GT...T.	.G.....	..TT.G...T..TC	.G..T.....	
Molossus	..GT...T.	.G.....	..TT.G...T..TC	.G..T.....	
Molossus	..GT...T.	.G.....	..TT.G...T..TC	.G..T.....	
Nyctinomops	..GT.....	.G..T.....	..TT.G..AA..T.	.G..T.....	
Nyctinomops	..GT.....	.G..T.....	..TT.G..AA..T.	.G..T.....	
PV	
SAD	
Lagosbat	..TA...GC	...T..T..	A..TG...A	...C..T.	..A.A..A..	

	310	320	330	340	350	
CVS	TCTCTT	GAGT	CTGTATAGGT	TGAGCAAAT	ATCCGGGCAA	AACACTGGTA

04 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 06 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 12 T.A..CG..... C....A..G ..T..C..C.
 14 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 24 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 32 A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 39 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 41
 46 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 47 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 51 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 53 A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 57 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 58 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 62 A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 67 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 77 A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 85 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 88 T.A..C..... C....A..G ..T..C..C.
 92 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 100 A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 113 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 116 A..A..T.A..... C..T..A..G ..T..C..C.
 131 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 135 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 139 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 144 A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 145 A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 148 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 150 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 154 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 156 A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 157 T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 VB8 A..C.....C.....A..A.....T..C..C.
 Desmodus A..T.A..... T..T..A..G ..T..C..C.
 Desmodus T.A..... C....A..G ..T..C..C.
 Desmodus C T.A..... C..T..A..G ..T..C..C.
 Eptesicus T..A..GC.
 Eptesicus T..A..GC.
 Molossus C..C.....T..A..GC..C.
 Molossus C..C.....T..A..GC..C.
 Molossus C..C.....T..A..GC..C.
 Nyctinomops T..A..GC..C.
 Nyctinomops T..A..GC..C.
 PV G.....
 SAD
 Lagosbat T..T.A..CC.AC.....T.....GTG..T.....A.C..

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 360 370 380 390 400
 CVS ACTATAAGAC AAACATTGCA GACAGGATAG AGCAGATTTT TGAGACAGCC
 04 .T..C.....C..G ..T..A.....
 06 .T..C.....T..C..G ..T..A.....
 12 .T..C.....C..G ..T..A..C.....
 14 .T..C.....C..G ..T..A.....
 24 .T..C.....C..G ..T..A.....
 32 .T..C.....A..G ..T..A.....C.....
 39 .T..C.....C..G ..T..A..C.....
 41
 46 .T..C.....C..G ..T..A.....
 47 .T..C.....C..G ..T..A.....
 51 .T..C.....C..G ..T..A.....
 53 .T..C.....A..G ..T..A.....C.....

57	.T.C.....T.C.G..T.A.....
58	.T.C.....C.G..T.A.....
62	.T.C.....A.G..T.A.....C.....
67	.T.C.....C.G..T.A.....
77	.T.C.....A.G..T.A.....C.....
85	.T.C.....C.G..T.A.....
88	.T.C.....C.G..T.A.....
92	.T.C.....T.C.G..T.A.....
100	.T.C.....A.G..T.A.....C.....
113	.T.C.....C.G..T.A.....
116	.T.C.....C.G..T.A.....C.....
131	.T.C.....T.T.C.G..T.A.....
135	.T.C.....T.C.G..T.A.....
139	.T.C.....C.G..T.A.....
144	.T.C.....A.G..T.A.....C.....
145	.T.C.....A.G..T.A.....C.....
148	.T.C.....C.G..T.A.....
150	.T.C.....C.G..T.A.....
154	.T.C.....C.G..T.A.....
156	.T.C.....A.G..T.A.....C.....
157	.T.C.....C.G..T.A.....
VB8T.....C.....
Desmodus	.T.C.....A.G..T.A.....C.....
Desmodus	.T.C.....C.G..T.A.....
Desmodus	.T.C.A.....C.G..T.A.....C.....
Eptesicus	...C.A..C....C...T.A.....A.C..C....G...
Eptesicus	...C.A..C....C...T.A.....A.C..C....G...
Molossus	.T.C.....C.C..T.A.....A....T
Molossus	.T.C.....C.C..T.A.....A....T
Molossus	.T.C.....C.C..T.A.....A....T
Nyctinomops	.T.C.....C.T..T.A.....C.....
Nyctinomops	.T.C.....C.T..T.A.....C.....
PV
SAD
Lagosbat	.T.....C.TG.....G.....A.T.T

	410	420	430	440	450

CVS	CCTTTGTTA	AAATCGTGG	ACACCATACT	CTAATGACAA	CTCACAAAAT
04	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
06	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
12	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
14	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
24	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
32	...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
39	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
41				
46	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
47	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
51	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
53	...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
57	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
58	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
62	...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
67	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
77	...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
85	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
88	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
92	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
100	...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
113	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...G..	.C.....		
116	.C...CA..G...A..	.T...T...T.G...T..	.C.....		

131 ..C...CA..G...A...T...T.G...G..C.....
 135 ..C...CA..G...A...T...T.G...G..C.....
 139 ..C...CA..G...A...T...T.G...G..C.....
 144CA..G...T...T.G...G..C.....
 145CA..G...T...T.G...G..C.....
 148 ..C...CA..G...A...T...T.G...G..C.....
 150 ..C...CA..G...A...T...T.G...G..C.....
 154 ..C...CA..G...A...T...T.G...G..C.....
 156CA..G...T...T.G...G..C.....
 157 ..C...CA..G...A...T...T.G...G..C.....
 VB8T...G.....
 DesmodusCA..G...T...T.G...G..C.....
 Desmodus ..C...CA..G...A...T...G...G..C.....
 Desmodus ..C...CA..G...A...T...T.G...G..C.....
 Eptesicus ..C...A..G..T..A..G..T...T.G...A...G..
 Eptesicus ..C...A..G..T..A...T...T.G...A...G..
 Molossus ..C...A..G...A..A...T...C T.G.....
 Molossus ..C...A..G...A..A...T...C T.G.....
 Molossus ..C...A..G...A..A...T...C T.G.....
 Nyctinomops ..C...A..G...A..A...T...C T.G...C.....
 Nyctinomops ..C...A..G...A..A...T...C T.G...C.....
 PV
 SAD
 Lagosbat ..G...CA..G.G..T...T..C..A T.G...C.....

	460	470	480	490	500

CVS	GTGTGCTAAT	TGGAGTACTA	TACCAAACCTT	CAGATTTTTTG	GCCGGAACCT
04	..C...CCT..CC..	..T...T.
06	..C...CCT..CC..	..T...T.
12CCT..CC..	..T...T.
14	..C...CCT..C...	..T...T.
24	..C...CCT..C...	..T...T.
32	..C...CCT..CC..	..T...T.
39CCT..CC..	..T...T.
41CCT..CC..	..T...T.
46	..C...CCT..CC..	..T...T.
47	..C...CCT..CC..	..T...T.
51	..C...CCT..CC..	..T...T.
53	..C...CCT..CC..	..T...T.
57	..C...CCT..CC..	..T...T.
58	..C...CCT..CC..	..T...T.
62	..C...CCT..CC..	..T...T.
67	..C...CCT..CC..	..T...T.
77	..C...CCT..CC..	..T...T.
85	..C...CCT..CC..	..T...T.
88	..C...CCT..CC..	..T...T.
92	..C...CCT..CC..	..T...T.
100	..C...CCT..CC..	..T...T.
113	..C...CCT..CC..	..T...T.
116	..C...CCT..CC..	..T...T.
131	..C...CCT..CC..	..T...T.
135	..C...CCT..CC..	..T...T.
139	..C...CCT..CC..	..T...T.
144	..C...CCT..CC..	..T...A.
145	..C...CCT..CC..	..T...T.
148	..C...CCT..CC..	..T...T.
150	..C...CCT..CC..	..T...T.
154	..C...CCT..CC..	..T...T.
156	..C...CCT..CC..	..T...T.
157	..C...CCT..CC..	..T...T.
VB8C..CC	..C..GCT
Desmodus	..C...CCT..CC..	..T...T.

```

Desmodus      ...C...C...C...T...CC...T...T.
Desmodus      ...C...C...C...T...CC...T...T.
Eptesicus     ...C...C...C...C...C...A...G...
Eptesicus     ...C...C...C...C...C...A...T...G...
Molossus      ...C...C...C...G...T...CC...G...
Molossus      ...C...C...C...G...T...CC...G...
Molossus      ...C...C...C...G...T...CC...G...
Nyctinomops   ...C...C...C...C...C...CC...A...G...
Nyctinomops   ...C...C...C...C...C...CC...A...G...
PV            .....
SAD           .....
Lagosbat      ...C...A...C...A...T...T...T...G...A...A...A...

```

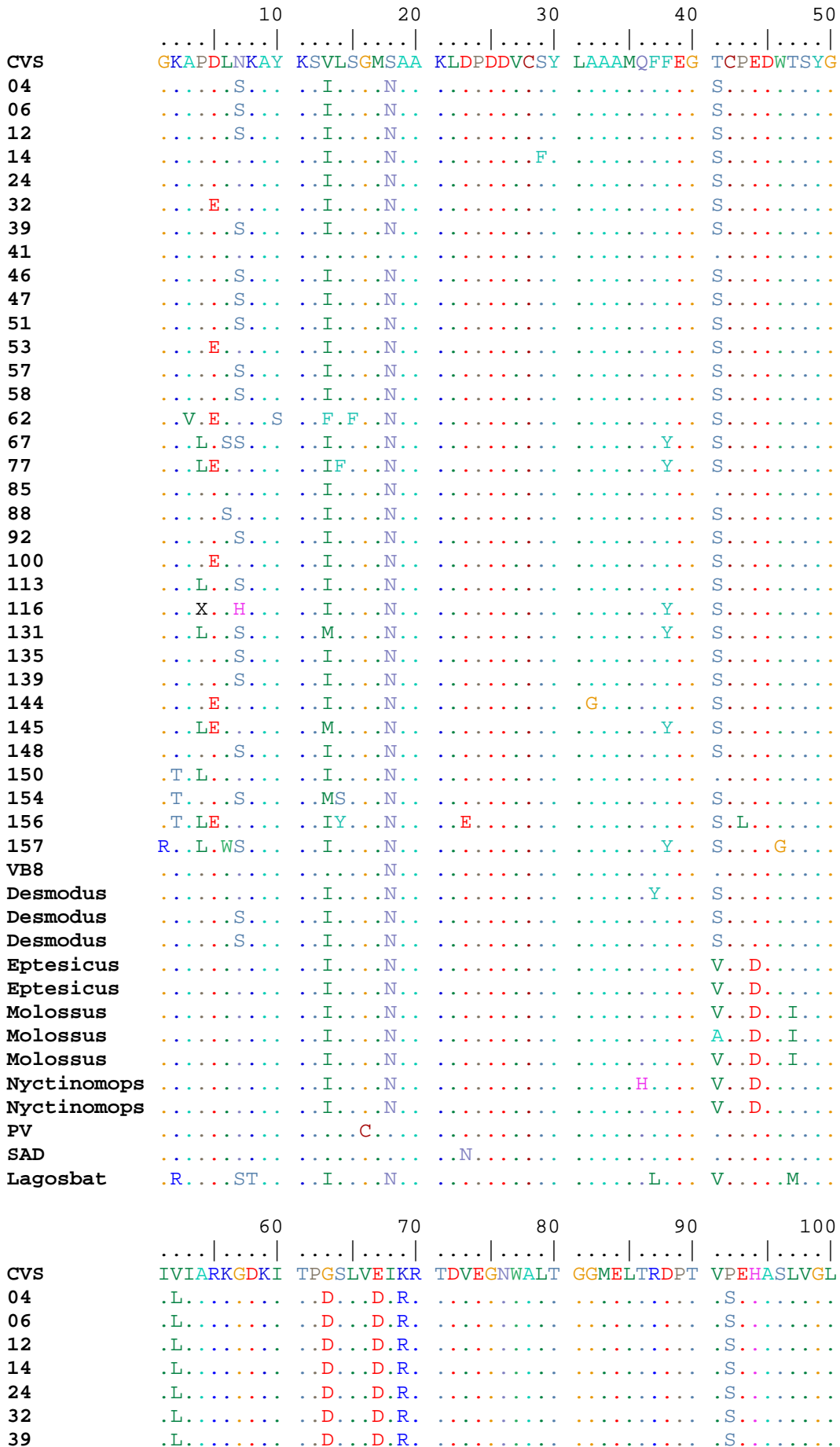
510

```

.....|.....|.....
CVS      ATGACATGTT TTTC
04       .....
06       .....
12       .....
14       .....
24       .....
32       .....
39       .....
41       .....
46       .....
47       .....
51       .....
53       .....
57       .....
58       .....
62       .....
67       .....
77       .....
85       .....
88       .....
92       .....
100      .....
113      .....
116      .....
131      .....
135      .....
139      .....
144      .....
145      .....
148      .....
150      .....
154      .....
156      .....
157      .....C...
VB8      .C.....
Desmodus   .....
Desmodus   .....
Desmodus   .....
Eptesicus  .....
Eptesicus  .....
Molossus   .C.....
Molossus   .C.....
Molossus   .C.....
Nyctinomops .C.....
Nyctinomops .C.....
PV         .....
SAD        .....
Lagosbat   ...T...C..T

```

FIGURA 5. Tradução e alinhamento das seqüências de aminoácidos da nucleoproteína N do vírus.



```

41 .....
46 .L.....D..D.R.....S.....
47 .L.....D..D.R.....S.....
51 .L.....D..D.R.....S.....
53 .L.....D..D.R.....S.....
57 .L.....D..D.R.....S.....
58 .L.....D..D.R.....S.....
62 .L.....D..D.R.....S.....
67 .L.....D..D.R.....S.....
77 .L.....D..D.R.....S.....
85 .L.....D..D.R.....S.....
88 .L.....D..D.R.....S.....
92 .L.....D..D.R.....S.....
100 .L.....D..D.R.....S.....
113 .L.....D..D.R.....S.....
116 .L.....D..D.R.....S.....
131 .L.....D..D.R.....S.....
135 .L.....D..D.R.....S.....
139 .L.....D..D.R.....S.....
144 .L.....D..D.R.....S.....
145 FL.....D..D.R.....S.....
148 .L.....D..D.R.....S.....
150 .L.....D..D.R.....S.....
154 .L.....D..D.R.....H..S.....
156 .L.....D..D.R.....S.....
157 .L.....D..D.R.....H..S.....F
VB8 .L.....D.....I.....S.....
Desmodus .L.....D..D.R.....S.....
Desmodus .L.....D..D.R.....S.....
Desmodus .L.....D..D.R.....S.....
Eptesicus .L.....N..D...N.....S.....
Eptesicus .L.....N..D...N.....S.....
Molossus .L..KR.....E..D.R..N.....S.....
Molossus .L..R.....E..D.R..N.....S.....
Molossus .L..KR.....E..D.R..N.....S.....
Nyctinomops .L..R.....D.R..N.....S.....
Nyctinomops .L..R.....D.R..N.....S.....
PV .....
SAD .....
Lagosbat .L..K..ET..DV.ID.T..N.....Q..ADM.....A.....I..

```

```

110 120 130 140 150
....|....|....|....|....|....|....|....|
CVS LLSLYRLSKI SGQNTGNYKT NIADRIEQIF ETAPFVKIVE HHTLMTTHKM
04 .....A.....
06 .....A.....
12 ..G.....A.....
14 .....A.....
24 .....A.....
32 .....A.....
39 .....A.....
41 .....A.....
46 .....A.....
47 .....A.....
51 .....A.....
53 .....A.....
57 .....A.....
58 .....A.....
62 .....A.....
67 .....A.....
77 .....A.....
85 .....A.....
88 .....A.....
92 .....A.....

```



```

100      .....A.....
113      .....A.....
116      .....A.....
131      .....A.....
135      .....A.....
139      .....A.....
144      .....A.....
145      .....A.....
148      .....A.....X
150      .....A.....
154      .....A.....
156      .....A.....
157      .....A.....
VB8
Desmodus .....A.....
Desmodus .....A.....
Desmodus .....A.....
Eptesicus .....
Eptesicus .....
Molossus .....I.....
Molossus .....I.....
Molossus .....I.....
Nyctinomops .....I.....
Nyctinomops .....I.....
PV      .....S.....
SAD
Lagosbat ..C.....V.....A......V.....M......A.V.....

```

```

                                160      170
                                ....|....|....|....|.
CVS      CANWSTIPNF RFLAGTYDMF F
04
06
12
14
24
32
39
41
46
47
51
53
57
58
62
67
77
85
88
92
100
113
116
131
135
139
144
145
148
150
154
156
157

```

VB8
Desmodus
Desmodus
Desmodus
Eptesicus
Eptesicus
MolossusA.....
MolossusA.....
MolossusA.....
Nyctinomops
Nyctinomops
PV
SAD
Lagosbat

V.3. Reconstrução da árvore filogenética.

O seqüenciamento parcial do gene da nucleoproteína (N) gerou uma “árvore” que demonstra a relação genealógica entre as amostras de vírus da raiva, usando seqüências com 514 bases, e construída usando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros, com o algoritmo Neighbor-joining. Os valores de *bootstrap* (1000 replicas) encontram-se indicados nos ramos da árvore (Figura 6). A árvore encontra-se enraizada, sendo que a amostra *Lagos Bat Virus* (GenBank AY333110) genotipo 2 foi considerado como grupo externo.

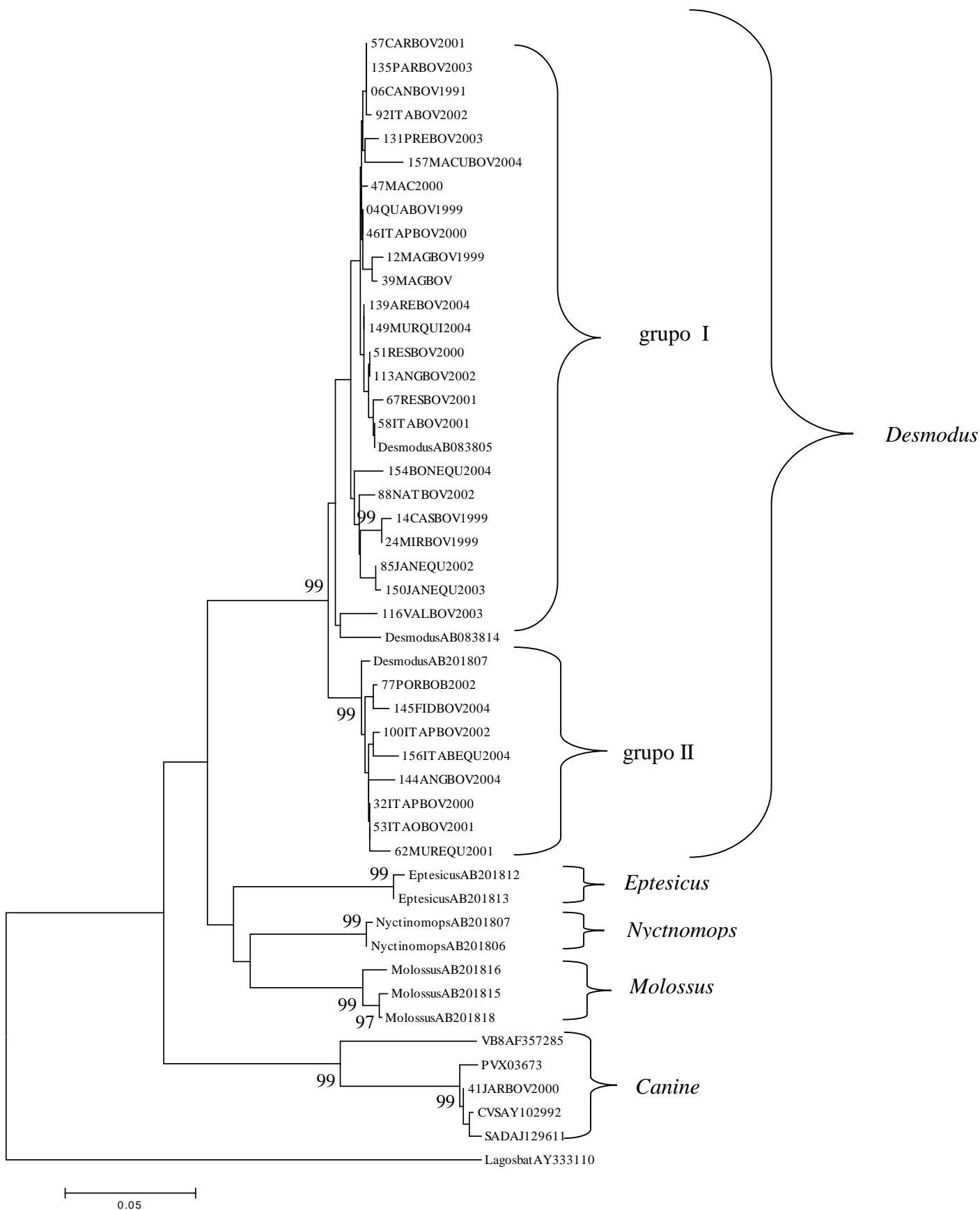


FIGURA.6. Filograma da similariedade genética entre as amostras de vírus da raiva, utilizando seqüências de nucleotídeos para o gene da nucleoproteína. A árvore foi reconstruída pelo algoritmo de Neighbor-joining usando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros. Os números representam os valores de “bootstrap” com 1000 réplicas.

V.4. Análise dos Grupos

Conforme o resultado obtido na árvore genética nucleotídica, obtivemos cinco agrupamentos:

- Agrupamento 1 – formado pelas amostras CVS, SAD, PV, V8 e 041JARBOV;
- Agrupamento 2 – formado pelas amostras *Molossus*;
- Agrupamento 3 – formado pelas amostras *Nyctinomops*;
- Agrupamento 4 – formado pelas amostras *Eptesicus*;
- Agrupamento 5 – formado pelas amostras *Desmodus*.

Observamos que o segmento da amostra 041JARBOV analisada apresentou acentuada similaridade com o mesmo segmento da amostra das linhagens CVS, PV, SAD e a amostra V8, utilizadas neste trabalho.

VI. DISCUSSÃO

VI.1. Importância epidemiológica do diagnóstico rápido do vírus da raiva.

Segundo Sacramento *et al.* (1991), o futuro das técnicas de amplificação reside na sua capacidade de ultrapassar a sensibilidade das técnicas de diagnóstico *pós-mortem* ou em sua adequabilidade em diagnóstico a partir de secreções de animais vivos, enquanto os laboratórios de diagnóstico permanecem com técnicas demoradas e imprecisas.

Para Kamolvarin *et al.* (1993), a técnica de RT-PCR no diagnóstico de vírus da raiva é muito importante por permitir a amplificação do genoma viral em espécimes clínicos em estado de decomposição como também pela rapidez do diagnóstico. Por outro lado, o teste biológico que é utilizado como prova confirmatória do diagnóstico da Raiva pode levar até 30 dias para um resultado conclusivo. Em concordância com esta afirmativa, um dos materiais analisados neste estudo (61camequ) foi negativo no teste por imunofluorescência, e foi positivo no teste biológico após 21 dias e na RT-PCR. Segundo Whitby *et al.* (1997), a metodologia de RT-PCR, não requer a retirada por completo do cérebro do animal, facilitando a obtenção das amostras e agilizando o diagnóstico, podendo-se ter um resultado em 48 horas.

O gene codificador da nucleoproteína (N) é considerado entre as diversas amostras de vírus da raiva, sendo conveniente para o uso em técnicas de diagnóstico e para análises evolutivas (Bourhy *et al.*, 1992; Arai *et al.*, 1997). O uso da proteína N para determinar a origem genética de seqüências do RNA viral foi demonstrado por David *et al.* (2000). O segmento do gene que dá origem a nucleoproteína (N) apresenta-se como o mais estável do genoma de vírus da raiva, o que possivelmente justifica a maior homogeneidade das proteínas por ela produzida (Kissi *et al.* 1999).

A variabilidade genética de populações de *Lyssavirus* causando encefalites em espécies animais já havia sido verificada sorologicamente e empiricamente até mesmo antes da virologia estabelecer-se como ciência, sendo os diferentes “ciclos” da Raiva definidos de acordo com as espécies (Bahloul *et al.*, 1998). Nas Américas, as variações genéticas e antigênicas de vírus da raiva estão associadas com as diferentes espécies de carnívoros terrestres e morcegos. Estas variações ocorrem de maneira independente, em diferentes áreas geográficas, gerando variantes específicas regionais (Carnieli Jr *et al.*, 2006; Velasco-Villa *et al.*, 2006). Para Real *et al.* (2005), a reconstrução e comparação

genética revelam grupamentos importantes em relação ao tempo evolucionário e extensões geográficas, sugerindo que estes grupamentos geográficos dependem da subestrutura ecológica de cada habitat.

A Raiva no Brasil verifica-se como ocorrendo em dois ciclos ecológicos, um urbano e outro silvestre. Os casos de Raiva no ambiente urbano têm sido menos freqüentes em virtude das campanhas de posse responsável, controle e vacinação de cães e gatos, principalmente nos grandes centros urbanos. Em contraste, a Raiva de origem silvestre tem se apresentado mais evidente e, em muitos casos, com o envolvimento de quirópteros (Sallum *et al.*, 2000; Heinemann *et al.*, 2002; Belloto *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005).

É evidente que vírus da raiva circulam entre os animais silvestres. A mudança de comportamento das pessoas levando estes animais para os centros urbanos representa um risco potencial para seres humanos e animais domésticos (Almeida *et al.* 2001).

Para Almeida *et al.* (2005), o morcego *Desmodus rotundus* é extremamente resistente à Raiva, produzindo títulos de anticorpos que poderiam ser considerados protetores em humanos. Esta resistência talvez possa explicar o papel destes na transmissão de vírus da raiva na natureza.

Os hábitos de se abrigar podem influenciar a distribuição local e global dos morcegos, as densidades de suas populações, as estratégias de forrageamento e de acasalamento, sua estrutura social e os deslocamentos sazonais (Altringham apud Brecht *et al.* 1999). O desmatamento, levou ao desequilíbrio do meio ambiental e aumento do contato de morcegos hematófagos com humanos e animais de criação, provavelmente este fator causou os recentes episódios de Raiva em humanos por estirpes identificadas como originárias de morcegos da espécie *Desmodus rotundus*, nos estados do Pará e Maranhão, em 2004 e 2005, respectivamente. Desta forma, estas estirpes, anteriormente identificadas como responsáveis por perdas econômicas em animais de criação em torno de 15 milhões de dólares por ano (Anonymous, 2006; Bordignon *et al.*, 2005), passou a representar um grave problema de Saúde Pública. Gomes & Uieda (2004), demonstraram a capacidade dos morcegos da espécie *Desmodus rotundus* utilizar diferentes tipos de abrigos diurnos (casas abandonadas no campo, pontes, fornos de carvão, poços d'água abandonados, bueiros sob rodovias e outras estruturas similares) adaptando-se às modificações introduzidas pelo ser humano no ambiente

VI.2. Análise Filogenética e Epidemiologia Molecular de vírus da raiva no estado do Rio de Janeiro.

Para Ito *et al.* (2001), a análise molecular do gene da nucleoproteína (N) do vírus da raiva, demonstrou ser uma metodologia prática e proveitosa para determinar os reservatórios assim como para o diagnóstico de rotina. Isto sugere o significativo valor dos métodos de análise molecular, justificando a implantação no Brasil da técnica de RT-PCR nos laboratórios que fazem de forma rotineira o diagnóstico da Raiva. Oliveira *et al.* (2006), afirmam que em laboratórios de diagnóstico para vírus da raiva, as metodologias moleculares como RT-PCR e o seqüenciamento são ferramentas adicionais bem sensíveis para detectar o ácido nucléico e determinar a variante de vírus da raiva.

Os resultados obtidos pela análise genética neste estudo sugerem que as populações de vírus da raiva presentes atualmente no estado do Rio de Janeiro infectando o rebanho bovino são todas relacionadas às amostras oriundas de *Desmodus rotundus*. Tanto Romijn *et al* (2003) trabalhando com amostras do estado do Rio de Janeiro, quanto Bordignon *et al* (2005) trabalhando com espécimes do estado de Santa Catarina, observaram que amostras de vírus identificadas nestes animais se agrupavam, sendo semelhantes a amostras isoladas diretamente de morcego *Desmodus rotundus*. Neste estudo, ficou evidenciado que a transmissão viral efetivou-se pelo *Desmodus rotundus*, a partir do ambiente silvestre. Os resultados deste estudo corroboram os anteriores.

Kobayashi *et al.* (2005) também encontraram morcegos insetívoros (*Mollosus* sp. e *Eumops* sp.) infectados com uma estirpe variante de vírus da raiva semelhante geneticamente à encontrada em morcegos da espécie *Desmodus rotundus*, sugerindo que ocorre a transmissão desta variante entre estas diferentes espécies. Como Bredt & Uieda (1996) sugerem, os membros da família *Molossidae* possuem uma grande capacidade de aceitar as mudanças ambientais, ajustando-se bem as condições oferecidas pelo Homem em áreas urbanas. Com isso, abrigam-se em forros de casas, sótãos, porões, janelas, espaços entre prédios, etc., tornam-se potenciais transmissores da Raiva para os seres humanos.

Devido a pouca variabilidade do gene da nucleoproteína (N), o seqüenciamento das amostras de vírus da raiva no presente trabalho, mostrou sítios evolutivos informativos para a verificação de correlações genéticas entre as amostras de vírus, possibilitando sugerir uma origem comum das linhagens estudadas.

A construção de hipóteses genéticas está baseada na comparação de caracteres entre grupos de organismos, na identificação de suas semelhanças e diferenças para, através de métodos específicos, construir árvores genéticas que irão refletir a história seletiva dos grupos. Para tal, é necessário que se trabalhe com caracteres que confirmem consistência às árvores propostas, assim como encontrar o método mais adequado para sua construção (Fernandes-Matioli apud Heinemann, 2000).

É interessante observar que a amostra 041JARBOV alinha-se com os vírus fixos. Esta amostra é um isolado de bovino sabidamente espoliado por morcego hematófago. Da mesma forma Heinemann *et al.*(2002), também tiveram uma amostra de morcego hematófago (AF357285) que agrupou com amostras de vírus fixo (variante canina). Badrane & Tordo (2001), afirmam que seus estudos indicam que os *Lyssavirus* primeiro adaptaram-se aos quirópteros para depois passarem para os carnívoros. A passagem dos *Lyssavirus* de quirópteros para carnívoros não é um fato incomum, e existem relatos contemporâneos deste fato. Além da interpretação descrita anteriormente, deve-se analisar a possibilidade de este herbívoro ter sido vacinado com vacina contendo vírus modificado, e portanto infeccioso, de indicação apenas para carnívoros, e terem desenvolvido Raiva a partir de vírus vacinal. Para tanto, outros segmentos, além dos por nós analisados, devem ser seqüenciados e comparados.

Heinemann *et al.* (2002) não observaram diferenças genéticas nos segmentos por eles analisados que pudessem indicar variações temporais ou relativas a diferentes ambientes geográficos em seu trabalho. Para Schaefer *et al.* (2005), apesar da grande distancia geográfica que separa as amostras utilizadas em seu estudo, não foram encontradas variações entre estirpes e as diversas origens geográficas das amostras. Já Romijn *et al.* (2003) verificaram em seus estudos que bacias hidrográficas são um importante fator para a homogeneidade de populações de vírus, encontrando variações genéticas nas amostras estudadas, entre as diferentes regiões geográficas. Carnieli Jr. *et al.* (2006), descrevem que alguns autores citam não haver variações geográficas de amostras oriundas de quirópteros, tendo em seus estudos observado variações nas amostras oriundas de canídeos de diferentes localidades da região Nordeste.

Os resultados de nosso trabalho sugerem que os vírus presentes no estado não têm sofrido variação significativa ao longo do tempo e em relação às regiões geográficas. É

possível que a maioria das amostras por nós estudadas sejam originárias de uma única bacia, a grande bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, que corta o estado do Rio de Janeiro de Norte a Sul.

A execução de teste (dados não mostrados) com os grupos externos e os grupos I e II, mostraram que não existem diferenças significativas de substituição de nucleotídeos entre os grupos I e II. Os resultados indicam que provavelmente a variabilidade observada ocorre em virtude de modificações sinônimas, similares ao resultado obtido por Kissi *et al.* (1995) e Heinemann *et al.* (2002), indicando que não existe evidências do efeito cumulativo de mutações não sinônimas e eventuais mudanças de epítomos.

Até a presente data, a Raiva é considerada 100% letal após o aparecimento do quadro clínico. No entanto, dependendo da competência imune do indivíduo infectado, este desenlace pode ser alterado com o tratamento pré e pós-exposição (Ambrozaitis *et al.* 2006). Embora as bases imunológicas da proteção vacinal na Raiva não estejam claramente elucidadas, tem se demonstrado que as respostas imunológicas humoral e celular são induzidas pelas vacinas (Fekadu *et al.*, 1992). Vacinas recombinantes utilizando a glicoproteína (G) tem se mostrado eficiente contra a infecção pelo vírus da raiva. Contudo, a análise antigênica de amostras de diversas origens (fixa, vírus de rua e vírus relacionados) demonstrou variações genéticas dos vírus conforme os hospedeiros sejam de diferentes espécies e regiões geográficas. Isto poderia causar sério problema na estratégia de controle da Raiva, motivando a inclusão da nucleoproteína (N) na vacina, em virtude da baixa variabilidade genética desta proteína (Dietzschold *et al.*, 1987).

Nosso estudo enfatiza a importância do acompanhamento molecular de vírus da raiva em amostras de campo em relação ao aparecimento de subpopulações de vírus da raiva diferenciadas (fenômeno de “quasi-espécies”), tornando esta vigilância um mecanismo epidemiológico importante para se prevenir casos de Raiva devido ao surgimento de variantes para as quais não possa ser desenvolvida imunidade.

VII. CONCLUSÕES

VII.1. O uso de RT-PCR é uma ferramenta sensível e específica para apoiar o diagnóstico laboratorial, bem como a caracterização epidemiológica de focos de Raiva.

VII.2. Foi possível caracterizar as seqüências parciais do gene da nucleoproteína (N) de amostras de vírus da raiva isoladas em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro.

VII.3. Quando da análise comparativa entre segmentos de seqüências isoladas em relação à variabilidade nucleotídica, não se observou diferença genética entre os segmentos sob estudo das amostras originárias de diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro.

VII.4. Quando da análise comparativa entre segmentos de seqüências isoladas em relação à variabilidade nucleotídica, não se observou diferença genética entre os segmentos sob estudo das amostras isoladas em diferentes momentos temporais (1999 e 2004).

VII.5. Foi possível propor um filograma envolvendo as amostras virais estudadas, onde foram constatados dois grandes grupos de maior similaridade genética. O primeiro envolvendo as amostras vacinais e a amostra 041JARBOV, o segundo, compreendendo o restante das amostras estudadas.

VIII. PERSPECTIVAS

Continuar o acompanhamento molecular dos vírus circulantes no estado do Rio de Janeiro, colaborando com a vigilância epidemiológica e laboratorial, na tentativa de identificar possíveis variações no genoma do vírus e prevenir o aparecimento de falhas na cobertura vacinal.

IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ANONYMOUS. CNPq. **Relatórios finais do seminário do programa de indução estratégica à pesquisa em saúde do CNPq.** Disponível em: <<http://www.cnpq.br/editais/saude.htm>>. Acesso em 10 jul. 1998.

ANONYMOUS. MMWR. **Rabies in a beaver---Florida, 2001.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/oreview/mmwrhtml>>. Acesso em: 07 maio 2002.

ANONYMOUS. **Rabies, human, vampires bat – Brazil (Maranhão).** in: International Society for Infectious Diseases. Disponível em: <<http://www.promedmail.org/pls/promed>>. Acesso em: 09 janeiro 2006.

ALMEIDA, M. F.; MASSAD, E.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; JOPERT, A. M. S. Neutralizing antirabies antibodies in urban terrestrial wildlife in Brazil. **Journal of Wildlife Disease.** v. 37, n. 2, p. 394-398, 2001.

ALMEIDA, M. F.; MARTORELLI, L. F. A.; AIRES, C. C.; SALLUM, P. C.; DURIGON, E. L.; MASSAD, E. Experimental rabies infection in haematophagous bats *Desmodus rotundus*. **Epidemiology and Infection.** v. 133, n. 3, p. 523-527, 2005.

AMBROZAITIS, A.; LAISKONIS, A.; BALCIUNIENE, L.; BANZHOFF, A.; MALERCZYK, C. Rabies post-exposure prophylaxis vaccination with purified chick embryo cell vaccine (PCECV) and purified vero cell rabies vaccine (PVRV) in a four-site intradermal schedule (4-0-2-0-1-1): an immunogenic, cost-effective and practical regimen. **Vaccine.** v. 24, n. 19, p. 4116-4121, 2006.

ARAÚJO, F. A. A. A situação da Raiva no Brasil. In: **SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA**, 2000, São Paulo. Anais... São Paulo: Parlamento Latino Americano, 2000. P. 22.

ARAI, Y.T.; YAMADA, K.; KAMEOKA, Y.; HORIMOTO, T.; YAMAMOTO, K.; YABE, S.; NAKAYAMA, M.; TASHIRO, M. Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. **Archives of Virology.** v. 142, n. 9, p. 1787-1796, 1997.

¹ NBR6023 – AGO.2000 (ABNT)

ATANASIU, P. Animal inoculation and the Negri body. In: Baer, G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 373-399.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of Two *Lyssavirus* Phylogroups with Distinct Pathogenicity and Immunogenicity

BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in *Lyssavirus* history from the chiroptera to the carnivora orders. **Journal of Virology**. v. 75, n. 17, p. 8096-8104, 2001.

BAHOUL, C.; JACOB, Y.; TORDO, N.; PERRIN, P. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. **Vaccine**. v. 16, n. 4, p. 417- 425, 1998.

BATISTA-MORAIS, N.; ROLIM, B. N.; CHAVES, H. H. M.; NETO, J. B.; SILVA, L. M. Rabies in tamarins (*Callithrix jacchus*) in the state of Ceara, Brazil, a distinct viral variant. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, n 5, p. 609-610, 2000.

BELLOTO, A.; LEANES, L. F.; SCHNEIDER, M. C.; TAMAYO, H.; CORRÊA, E. Overview of rabies in the Americas. **Virus Research**. v. 111, n. 1, p. 5-12, 2005.

BLACK, E.M.; McELHINNEY, L. M.; LOWINGS, J. P.; SMITH, JEMMA; JOHNSTONE, PAMELA, HEATON, P. R. Molecular methods to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat lyssaviruses. **Journal of Virological Methods**. v. 87, n. 1 - 2, p. 123 – 131, 2000.

BORDIGNON, J.; BRASIL DOS ANJOS, G.; BUENO, C. R.; OPORTO, J. S.; DÁVILA, A. M. R.; GRISARD, E. C.; ZANETTI, C. R. Detection and characterization of rabies virus in southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Archives of Virology**. v. 150, n 4, p. 695-708, 2005.

BOURHY, H.; SUREAU, P. **Laboratory methods for rabies diagnosis**. Institut Pasteur, 1991. P. 197.

BOURHY, H.; KISSI, B.; LAFON, M.; SACRAMENTO, D.; TORDO, N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, n. 9, p. 2419- 2426, 1992.

BOURHY, H, KISSI, B.; AUDRY, L.; SMRECZAK, M.; TODYS, M. S.; KULONEN, K.; TORDO, N.; ZMUDZINSKI, J. F.; HOLMES, E. C. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. **Journal of General. Virology**. v. 80, n. 10, p. 2545-57, 1999.

BREDT, A.; UIEDA, W. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. **Chiroptera Neotropical**. v. 2, n. 2, p. 54-57, 1996.

BREDT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. D. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 16, n. 3, p 731-770, 1999.

CARNIELI Jr., P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M.L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; MACHADO, L.M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R. C.; CARVALHO, V. A.; MONTEBELLO, L.; WADA, M.; KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in northeastern Brazil. **Virus Research**. 2006, (in press).

DANTAS JUNIOR, J. V.; KIMURA, L. M. S.; FERREIRA, M. S. R.; FIALHO, A. M.; ALMEIDA, M. M. S.; GRÉGIO, C. R. V.; ROMIJN, P. C.; LEITE, J. P. G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n.3, p. 398-400, 2004.

DAVID, D; YAKOBSON, B.; SMITH, J. S.; STRAM, Y. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other middle and near-eastern countries. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 2, p. 755-762, 2000.

De OLIVEIRA, A. N.; ANDRADE, M. C. R.; SILVA, M. V.; MOURA, W. C.; CONTREIRAS, E. C. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, n.1, p. 83-88, 2000.

DIETZSCHOLD, B.; WIKTOR, T. J.; TROJANOWSKI, J. Q.; MACFARLAN, R. I.; WUNNER, W. H.; ANJEL, M. J. T.; KOPROWSKI, H. Differences in cell to cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. **Journal of Virology**. v. 56, n. 1, p. 12-18, 1985.

DIETZSCHOLD, B.; WANG, H.; RUPRECHT, C. E.; CELIS, E.; TOLLIS, M.; ERTL, HILDEGUND, KATZ, E. H.; KOPROWSKI, H. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 84, n. 24, p. 9165-9169, 1987.

FAVORETTO, S. R.; *et al.* Caracterização de variantes no Brasil e países vizinhos. In: ANAIS SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Parlamento Latino Americano, 2000. P. 22.

FEITAL, A. S. S.; CONFALONIERI, V. E. C. Estudo epidemiológico da Raiva bovina no Estado do Rio de Janeiro (1980-1992). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 5, n.1, p. 21-27, 1998.

FEKADU, M.; SUMMER, J. W.; SHADDOCK, J. H.; SANDERLIN, D. W.; BAER, G. M. Sickness and recovery of dogs challenged with a street rabies virus after vaccination with a vaccinia virus recombinant expressing rabies virus N protein. **Journal of Virology**. v. 66, n. 5, p. 2601-2604, 1992.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C. Genealogia e o processo de coalescência. In: HEINEMANN, M. B. **Análise do polimorfismo do gene N de amostras de vírus da raiva isoladas no estado de São Paulo**. 2000. 56 f. Teses (Doutorado em Virologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.

FRASER, G. C.; HOOPER, P. T.; LUNT, R. A.; GOULD, A. R.; GLEESON, L. J.; HYATT, A. D.; RUSSEL, G. M.; KATTENBELTE, J. A. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. **Emerging Infectious Diseases**. v. 2, n.4, p. 327-331, 1996.

GOMES, M. N.; UIEDA, W. Abrigos diurnos, composição de colônias, dimorfismo sexual e reprodução do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy) (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 21, n. 3, p. 629-938, 2004.

GOULD, A. R.; HYATT, A. D.; LUNT, R.; KATTENBELT, J. A.; HENSGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S.D. Characterisation of a novel *Lyssavirus* isolated from *Pteropid* bats in Australia. **Virus Research**. v. 54, n. 2, p. 165-187, 1998.

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

HEINEMANN, M. B.; MATIOLI, F. M. C. F.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H.; MADEIRA, A. M. B. N.; RICHTZENHAIN, L. J. Genealogical analyses of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiology Infection**. v. 128, n. 3, p. 503-511, 2002.

HEMACHUDHA, T; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C. E. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **The Lancet Neurology**. v. 1, n. 2, p. 101-109, 2002.

HEATON, P. R.; JOHNSTONE, P.; McELHINNEY, L. M.; COWLEY, R.; O'SULLIVAN, E.; WHITBY, J. E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n. 11, p. 2762-2766, 1997.

ITO, M.; ARAI, Y. A.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampires bats. **Virology**. v. 284, n. 2, p 214-222, 2001.

JOHNSON, N.; LETSHWENYO, M.; BAIPOLEDI, E. K.; THOBOKWE, G.; FOOKS, A. R. Molecular epidemiology of rabies in Botswana: a comparison between antibody typing and nucleotide sequence phylogeny. **Veterinary Microbiology**. v. 101, n. 1, p. 31-38, 2004.

KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMOKE, R.; TIRAWATNPONG, S.; PANPANICH, T.; HEMACHUDHA, T. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. **Journal of Infectious Diseases**. v. 167, n. 1, p. 207-210, 1993.

KIMURA, L. M. S.; LIMA, J. G. P.; SILVA, J. A. C. Diagnóstico laboratorial da Raiva no Estado do Rio de Janeiro, no período de 1978 à 1987. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA. São Lourenço, 1988. **Anais...** Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Virologia, 1988. p. 129.

KIMURA, L. M. S.; ROMJN, P. C.; SILVA, R. C. F. Laboratorial diagnosis of rabies in the State of Rio de Janeiro, carried out by the period of 1988 to 1997. In: IX ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA. São Lourenço, 1998. **Anais...** Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Virologia, 1998. p. 60.

KIMURA, L.M.S. **Estudo comparativo da localização do vírus da Raiva no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados**. 2000. 117 f. dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro.

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

KISSLING, R. E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. **Procedures Society Experimental Biology Medicini**, v. 98, n. 2, p. 223-225, 1958.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E. M. S.; SÂMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Molecular

epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **Journal of veterinary Medical Science**. v. 67, n. 7, p. 647-652. 2005.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4^a ed., Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 6, p. 80-86.

KRAUSE, R.; BAGO, Z.; FERNANDEZ, S. R. F.; LOITSCH, A.; ALLERBERGER, F.; KAUFMANN, P.; SMOLLE, K. H.; BRUNNER, G.; KREJS, G. Travel-associated rabies in Austrian man. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 5, p. 719-721, 2005.

KUSMIN, I. V.; HUGHES, G. J.; BOTVINKIN, A. D.; ORCIARI, L. A.; RUPPRECHT, C. E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the *Lyssavirus* genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. **Virus Research**. v. 111, n. 1, p. 28- 43, 2005.

LOZA-RUBIO, E.; SETIÉN, A. A.; BAHLOUL, C.; BROCHIER, B.; PASTORET, P. P.; TORDO, N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. **Archives of Medical Research**. v. 30, n. 2, p. 144-149, 1999.

MARCOVISTZ, R.; ROMIJN, P. C.; ZANETTI, C. R. Raiva. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 1^o ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2005. cap. 152, p. 1783-1794.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. 1^o ed., Ribeirão Preto: Ed Holos, 2004. cap. 15, p. 153-161.

MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. Laboratory techniques in rabies. 4^a ed. Genebra : World Health Organization, 1996.

MATTOS C. A.; MATTOS, C.C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: FIELDS, B. N. **Virology**. 4th. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2001. 1245 p.

MURPHY, F. A. Morphology and Morphogenesis. In: BAER, G. M. **The natural history of Rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 33-61.

OLIVEIRA, R.; TAKAOKA, N.; BRANDAO, P.; CARNIELI Jr, P.; MACEDO, C.; CASTILHO, J.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Postmortem confirmation of human rabies source. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, n. 5, p. 867-868, 2006.

PASSOS, E.C.; CARRIERI, M. L.; DAINOVSKAS, E.; CÂMARA, M.; SILVA, M. M. S. Isolation of rabies virus from an insectivorous bat, *Nyctinomops macrotis*, in southeast Brazil. **Revista Saúde Publica**. v. 32, n. 1 p. 74-76, 1998.

REAL, L. A.; HENDERSON, J. C.; BIEK R.; SANAMAN, J.; JACK, T. L.; CHILDS, J. E.; STAHL. E.; WALLER, L.; TINLINE, R.; DAVIS, S. N. Unifying the spatial population dynamics and molecular evolution of epidemic rabies virus. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. v. 102, n. 34, p. 12107-12111, 2005.

ROMINJN, P.C.; HEIDE, R. V. D.; CATTANEO, C. A. M.; SILVA, R. C. E.; VAN DER POEL, W. H. M. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 69, n. 1, p. 81-89, 2003.

ROMINJN, P.C.; KIMURA, L. M. S. Alerta sobre a expansão da Raiva no Estado do Rio de Janeiro. In: 24^a CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Goiania, 1996. **Anais...** Goias: , 1996, p. 125.

ROSE, J.K.; WHITT, M. A. In FIELDS, Bernie. **Virology**. 4th. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2001. 1221-1222 p.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR as a alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and cellular Probes**. v. 5, n. 3, p. 229-240, 1991.

SALLUM, P. C.; ALMEIDA, M. F.; MASSAD, E. Rabies seroprevalence of street dogs from São Paulo city, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 44, n. 3-4, p. 131-139, 2000.

SCHAEFER, R.; BATISTA, H. B. R.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A. M.; ROEHE, P. M. Studies on antigenic and genomic properties of brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology**. v. 107, n. 3-4, p. 161-170, 2005.

SCHNEIDER, L. G.; DIRINGER, H. Structure and molecular biology of rabies virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 75, p. 153-180, 1976.

SILVA, L. H. CUNHA, E. M. S.; PEDRO, W. A.; CARDOSO, T. C.; SOUZA, M. C. C.; FERRARI, C. I. L. Isolation of rabies virus in *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae) in Sao Paulo State, Brazil. **Revista Saúde Pública**. v. 33, n. 6, p. 626-628, 1999.

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

SOARES, R.M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S. M.; HEINEMANN, M. B.; CORTEZ, A.; ALVES, L.M.; MEYER, A. D.; ITO, F. H.; RICHTZENHAIN, L. J. A heminested polymerase chain reaction for the detection of brazilian rabies isolates from vampires bat and hebivores. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 1, p. 109-111, 2002.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 1-29.

TIERKEL, E. S.; ATANASIU, P. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological tests. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4^a ed., Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 4, p. 55-65.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4^a ed., Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 3, p. 28-51.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of rabies genome: segmented homology with VSV. **Nucleic Acids Research**. v. 14, n. 6, p. 2671-2683, 1986.

VELASCO-VILLA, A.; ORCIARI, L. A.; ISLAS, V. J.; SIERRA, M. G.; MEDINA, I. P.; FLISSER, A.; SOUZA, V.; CASTILLO, A.; FRANKA, R.; MANE, M. E.; GONZALES, I. S.; RUPPRECHT, C. E. Molecular diversity of rabies virus associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 5, p. 1697-1710, 2006.

WEBSTER, L. T.; DAWSON, J. K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: Fields, D. M., Knipe, P. M. **Virology**. 3^o ed., Philadelphia: Lippincott Raven, 1996. p. 1121-1159.

WHITBY, J. E.; HEATON, P. R.; WHITBY, H. E.; O'SULLIVAN, E.; JOHNSTONE, E. Rapid detection of rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme linked immunosorbent assay. **Journal of Virological methods**. v. 69, n. 1, 2, p. 63-72, 1997.

WIKTOR, T. J.; CLARK, H. F. Growth of rabies virus infection of cell culture. In: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**. New York: Academic Press, 1975. v. 1, p. 155-179.

Wunner, W. H. Rabies in the Americas. **Virus Research**. v. 111, n. 1, p. 1-4, 2005.

ANEXO I

Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection

Publicado na Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.56, n. 3, 2004.

Communication

[Comunicação]

Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection

[Protocolo de reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa para a detecção de vírus da raiva]

J.V. Dantas Junior¹, L.M.S. Kimura², M.S.R. Ferreira¹, A.M. Fialho¹, M.M.S. Almeida¹, C.R.V. Grégio¹, P.C. Romijn², J.P.G. Leite^{1*}

¹Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365
21045-900 - Rio de Janeiro, RJ
²Pesagro-Rio

Rabies has been reported since antiquity and its economical importance is related to its occurrence in domestic animals, which are source of food. Rabies in herbivorous animals, mainly in cattle, transmitted by bats, represents an important limitation to the development of animal husbandry in Latin America (Constantine, 2003; Belloto, 2001).

The comparison between sequences and segments of different lyssaviruses and among samples of the Pasteur Virus strain (PVS) enabled the identification of preserved regions inside of the *Lyssavirus* genome, allowing the design of primers able to amplify the viral nucleoprotein, glycoprotein and the pseudogene (Sacramento et al., 1991; Botvinkin et al., 2003).

Based on those acquired knowledge, protocols for lyssaviruses identification in clinical specimens were developed (Sacramento et al., 1991; Botvinkin et al., 2003). Furthermore, phylogenetic analysis of those viruses was performed after amplicons sequencing (Ito et al., 2001; Botvinkin et al., 2003).

The goal of this study was to establish a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay to identify *Lyssavirus* genus in clinical specimens from different origins, by using primers designed in the nucleoprotein region.

A total of 50 samples of encephalic tissue from animals infected with the rabies virus were used: 44 bovines, 5 equines and 1 chiroptera. Those samples were received from several municipalities of the State of Rio de Janeiro, between January 1999 and June 2001.

The fluorescent-antibody test (FAT) was carried out according to Meslin et al. (1996). Briefly, the imprint of the fragments were incubated with

polyclonal anti-rabies fluorescein-labeled immune globulins (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS / Fiocruz) and visualized under an immunofluorescent microscope (Zeiss) afterwards.

The intra-cerebral mouse inoculation test (MIT) was conducted according to Meslin et al. (1996). The encephalic tissues were triturated in a mortar, diluted to 10% in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, containing penicillin 50IU – streptomycin 0.02mg/ml and clarified by centrifugation at 900x g for five minutes. The supernatant was collected and 0.03ml of each sample was used to inoculate 21 day-old albino mice by intra-cerebral route. PBS pH 7.2 was used for inoculation as negative control. The inoculated animals were observed daily up to 30 days.

The viral RNA was extracted by using TRIzolTM according to the manufacture's recommendations in 10% of clarified supernatant. The RT-PCR assay was performed as described by Heaton et al. (1997) with modifications. Briefly, 10µl of the extracted RNA was denatured at 75°C for 10 minutes, cooled on ice, reverse-transcribed in 40µl of the RT mix: 2µl of 10µM primer JW12 (5' ATGTAACACCC/TCTACAATTG 3' [nt 55-73]), 200U of SuperScript II Reverse Transcriptase, 1mM of each dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 10U of RNAsin, 5µl of 5X PCR buffer, 1mM dithiothreitol and 1,5µl of 50mM magnesium chloride¹. The RT mix was incubated for 60 minutes in water bath at 42°C, boiled for five minutes, and then chilled on ice. Fifty microliters of the amplification mix (PCR) containing 1mM of each dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 2,5U of Taq-Platinum polymerase, 5µl of 10X PCR buffer, 1,5µl of 50mM magnesium chloride and 4µl of a cocktail of 10µM of the following primers: JW12, JW6 (nt 660-641)(5'

CAATTCGCACACATTTTGTG 3' / 5'
CAGTTAGCGACATCTTATG 3'/ 5'
CAGTTGGCACACATCTTGTG 3')ⁱⁱ,
corresponding to the sequencing of Duvenhage virus, EBLs 1 and 2, and Mokola virus, respectively. After denaturation at 94°C for two minutes, the PCR assay consisted of: 40 cycles (94°C/30 seconds, 45°C/30seconds, 72°C/60seconds), linked by a final extension cycle at 72°C/7minutes. The challenger virus strain (CVS), kindly provided by the INCQS / Fiocruz, Brazil and distilled milli-Q water were used as positive and negative controls, respectively, during all procedures. In order to avoid false-positive results, precautions of manipulation were carried out during the amplification step, as recommended by Kwok and Higuchi (1989).

The RT-PCR amplicons were resolved by electrophoresis on 1.5% agarose gels¹, stained with ethidium bromide (0.5µg/ml)², visualized and photographed by using a polaroid system gel Doc 1000². After electrophoresis, a specific 606bp amplicon was observed in all 50 samples analyzed, showing a 100% agreement with the MIT, including one false-negative sample by the FAT from an equine.

The present RT-PCR assay can provide a same day laboratory diagnosis for rabies virus by using different animal species. The results obtained highlighted the potential of the RT-PCR assay as rapid, specific and sensitive tool for the diagnostic investigation of rabies viruses. Despite the excellent results obtained by the MIT and FAT, the RT-PCR has the ability to make a more rapid and definitive diagnosis allowing more directed intervention strategy. Furthermore, RT-PCR assay is useful for the laboratorial diagnosis of rabies viruses from brain tissues from different animal species from different geographic regions. The use of specific primers for the nucleoprotein region of rabies virus and rabies-related viruses increases substantially the possibility of success to detect rabies infection (Heaton et al., 1997).

The future of the amplification techniques lays in their capacity to surpass the sensitivity of the *post-*

mortem diagnostic techniques or in their suitability in diagnosis the infection from live animal secretions. However, diagnostic laboratories are still performing time-consuming and less sensitive techniques (Sacramento et al., 1991). For Kamolvarin et al. (1993) the RT-PCR technique for rabies diagnosis shows important additional advantages compared to the FAT and the MIT: a) it should be used in clinical specimens in bad conditions of conservation (material in decomposition) that often occurs in localities with a tropical climate such as Brazil; b) it is faster than the MIT which often requires an interval of 10 to 30 days for a conclusive result. Our data corroborate with those findings when one clinical specimen (equine 22/06/01) was false-negative by the FAT, but it was identified as positive by the RT-PCR and by the MIT as well, however only 21 days after animal inoculation.

Another importance in routinely using molecular techniques for rabies virus detection is that they allow the implementation of prophylactic and control measures. It also plays an important role in the disease epidemiology once it helps to identify the reservoir in the routine diagnosis (Ito et al., 2001, 2003).

Recent findings of new bat lyssaviruses throughout the world are showing the importance of molecular methodologies used for diagnosis and for characterization of *Lyssavirus* genus as well (Botvinkin et al., 2003). Our study, in agreement with previous studies performed in Brazil, shows valuable contribution of molecular analysis methods for rabies virus diagnosis, justifying the implementation of a RT-PCR as a methodology in routine rabies diagnosis in Brazil. It is concluded that the methodology implemented in this study could be successfully used in the routine diagnosis because it was rapid, specific and showed a high sensitivity, contributing positively for the laboratory diagnosis of rabies virus in tropical countries.

Keywords: rabies virus, reverse transcription-polymerase chain reaction, diagnosis

RESUMO

Este estudo teve por objetivo implantar um protocolo de amplificação genômica, precedida de transcrição reversa (RT-PCR) para o gene da nucleoproteína do vírus da raiva, para a utilização dessa metodologia em laboratórios onde são realizadas investigações para a detecção do vírus rábico. Foram utilizadas 50 amostras de tecido encefálico de animais (44 bovinos, 5 equinos e 1 quiróptero) oriundos do Estado do Rio de Janeiro, positivos por imunofluorescência direta e/ou prova biológica para o vírus rábico. A extração do RNA foi feita a partir da suspensão a 10% em PBS pH7,2 do tecido encefálico utilizando-se a metodologia de TRIzolTM (Life Technologies) e o protocolo de RT-PCR descrito por Heaton et al. (1997), incluindo algumas modificações. Dentre as 50 amostras analisadas, 50 foram positivas pela prova biológica e pela RT-PCR e destas, 49 foram positivas pela imunofluorescência direta. Estes resultados demonstram ser este protocolo de RT-PCR uma

metodologia sensível, específica, rápida e extremamente valiosa, podendo ser utilizada como rotina em laboratórios que trabalham no diagnóstico de vírus rábico.

Palavras-chave: vírus da raiva, transcrição reversa/reação em cadeia pela polimerase, diagnóstico

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by: PESAGRO, FAPERJ (E26/170.169/2002), IOC and INCQS/Fiocruz, and CNPq. The authors wish to acknowledge Dr. Flavia Barreto for the critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- BELOTTO, A.J. Raiva transmitida por morcegos nas Américas: impacto na saúde pública e na produção. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL MORCEGOS, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Memorial da América Latina, 2001. p.25.
- BOTVINKIN, A.D.; POLESCHUK, E.M.; KUZMIN, I.V. et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.*, v.9, p.1623-1625, 2003.
- CONSTANTINE, D. G. Geographic translocation of bats: know and potential problems. *Emerg. Infect. Dis.*, v.9, p.17-21, 2003.
- HEATON, P.R.; JOHNSTONE, P.; McELHINNEY, L.M. et al. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.2762-2766, 1997.
- ITO, M.; ARAI, T.A.; ITOU, T. et al. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: Identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology*, v.284, p.214-222, 2001.
- ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y. et al. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Virol.*, v.26, p.317-330, 2003.
- KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMOKE, R. et al. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Infect. Dis.*, v.167, p.207-210, 1993.
- KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, v.339, p.237-238, 1989.
- MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. Laboratory techniques in rabies. 4.ed. Geneva: WHO, 1996. 476p.
- SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Molec. Cell. Probes*, v.5, p.229-240, 1991.

ANEXO II

Molecular Analysis of Rabies Virus Circulating in Rio de Janeiro State, Brazil, from 1999 to 2004.

Submetido

Molecular Analysis of Rabies Virus Circulating in Rio de Janeiro State, Brazil, from 1999 to 2004.

Dantas Junior, Joeler Vargas^{1,2}, *Kimura*, Leda Maria Silva^{2,3}, *Heinemann*, Marcos Bryan¹, *Lopes*, Aldair Souza³, *Romijn*, Phyllis Catharina³, *Leite*, José Paulo Gagliardi.^{1*}

¹Laboratório de Virologia Comparada, Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

²Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária INCQS / FIOCRUZ

³Laboratório de Biologia Animal – Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro/PESAGRO-RIO.

* Corresponding author: jpgleite@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT

Thirty-three rabies virus samples isolated from cattle, horses and bats from different regions of Rio de Janeiro State in the southeastern region of Brazil, were analyzed on the basis of direct sequencing of 514 pb amplicons from the nucleoprotein codifying region. The sequences were verified regarding their genetic relationship. No significant genetic differences were observed between samples isolated from different hosts and geographic regions over the last six years. The results indicated that the variability observed probably occurred due to synonymous modifications. This suggests the importance of continued efforts in gene diversity monitoring in rabies virus field samples, since genetic modifications could eventually lead to vaccine failure.

rabies virus / RT-PCR / sequencing / filogenetic analysis

INTRODUCTION

Rabies epidemiology is described as occurring in cycles, one among wild animals, which occasionally extrapolates to the domestic environment, usually rural, and an urban cycle. These cycles can interweave, affecting several mammalian species [15]. A geographic overlap of the two principal rabies cycles occurs in Latin America: (a) the terrestrial cycle, with the dog as the principal transmitter and most frequent cause of rabies transmission to humans; and (b) the aerial cycle, where the haematophagous bat *Desmodus rotundus* is the principal representative, usually transmitting rabies among domesticated herbivores [13].

The number of human and canine rabies cases diagnosed in the Americas has suffered a reduction, although disease transmission from wild reservoirs to domesticated animals and humans continues to expand, and has gained the attention of health and sanitary authorities [18]. Although rabies transmission through canine biting still remains a serious public health issue in the Americas, as in other continents, virus transmission by certain other wild species is a potential risk in several countries of the American continent and bats are the wild mammals most commonly involved in rabies transmission to humans, with the haematophagous bat *Desmodus rotundus* being the most important species in Latin America [4].

Considering the fact that reports of cases of rabies transmission by bats has increased over the last few years, molecular studies of rabies virus samples identified in diseased herbivores, could uncover knowledge which would help to identify the best strategies to control this disease and the development of more effective preventative methods [5, 7, 16].

The potential for rapid rabies virus diagnosis by amplification reactions (RT-PCR) at the nucleoprotein region, in patients in whom conventional methods fail, i.e. direct immunofluorescence and biological test, has been demonstrated. Additionally, the authors presented the potential of this method, when associated with genetic analysis, in suggesting the possible transmitter animal and the probable geographic origin of the sample by the similarity between the samples under study, when isolated from the same source [17].

The present work carried out genetic analysis of part of the gene segment relative to the nucleoprotein of 33 rabies virus samples isolated from brain tissue of animals, collected in the period of 1999 to 2004, from different geographic regions of the Rio de Janeiro State.

MATERIAL AND METHODS

Standard virus and samples: The National Institute of Health Quality Control (INCQS/Fiocruz) provided the laboratory virus, challenge virus standard (CVS), used as a control sample. Thirty-three samples of brain material infected with virus, being: 27 from cattle, 5 from horses and 1 from bat, which were sent to the Animal Biology Laboratory (LBA) of the Agropecuary Research Company of Rio de Janeiro State (PESAGRO – RIO), originating from different municipalities of Rio de Janeiro State were studied. All the samples were positive for rabies virus by the direct immunofluorescence and biological tests [14].

In addition to the nucleotide sequences identified in this work, some sequences from the GenBank were used in the genetic analysis (Table 1).

Table 1. Nucleotide sequences used in the genetic analysis.

Species	Origin	Identification number
<i>Desmodus rotundus</i>	Brazil	Af357285
<i>Desmodus rotundus</i>	Brazil	Ab201805
<i>Desmodus rotundus</i>	Brazil	Ab083814
<i>Desmodus rotundus</i>	Brazil	Ab083807
<i>Eptesicus furinalis</i>	Brazil	Ab201812
<i>Eptesicus furinalis</i>	Brazil	Ab201813
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Brazil	Ab201807
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Brazil	Ab201806
<i>Molossus molossus</i>	Brazil	Ab201816
<i>Molossus molossus</i>	Brazil	Ab201815
<i>Molossus abrausgi</i>	Brazil	Ab201818
PV	France	X03673
CVS	United Kingdom	Ay102992
SAD	Germany	M31046

RNA extraction and RT-PCR: Viral RNA extraction was performed directly on a suspension of 10% brain tissue in PBS (0.01M NaHPO₄, 0.15M NaCl, pH 7.2) by the TRIzol™ method (LifeTechnologies), according to the protocol described by the manufacturer. RT-PCR was realized with the following modifications [9]: 5 µL of extracted RNA was denatured at 75°C for 10 minutes, chilled on ice for 2 min and added to 20 µL of solution for cDNA synthesis (2.0 µL of buffer 10 X, 0.12 µL of RNAsin 40U/ µL). PCR was realized at a final mixture volume of 50 µL (1.5 µL of magnesium chlorate 50mM, 0.25 µL of Taq-Platinum polymerase 200U/ µL). After denaturation at 95°C for 2 min, 40 cycles of 94°C for 45 s, 55 °C for 60 s and 72 °C for 90 s were realized. After cycle completion, a final extension of 72°C for 600 s was programmed.

CVS virus and Ultra Pure DNase, RNase free Gibco™ distilled water were used as positive and negative controls, respectively. To avoid false positive results, considerations regarding manipulation during the amplification stages were implemented [12]. The amplified product containing 804 pb, was processed by electrophoresis in 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5µg/mL) and analyzed in an image processor, UVP-Bioimaging Systems, model Pro-Series Captures Kit MV.

Direct sequencing and genetic analysis: The PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Inc. Valencia CA. USA) and posteriorly sequenced with the same pair of primers used in the RT-PCR reactions. Sequencing was carried out by the dideoxynucleotide chain termination method using BigDye™ in an ABI Prism 3100

Automatic Sequencer (Applied Biosystems). The products were purified by precipitation in ethanol and resuspended in formamide. The sequences obtained from the gene were aligned and edited in a BioEdit Sequence Alignment Editor (version 6.0.5.2) and submitted for analysis using the software MEGA 3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis – version 3.1). Phylogenetic reconstruction was achieved through the neighbor-joining algorithm, based on the method of Kimura 2 parameter distance estimates. Bootstrap analysis was realized with 1000 repetitions.

RESULTS

All the samples analyzed were positive by direct immunofluorescence, biological test and RT-PCR. The sequences obtained from the PCR amplified fragments of the N gene, aligned and edited in a BioEdit Sequence Alignment Editor (version 6.0.5.2), generated amplicons with 514 base pairs of the nucleoprotein codifying region, and produced five separate clusters or groups within genotype 1 (Fig. 1). The “*Desmodus* variant” produced two distinct groups, called I and II, with samples from several geographic regions. The results of the protein analysis (data not shown) indicated that no significant differences exist between groups I and II.

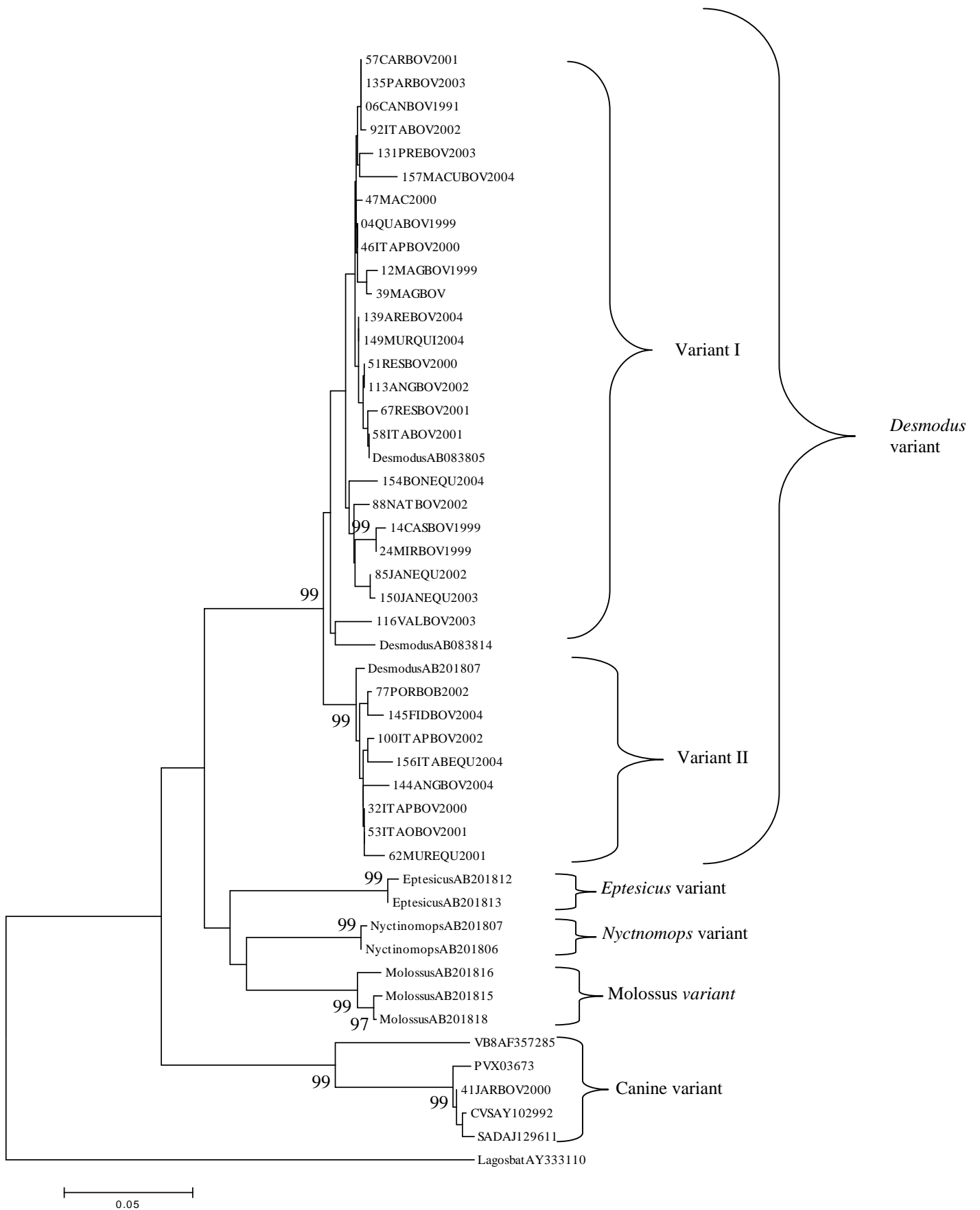


Fig. 2. Dendrogram presenting similarity between the studied rabies virus samples, using nucleotide sequences for the nucleoprotein gene. The tree was reconstructed by the neighbor-joining algorithm using the Kimura 2 parameter evolution model. The numbers represent the bootstrap values with 1000 replicas.

DISCUSSION

The genetic variability of *Lyssavirus* populations causing encephalitis in animal species had already been verified serologically and empirically, even before virology was established as a science, with different “cycles” of rabies defined according to species by the expression of the infection (Bahoul *et al.*, 1998).

Rabies in Brazil has been verified as occurring in two ecological cycles, one urban and the other wild. Rabies cases in the urban environment have been less frequent, due to responsible ownership, cat and dog population control and vaccination campaigning, principally in large Brazilian cities such as São Paulo and, Rio de Janeiro. In contrast, rabies of wild origin has been more evident and many cases involving bats have been reported (Heinemann *et al.*, 2002; Belloto *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005).

Deforest and bush clearing, leading to environmental disequilibrium and the increased contact of haematophagous bats with humans and cattle, probably caused the recent episodes of rabies in humans by lineage strains identified as originating from bats of the *Desmodus rotundus* species, in Pará and Maranhão states in 2004 and 2005, respectively. Thus, this strain, previously identified as the cause of economic losses in cattle of around 15 million US dollars per year (Anonymous, 2005; Bordignon *et al.*, 2005), has come to represent a serious public health problem.

The results of the present study suggest that the rabies virus populations in current circulation in Rio de Janeiro State are related to samples originating from *Desmodus rotundus*. Other authors, working with samples isolated from the brains of herbivores, also observed that the virus strain identified in these animals originated from the bat *Desmodus rotundus*, corroborating the present results (Romijn *et al.*, 2003; Bordignon *et al.*, 2005).

Some insectivore bats (*Mollosus* sp. and *Eumops* sp.) were also found infected with a variant strain of rabies virus genetically similar to that found in the *Desmodus rotundus* bat species, suggesting that transmission of this variant occurs between these species (Kobayashi *et al.*, 2005).

Studies affirmed that the N gene is well conserved, making its use convenient for evolutive studies (Bourhy *et al.*, 1992). Others described the N gene as a very well conserved region, being independent of the historic passage of the virus (Arai *et al.*, 1997). In 2000, David *et al.* demonstrated the use of the N protein to determine the genetic origin of viral RNA sequences. The gene segment that gives rise to the nucleoprotein (N protein) was presented as the most stable of the rabies virus particle, which may justify the greater homogeneity of the protein it produces (David *et al.*, 2000).

Selection of virus populations principally occurs by variations in the external proteins, permitting the rejection or fusion of a specific viral particle to the cell. Any mutation in these proteins, together with cell variation in the infection environment, alters the successful fusion of the virus population, the subsequent infection and disease outcome.

In this study, one of the clusters (PV, CVS, SAD B19, 41) was observed significantly separated from the other samples. This is interesting, because sample 41 is an isolate from bovine known to have been bitten by an haematophagous bat, similar to an haematophagous bat sample (AF357285) who is grouped with fixed virus samples, all of these later being canine variants (Heinemann *et al.*, 2002).

Temporal and geographic variations were not observed, this suggesting that the virus present in the State of Rio de Janeiro has not suffered significant variation over time nor in relation to geographic region. The hydrographic basins are an important factor for the dispersion of virus populations between different geographic regions crossed by the same river (Heinemann *et al.*, 2002; Romijn *et al.*, 2003). The results of this work suggest that the samples could have been dispersed in this manner, since they mainly came from one single large hydrographic basin, the Paraíba do Sul river, which crosses Rio de Janeiro State from North to South.

Molecular comparisons (data not shown) with the external groups and groups I and II of the desmodus variant showed that no significant differences of nucleotide substitution exist between these groups. The results indicate that the variability observed probably occurred due to synonymous modifications, no evidence existing of an accumulative effect of nonsynonymous modifications and eventual epitope alterations (Kissi *et al.*, 1995; Heinemann *et al.*, 2002).

Final analysis of the data indicates that continuous efforts in the monitoring of gene diversity in rabies virus field samples is important, since genetic alterations in this material could produce modifications in the protein responsible for immunogenic response, leading to an eventual vaccine failure.

REFERENCES

- [1] Anonymous, Rabies, human, vampires bat – Brazil (Maranhão), in: International Society for Infectious Diseases. [on line] (2006)
<http://www.promedmail.org/pls/promed>. [consulted 09 jan. 2006].
- [2] Arai, Y.t.; Yamada, K.; Kameoka, Y.; Horimoto, T.; Yamamoto, K.; Yabe, S.; Nakayama, M.; Tashiro, M. Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. *Arch. Virol.* 142 (1997) 1787-1796.
- [3] Bahloul, C.; Jacob, Y.; Tordo, N.; Perrin, P. DNA-base immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine.* 16 (1998) 417-425.
- [4] Belloto, A.; Leanes, L.F.; Schneider, M. C.; Tamayo, H.; Corrêa, E. Overview of rabies in the Americas. *Virus Res.* 111 (2005) 5-12.
- [5] Bordignon, J.; Brasil-dos-Anjos, G.; Bueno, C.R.; Salvatiera-Oporto, J.; Dávila, A.M.R.; Grisard, E.C.; Zanetti, C.R. Detection and characterization of rabies virus in southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. *Arch Virol.* 150 (2005) 695-708.
- [6] Bourhy, H.; Kissi, B.; Lafon, M.; Sacramento, D.; Tordo, N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 2419-2426.
- [7] Dantas Junior, J.V.; Kimura, L.M.S.; Ferreira, M.S.R.; Fialho, A.M.; Almeida, M.M.S.; Grégio, C.R.V.; Romijn, P.C.; Leite, J.P.G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, (2004) 398-400.
- [8] David, D; Yakobson B, Smith JS, Stram Y. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other middle and near-eastern countries. *J. Clin. Microbiol.* 38, (2000) 755-762.
- [9] Heinemann, M.B.; Fernades-Matioli, F.M.C.; Cortez A.; Soares, R.M.; Sakamoto, S.M.; Bernardi, F.; Ito, F.H.; Madeira, A.M.B.N.; Richtzenhain, L.J. Genealogical analyses of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. *Epidemiol. Infect.* 128 (2002) 503-511.
- [10] Kissi, B.; Tordo, N.; Bourhy, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology.* 209 (1995) 526-537.
- [11] Kobayashi, Y.; Sato, G.; Shoji, Y.; Sato, T.; Itou, T.; Cunha, E.M.S.; Sâmara, S.I.; Carvalho, A.A.B.; Nociti, D.P.; Ito, F.H.; Sakai, T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J. vet. Med. Sci.* 67 (2005) 647-652.
- [12] Kwok, S.; Higuchi, R. Avoiding false positive with PCR. *Nature.* 339 (1989) 237-238.
- [13] Loza-Rubio, E.; Aguilar-Setién, A.; Bahloul, C.; Brochier, B.; Pastoret, P.P.; Tordo, N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. *Arch. Med. Res.* 30 (1999) 144-149.

[14] Koprowski, H. The mouse inoculation test. In: Meslin, F. X.; Kaplan, M.M.; Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory techniques in rabies*, World Health Organization, Geneva, 1996, pp. 80-86.

[15] Marcovistz, R.; Romijn, P.C.; Zanetti, C.R. Raiva. In: Coura, J.R. (Ed.), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005, pp. 1783-1794.

[16] Romijn, P.C.; Heide, R.V.D.; Cattaneo, C.A.M.; Silva, R.C.F.; Van Der Poel, W.H.M. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69 (2003) 81-86, 2003.

[17] Smith, J.; McElhinney, L.; Parsons, G.; Brink, N.; Doherty, T.; Agranoff, D.; Miranda, M.E.; Fooks, A.R. Case Report: rapid ante-mortem diagnosis of a human case of rabies imported into the UK from the Philippines. *J. Med. Virol.* 69, (2003) 150-155.

[18] Wunner, W.H. Rabies in the Americas. *Virus Res.* 111, (2005) 1-4.
