

RAFAEL DE NOVAES OLIVEIRA

Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína

São Paulo

2009

RAFAEL DE NOVAES OLIVEIRA

Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2009

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA. Rafael de Novaes

Título: Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

*À minha mãe **Esther Novaes de Oliveira** e avó **Eunice Fraga de Novais** por tudo que fizeram e têm feito por mim.*

*Ao meu avô **João Moreira de Novais** (in memoriam) pelo exemplo de caráter e humildade.*

"A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado. A imaginação envolve o mundo."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Paulo Eduardo Brandão**, pela amizade e orientação.

A toda a minha família, principalmente meus pais **Esther de Novaes Oliveira**, **Vagner Morais de Oliveira**, minhas avós **Eunice Fraga de Novais** e **Gabriela Morais de Oliveira** e meus irmãos **Fernando de Novaes Oliveira**, **Mariana de Novaes Oliveira** e **Pedro de Novaes Oliveira**, pelo apoio e compreensão.

A minha namorada **Fabiana Schiavi Noda**, pelo companheirismo e paciência.

A grande amiga **Sibele Pinheiro de Souza**, pelas conversas, idéias e imprescindível ajuda em todas as etapas da minha dissertação.

Aos colegas e amigos do VPS, em especial **Carlos Augusto Scacchetti de Almeida**, **Nilton Fidalgo Peres**, **Vanessa Riesz Salgado** e **Renato A. Ogata**.

Ao Prof. Dr. **José Antonio Jerez**, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. **Dr. Silvio Arruda de Vasconcellos** por me orientar em meu primeiro estágio em 1998, despertando o meu interesse para a carreira de acadêmico e pesquisador

A todos os funcionários do **Instituto Pasteur**, em especial a: **Juliana Galera Castilho**, **Pedro Carnieli Junior**, **Carla Isabel Macedo Levi da Silveira**, **Ekatherina A. Durymanova Ono**, **Willian de Oliveira Fahl**, **Keila Iamamoto Nogi**, **Renata Spinelli Vaz Lobo**, **Samira Maria Achkar**, **Andréa de Cássia Rodrigues da Silva**, **Graciane Maria Medeiros Caporale**, **Luciana Botelho Chaves**, **Karin Corrêa Scheffer Ferreira**, **Karina Luiza Moreira**, **Andréa Barreto Martins de Castro**, **Vera Lúcia Galvão**, **Rosemary Gomes de Souza**, **Maria Aparecida da Silva** e **Zélia Maria Pinheiro Peixoto**.

Às Dras **Neide Takaoka**, **Ivanete Kotait** e **Maria Luiza Carrieri**, por disponibilizarem todas as condições necessárias para a realização do meu mestrado.

A minha psicóloga **Jeane Araújo Lobo** por me iniciar na longa jornada do autoconhecimento.

Ao **povo de Aruanda** por toda a força e proteção.

RESUMO

OLIVEIRA, R. N. **Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular de diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína.** [Rabies virus in insectivorous bats: implications in molecular epidemiology of the diversity of genes encoding nucleoprotein and glycoprotein]. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Com o controle da raiva nos cães do Estado de São Paulo nos últimos 20 anos, a raiva em animais silvestres, sobretudo nos quirópteros, assume crescente importância, visto que, atualmente, estes são os principais reservatórios para a raiva neste Estado. Apesar dos morcegos manterem ciclos epidemiológicos da raiva há centenas de anos, somente a partir da década de 50 a raiva em morcegos insetívoros foi reconhecida como um problema de saúde pública. Desde então foram feitos muitos avanços na compreensão da raiva nestes animais. Atualmente, o vírus da raiva (RABV) já foi detectado em 37 espécies de morcegos brasileiros, tendo sido determinadas quatro linhagens genéticas específicas associadas a quatro gênero/espécies destes morcegos, três destas exclusivas de morcegos insetívoros. Entretanto, apesar da importância da raiva em morcegos insetívoros, estudos voltados a um conhecimento mais amplo das implicações da diversidade de amostras de RABV detectadas nos mesmos aplicados à Epidemiologia Molecular são escassos. Assim, a presente investigação teve por objetivos estabelecer genealogias para amostras de RABV isoladas de diversas espécies de morcegos insetívoros do Estado de São Paulo a partir de seqüências parciais dos genes *N* (40 amostras) e *G* (45 amostras), avaliar a existência de linhagens gênero-específicas do RABV e determinar os marcadores moleculares para sua diferenciação. Foram encontradas linhagens específicas de RABV para os gêneros *Myotis*, *Eptesicus* e *Nyctinomops* e três prováveis linhagens circulantes nos gêneros *Tadarida*, *Histiotus* e *Lasiurus*. Além disso, esta pesquisa revelou marcadores moleculares de aminoácidos específicos para os gêneros *Myotis*, *Eptesicus* e *Nyctinomops*, contribuindo para um melhor entendimento da epidemiologia molecular da Raiva e da relação entre o RABV e gêneros diversos de quirópteros.

Palavras-chave: Raiva. Morcegos. Epidemiologia. Molecular. Genealogia.

ABSTRACT

OLIVEIRA, R. N. **Rabies virus in insectivorous bats: implications in molecular epidemiology of the diversity of genes encoding nucleoprotein and glycoprotein.** [Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular de diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína]. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As a result of the control of canine rabies in São Paulo State in the last 20 years, rabies in wild animals, mainly in bats, has assumed an increasing importance as the last are currently the most important rabies reservoirs in this State. Despite the fact that bats have maintained epidemiological cycles of rabies for centuries, only in the 50's rabies in insectivorous bats was recognized as a threat for Public Health and several advances have been achieved since then for the comprehension of rabies in these animals. Rabies virus (RABV) has already been detected in 37 species of Brazilian bats and four specific genetic lineages associated to four genera/ species of bats have been determined, three of these exclusive to insectivorous bats. Nonetheless, despite the importance of insectivorous bats rabies, studies on a more comprehensive knowledge on the implications of the diversity of RABV strains detected on these are scarce. Thus, the present investigation aimed to establish genealogies for RABV strains isolated from diverse species from insectivorous bats from São Paulo State based on partial *N* (40 strains) and *G* (45 strains) genes, assess the existence of genus-specific lineages of RABV and to determine molecular markers for its differentiation. Specific RABV lineages were found for the genera *Myotis*, *Eptesicus* and *Nyctinomops* and three other probable lineages circulating in the genera *Tadarida*, *Histiotus* and *Lasiurus* were found as well. Furthermore, this investigation revealed amino acids molecular markers for the genera *Myotis*, *Eptesicus* and *Nyctinomops*, contributing to a better understanding of rabies molecular epidemiology and the relationship amongst RABV and diverse genera of bats.

Key-words: Rabies. Bats. Epidemiology. Molecular. Genealogy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RNA	ácido ribonucleico
RABV	<i>Rabies virus</i>
DUVV	<i>Duvenhage virus</i>
EBLV-1	<i>European bat lyssavirus – 1</i>
EBLV-2	<i>European bat lyssavirus – 2</i>
ABLV	<i>Australian bat lyssavirus</i>
LBV	<i>Lagos bat vírus</i>
MOKV	<i>Mokola vírus</i>
AcM	Anticorpo monoclonal ou Anticorpos monoclonais
RT	Transcrição Reversa
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
WCBV	<i>West Caucasian bat vírus</i>
RNP	Ribonucleoproteína
N	Nucleoproteína do vírus da raiva
L	RNA
P	Fosfoproteína do vírus da raiva
G	Glicoproteína do vírus da raiva
RT	Transcrição reversa
M	Molar
M	Proteína M do vírus da raiva
mRNA	RNA mensageiro
Ψ	Pseudogene
pb	pares de bases
L	Proteína L do vírus da raiva
Le	Seqüência <i>leader</i>
Tr	Seqüência <i>trailer</i>
SNC	Sistema nervoso central
IFD	Imunofluorescência direta
CVS	Challenger Virus Standard
N2A	Neuroblastoma de camundonto
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
pmol	Picomoles
mM	Milimolar
U	unidade internacional
μL	Microlitro
RNAsin	Inibidor de RNase
H ₂ O	Água
cDNA	DNA complementar
TBE	Tampão Tris borato
ng	Nanograma
°C	graus Celsius
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
VSV	Vírus da estomatite vesicular
pH	Potencial hidrogeniônico
DNA	ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
Min	minuto de hora
%	Porcento
kDa	QuiloDalton
M	Molar
ng	nanogramas
mL	mililitro
μg	micrograma

pM
ORF

picomolar
open reading frame

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 AMOSTRA VIRAL DE REFERÊNCIA:	25
3.2 AMOSTRAS ESTUDADAS	25
3.3 IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA (IFD)	29
3.3.1 Diluição do conjugado:	29
3.4 ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR DE NEUROBLASTOMA MURINO (N2A)	29
3.5 INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS	29
3.6 TIPIFICAÇÃO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	30
3.7 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) VIRAIS	30
3.7.1 Extração de RNA	31
3.7.2 Síntese de DNA complementar (c-DNA) – Transcrição Reversa (RT)	31
3.8 SEQÜENCIAMENTO DE DNA	32
3.8.1 Purificação dos produtos de PCR	33
3.8.2 Reação de seqüenciamento de DNA	33
3.8.3 Edição de seqüências	34
3.9 ANÁLISE GENEALÓGICA	34
3.10 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS	35
3.11 ANÁLISES DE MUDANÇAS E MARCADORES MOLECULARES NAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS TRADUZIDAS A PARTIR DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA	35
4 RESULTADOS	36
4.1 TIPIFICAÇÃO ANTIGÊNICA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS DIRIGIDOS À NUCLEOPROTEÍNA VIRAL	36
4.2 RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) VIRAIS.	37
4.3 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	39
4.4 ANÁLISE GENEALÓGICA	42
4.4.1 Gene N	42
4.4.2 Gene G	45
4.5 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS	48
4.5.1 Gene N	48
4.5.2 Gene G	52
4.6 ANÁLISES DE MUDANÇAS E MARCADORES MOLECULARES NAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS TRADUZIDAS A PARTIR DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA.....	55
4.6.1 Gene N	56
4.6.2 Gene G	59
5 DISCUSSÃO	644

6 CONCLUSÕES	74
---------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose que afeta o sistema nervoso central, de evolução aguda e fatal, mantida em mamíferos e conhecida há milênios. Presente na América, Europa, África e Ásia, tem como agente etiológico um vírus RNA neurotrópico, pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (FAUQUET et al., 2005).

Os *Lyssavirus* são vírus envelopados, com o formato de “bala de revólver”, apresentando-se como sete genótipos, agrupados em dois filogrupos, genética e imunopatologicamente distintos (KAPLAN, 1996; BADRANE, TORDO, 2001). O filogrupo I inclui o vírus da raiva (RABV, genótipo 1), o vírus Duvenhage (DUVV, genótipo 4), o European bat lyssavirus tipos 1 e 2 (EBLV-1, genótipo 5 e EBLV-2, genótipo 6) e o Australian bat lyssavirus (ABLV, genótipo 7) e o filogrupo II inclui o Lagos bat virus (LBV, genótipo 2) e o vírus Mokola (MOKV, genótipo 3) (KUZMIN et al., 2003).

Além destes, já são conhecidos outros quatro vírus considerados prováveis genótipos de *Lyssavirus* relacionados ao vírus da raiva, todos eles isolados de morcegos: vírus *Aravan* e *Khujand* da Ásia Central e *Irkut* e *West Caucasian bat virus* da Europa Oriental (BOTVIRKIN, 2003; KUZMIN, 2003).

O vírus da raiva (RABV, genótipo 1) apresenta um genoma não-segmentado de RNA fita-simples com polaridade negativa, fazendo com que o RNA viral não seja infeccioso por não ser capaz de ser traduzido diretamente em proteínas. O genoma completo tem 11.932 nucleotídeos (nt) no vírus fixo Pasteur vírus (PV), os quais codificam as proteínas estruturais, *N*, *P*, *M*, *G* e *L*. Estes genes apresentam-se separados por quatro regiões intergênicas não codificantes (entre o final 5' de um gene e o início 3' do próximo gene), sendo compostas de 2 nt (N-P), 5 nt (P-M), 5 nt (P-G) e 423 nt (G-L) (WUNNER, 2007). Estas regiões têm importante papel na regulação da expressão gênica viral (FINKE et al., 2000).

Na família *Rhabdoviridae*, a longa região intergênica entre os genes *G* e *L*, está presente apenas no gênero *Lyssavirus*, sendo denominada de gene remanescente ou o pseudogene viral (Ψ) devido ao seu considerável tamanho e ausência de uma janela de leitura (ORF) detectável, (TORDO et al. 1986b). Esta região é a mais variável no genoma viral (SACRAMENTO et al., 1991).

Na porção 3' do genoma encontra-se uma seqüência de 58 nucleotídeos não-codificantes, conhecida como *leader* (Le). Logo em seguida encontram-se as seqüências que codificam para as cinco proteínas virais. No final do genoma, existe uma seqüência de 70 nucleotídeos na região 5' denominada *trailer* (Tr). (TORDO et al., 1986a,b). As seqüências Le e Tr apresentam papel chave nos processos de transcrição e replicação viral (WUNNER, 2007).

No envelope viral do RABV encontram-se espículas formadas por trímeros da glicoproteína viral (proteína G). Abaixo do envelope existe uma camada matriz, formada pelas proteínas M, que unem o envoltório viral à ribonucleoproteína viral (RNP). A RNP é formada pelo RNA viral, proteínas L, P e N, sendo que a matriz M em conjunto com a RNP formam o ribonucleocapsídeo do vírus (MEBATION, 2001; WUNNER, 2007).

A proteína N (nucleoproteína viral) contém 450 aminoácidos e tem um peso molecular de aproximadamente 57.000 daltons, sendo o principal componente viral e a principal proteína do nucleocapsídeo. Em termos de similaridade de seqüência de aminoácidos, a proteína N é a mais conservada entre os sete genótipos dos *Lyssavirus*, apesar de um grau relativamente alto de diversidade genética ser encontrada em algumas pequenas regiões do gene N nos diferentes genótipos. Por essa razão, para a detecção do vírus da raiva por RT-PCR, tem sido mais utilizado o gene da nucleoproteína viral (WUNNER, 2007).

Uma importante razão para a sua maior conservação de aminoácidos, principalmente em regiões específicas, são as funções chaves para a replicação viral exercidas por essas regiões (WUNNER, 2007). Entretanto, as diferenças de aminoácidos na nucleoproteína fornecem epítomos específicos e únicos capazes de diferenciar os *Lyssavirus* em seus diferentes genótipos através dos padrões de reação de anticorpos monoclonais (AcM) para este epítomos (WUNNER, 2007).

Pesquisas têm sugerido que *Lyssavirus* que apresentam menos que 80% de similaridade na seqüência de nucleotídeos e até 92% ou 93,3% de similaridade na seqüência de aminoácidos pertencem a diferentes genótipos (KISSI et al., 1995; WUNNER, 2002; ARAI et al., 2002)

A proteína N possui quatro sítios antigênicos (I a IV). Os sítios I, III e IV já estão mapeados e estão localizados nos segmentos de aminoácidos de posições 358-367 (sítio I), 313-337 (sítio III), 359-366 e 375-383 (sítio IV), (TORDO, 1996; WUNNER, 2007).

A proteína P interage com as proteínas N e L e acredita-se que atue como co-fator da RNA polimerase, sendo multifuncional, ligando-se a outras proteínas virais para auxiliar na

replicação do genoma viral e interagir com fatores celulares, possivelmente na disseminação e patogênese viral (MEBATION, 2001).

O envelope viral, proveniente da membrana plasmática da célula hospedeira, é composto pela glicoproteína (G) e pela proteína M. Esta última está localizada na superfície interna do envelope viral circundando a RNP e está envolvida na montagem e liberação viral (MEBATION, 2001).

A glicoproteína G do vírus da raiva é uma proteína de membrana com 505 aminoácidos, traduzidas de um mRNA que codifica 524 aminoácidos, sendo a proteína de fusão, que media a entrada do vírus na célula. Além disso, é fundamental para a resposta imune contra o vírus da raiva, sendo responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, sendo alvo destes e dos linfócitos T *helper* e citotóxicos (WUNNER, 2007).

A glicoproteína G tem importante papel na adsorção viral a receptores específicos nas células dos hospedeiros, na indução de anticorpos neutralizantes contra o RABV e na patogênese e patogenicidade da doença (WUNNER, 2007).

Oito sítios antigênicos foram identificados no domínio externo da proteína G (I-VI, “a” e G1). Os sítios I, III, VI e “a” envolvem os aminoácidos nas posições 231, 330-338, 264 e 342-343, respectivamente. O sítio II é descontínuo, localizado nas posições 34-42 e 198-200 ligadas por pontes dissulfeto (TORDO, 1996).

O primeiro evento da replicação viral é a adsorção do vírus na membrana da célula do hospedeiro mediada pela proteína G. Em seguida, o vírus penetra na célula por pinocitose e ocorre a liberação da RNP no citoplasma celular, através da fusão do envelope viral ao vacúolo lisossomal. Após a liberação do nucleocapsídeo, é iniciada a transcrição do RNA viral nos cinco RNAs mensageiros de sentido positivo, na ordem N, P, M, G e L. A transcrição dos RNAs é realizada pela proteína L, que tem função de RNA polimerase RNA dependente (TORDO, 1996).

Somente após a tradução das cinco proteínas virais tem início a replicação do genoma viral, também realizada pela proteína L. Primeiramente, ocorre a síntese do anti-genoma de sentido positivo, que servirá de molde para a produção do genoma viral de sentido negativo (TORDO, 1996).

A replicação do genoma do RABV apresenta fidelidade limitada, uma vez que a RNA polimerase viral não tem atividade corretiva de inserção dos nucleotídeos, o que leva a produção de populações de genomas virais distintos que compartilham uma origem comum. Estas

mutações ocorrem em diferentes taxas, variando entre 10^{-4} a 10^{-5} substituições por ciclo, dependendo da região do genoma viral. Vários outros fatores podem estar envolvidos na geração de heterogeneidade das seqüências de RNA do vírus rábico, como por exemplo, duração da infecção, rota de transmissão, carga viral, resposta imunológica do hospedeiro e interações com proteínas virais (KISSI et al., 1999).

Considerando uma distribuição randômica das mutações ao longo do genoma, os diferentes genomas formam populações de quasiespécies, as quais aumentam rapidamente com os sucessivos ciclos de infecção em outros hospedeiros. Como resultado desta alta instabilidade genômica, populações de quasiespécies virais podem apresentar mutações específicas que podem caracterizá-los como fenótipos distintos com relações específicas como determinado hospedeiro. Por exemplo, várias mutações identificadas em regiões codificantes do genoma estão correlacionadas com o tropismo seletivo por neurônios, ou mesmo pela ausência de patogenicidade em determinados hospedeiros apresentados pelo RABV (WUNNER, 2007).

A raiva está difundida em todos os continentes, exceto na Antártica. Os *Lyssavirus* são muitos frágeis e não conseguem manter-se no ambiente. Vários mamíferos têm servido de reservatórios em diferentes partes do mundo, principalmente os da ordem *Carnivora* e *Chiroptera*. O vírus da raiva tem sido isolado da maioria das ordens de mamíferos (RUPPRECHT et al., 2002).

O genótipo 1 é o mais amplamente distribuído mundialmente e tem maior importância epidemiológica dada sua associação com um maior número de casos de encefalite por *Lyssavirus* em humanos em relação aos outros genótipos.

Estudos moleculares do vírus têm mostrado que existem vários reservatórios para o genótipo 1, nos quais linhagens virais adaptadas a diferentes reservatórios se mantêm na natureza em ciclos epidemiológicos independentes. Dentro de cada ciclo, estes diferentes reservatórios exercem um papel fundamental e específico na manutenção de cada linhagem viral. (VELASCO-VILLA et al., 2002).

São admitidos dois ciclos de transmissão para a raiva, o ciclo urbano e o ciclo silvestre. O ciclo urbano tem o cão como principal reservatório e transmissor do vírus para outros cães, outros animais domésticos e para o homem. O ciclo silvestre é mantido por diferentes mamíferos silvestres e quirópteros (ACHA, 2003).

A via de transmissão do vírus é a saliva do animal infectado, que transmite o vírus através de mordeduras e/ou lambeduras. Também há casos citados de transmissão entre humanos por aerossóis em cavernas densamente povoadas por morcegos e casos de transmissão iatrogênica através de cirurgias de transplantes de órgãos (RUPPRECHT et al., 2002).

Os cães são os principais reservatórios da raiva nos países em desenvolvimento, porém, na Europa e América do Norte, onde os programas de vacinação em cães estão bem estabelecidos, o vírus rábico mantém o seu ciclo principalmente nas espécies silvestres como raposas vermelhas, mangustos, guaxinins, gambás, chacais e morcegos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Estima-se que anualmente ocorram em torno de 55.000 óbitos humanos por raiva na Ásia e África. Na América Latina, a incidência anual da raiva por 100.000 habitantes varia entre 0 e 0,09 na América do Sul, 0 e 0,10 na América Central e 0 e 0,06 nas ilhas do Caribe. Na grande maioria dos casos, o cão foi identificado como o animal agressor (CHILDS, REAL, 2007).

No Brasil, no período de 1986 até setembro de 2008, ocorreram 761 óbitos por raiva humana, sendo que destes, 516 tiveram o cão como animal agressor, seguido dos quirópteros que foram responsáveis por 135 casos¹ (SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE).

Na América do Norte e Europa, a raiva humana é atualmente uma doença rara com poucos casos anuais (CHILDS, REAL, 2007).

Entre os sete genótipos do gênero *Lyssavirus*, cinco têm os quirópteros como reservatórios (genótipos 2, 4, 5, 6 e 7), sendo que o genótipo 1 também tem os quirópteros como reservatórios (TORDO, 1996). Além disso, evidências mostram que todas as linhagens atualmente circulantes em carnívoros terrestres são originárias de linhagens específicas associadas a quirópteros (BADRANE, TORDO, 2001).

Os quirópteros são altamente móveis e a capacidade de certas espécies de se adaptar em ambiente urbano e abrigar-se em habitações humanas aumentam a probabilidade de contato com humanos e animais domésticos (UIEDA, 1996). A adaptação dos morcegos insetívoros, que constituem a maior parte da população de morcegos, ao meio urbano se deve em grande parte à abundante oferta de alimento e abrigo, associada à ausência de predadores (ALMEIDA et al., 1994). O número desses animais nas áreas urbanas tem aumentado constantemente (TADDEI, 1983).

¹ Dados cedidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde – SVS/MS.

A raiva em morcegos apresenta um ciclo epidemiológico independente dos ciclos existentes nos mamíferos terrestres. A raiva em morcegos hematófagos ocorre somente na América Latina e Trinidad e Tobago, onde habitam os morcegos hematófagos. A raiva em morcegos não hematófagos é registrada indistintamente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento das Américas, representando um problema emergente de saúde pública, pela expansão das áreas de ocorrência, incluindo áreas urbanas (ACHA, 2003).

A primeira observação vinculando a raiva aos morcegos hematófagos no Brasil foi feita por Carini em 1910 (CARINI et al., 1911) e a primeira morte humana atribuída à mordida de morcegos vampiros foi relatada em 1931 em Trindade (PAWAN, 1936).

Episódios de raiva humana causada por morcegos hematófagos continuaram sendo relatados em muitos países da América Latina, tais como México, Peru, Venezuela e Brasil. Entre os anos de 2004 e 2005, os morcegos hematófagos foram os principais transmissores de raiva humana na América Latina, com 46 e 52 casos, respectivamente. O Brasil foi o responsável por 64 destes casos (22 em 2004 e 42 em 2005) devido ao surto de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos ocorrido nos estados do Pará e Maranhão nestes anos. A raiva em morcegos hematófagos, além de ser um sério problema de saúde pública na América do Sul, também causa grande prejuízo econômico para a pecuária destes países (DA ROSA et al., 2006; KOTAIT et al., 2007; BARBOSA et al.; 2008).

O reconhecimento dos morcegos insetívoros como reservatórios do vírus da raiva na América do Norte, ocorreu na Flórida em 1953 (SCATTERDAY, GALTON, 1954). Após este fato, inúmeros casos de raiva humana vêm sendo descritos na América do Norte, tendo como fonte de infecção morcegos insetívoros, principalmente das espécies *Lasionycteris noctivagans* e *Pipistrellus subflavus*, sendo que a maioria destes casos não tem histórico de exposição a estes animais. Casos de raiva humana nos quais foram identificadas variantes próprias de morcegos, sem evidências de mordeduras, também foram relatados em diversos outros países da Europa e do continente americano (KOTAIT et al., 2007).

No Brasil, com referência aos morcegos não hematófagos, a primeira comunicação sobre o isolamento do vírus foi realizada em 1957 no Rio de Janeiro em morcego *Phyllostomus hastatus hastatus* (SILVA, 1961). A partir desta data ocorreram outros isolamentos em diversas outras espécies de morcegos insetívoros (CUNHA et al., 2006).

No Brasil, assim como na maior parte da América Latina, apesar destes achados, a importância dos morcegos não hematófagos na epidemiologia da doença continuou pouco estudada até a década de 80 pela presença de raiva mantida por cães e morcegos hematófagos (ACHA et al., 1985). A partir desta década, com o controle da raiva canina em muitos municípios e incorporação da tipificação molecular e antigênica aos programas de vigilância, uma apreciação da importância dos morcegos não hematófagos começou a surgir nesses países (DE MATTOS et al., 1996; DE MATTOS et al., 2000).

Na América do Sul, pesquisas mostram que os gêneros/espécies de morcegos não hematófagos com maior importância epidemiológica para a raiva são: *Tadarida brasiliensis*, *Myotis sp*, *Lasiurus sp* e *Artibeus sp* (KOTAIT et al., 2007).

Entre as 1.113 espécies de quirópteros existentes no mundo, 165 espécies entre insetívoros, frugívoros e hematófagos são encontrados no Brasil. Destas, 37 espécies já foram diagnosticadas com o vírus da raiva (KOTAIT et al., 2007).

Os casos de raiva diagnosticados em morcegos não hematófagos no Brasil, entre 2002 e 2007 encontram-se na tabela 1. Neste mesmo período, foram diagnosticados 204 morcegos hematófagos com raiva no Brasil ².

Tabela 1 - Total de morcegos não hematófagos diagnosticados com raiva no Brasil, entre 2002 a 2007 - São Paulo - 2009.

Ano	Regiões					Brasil
	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	
2002	1	2	1	69	3	76
2003	0	0	4	94	3	101
2004	0	0	4	57	5	177
2005	2	7	1	109	18	137
2006	1	1	5	132	21	160
2007	2	1	0	84	20	107
Total	6	11	15	545	70	758

Entre os anos de 2003 até setembro de 2008, a Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur, recebeu 18.741 morcegos para o diagnóstico da raiva, como parte do programa de vigilância epidemiológica para a doença. Destes, 18.007 foram classificados como não hematófagos e 652

² Dados cedido pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde – SVS/MS.

como hematófagos. Entre os morcegos não hematófagos, 254 amostras foram consideradas impossibilitadas para o diagnóstico e 252 foram positivas à imunofluorescência direta para raiva nas amostras originais e/ou nos isolamentos virais em camundongos e/ou cultivo celular, enquanto entre os morcegos hematófagos, nove amostras foram impossibilitadas e seis apresentaram-se positivas (Tabela 2) ³.

Tabela 2 - Morcegos recebidos pela Seção de diagnóstico do Instituto Pasteur para o diagnóstico da raiva entre 2003 e 2008 - São Paulo – 2009

Ano	Morcegos hematófagos			Morcegos não hematófagos			Sem classificação			Total
	POS	NEG	IMP	POS	NEG	IMP	POS	NEG	IMP	
2003	4	138	3	46	3039	43	0	4	4	3281
2004	0	140	1	17	2532	19	0	0	0	2709
2005	0	162	0	71	4060	44	0	39	0	4376
2006	1	94	2	52	3427	50	10	22	3	3661
2007	1	87	3	37	2661	60	0	0	0	2849
2008*	0	16	0	29	1782	38	0	0	0	1865
Total	6	637	9	252	17501	254	10	65	7	18741

POS: positivo / NEG: negativo / IMP: impossibilitado

*** Dados parciais até Setembro do ano de 2008.**

Entre 2005 e 2007, 160 morcegos não hematófagos foram diagnosticados com raiva pelo laboratório de diagnóstico do Instituto Pasteur, sendo que destes, 104 foram classificados como insetívoros (Quadro 1)

³Dados cedidos pela Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo.

Gênero/Espécie	Quantidade
<i>Artibeus lituratus</i>	56
<i>Myotis nigricans</i>	22
<i>Myotis sp</i>	1
<i>Molossus molossus</i>	6
<i>Molossus rufus</i>	3
<i>Molossus sp</i>	1
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	24
<i>Eptesicus furinalis</i>	20
<i>Eptesicus sp.</i>	5
<i>Eumops perotis</i>	1
<i>Eumops glaucinus</i>	1
<i>Eumops auripendulus</i>	1
<i>Histiotus velatus</i>	7
<i>Tadarida brasiliensis</i>	5
<i>Cynomops abrasus</i>	1
<i>Cynomops sp</i>	1
<i>Lasiurus ega</i>	4
<i>Lasiurus cinereus</i>	1

Quadro 1 - Morcegos não-hematófagos positivos para raiva diagnosticados pelo laboratório de virologia do Instituto Pasteur entre 2005 e 2007 - São Paulo - 2009

O conceito de variantes do vírus da raiva e o estudo das suas diferenças e reservatórios específicos foi consolidado com o desenvolvimento da técnica de anticorpos monoclonais (AcM) para a nucleoproteína e glicoproteína virais, no final da década de 70. Diferentes painéis destes anticorpos permitem uma identificação e classificação rápida de isolados de *Lyssavirus* (CUNHA, 2006).

Desde então, com a utilização da caracterização antigênica para a classificação do RABV, muitos avanços foram obtidos na epidemiologia da raiva, tornando-se possível determinar a distribuição geográfica e reservatórios específicos de diferentes variantes do RABV (FAVORETTO, 2002).

Um painel de oito AcM dirigidos à nucleoproteína viral do RABV utilizado nas Américas, permite a classificação do RABV em 11 variantes antigênicas distintas e adaptadas a diferentes reservatórios como mostrado no quadro 2 (DIAZ et al., 1994).

Hospedeiro	Variante
Cão/Mangusto	1
Cão	2
<i>Desmodus rotundus</i>	3
<i>Tadarida brasiliensis</i>	4
<i>Desmodus rotundus</i>	5
<i>Lasiurus cinereus</i>	6
Lobo do Arizona	7
Gambá Centro/Sul	8
<i>Tadarida brasiliensis mex.</i>	9
Baja SC Gambá	10
<i>Desmodus rotundus</i>	11

Quadro 2 - Relação das variantes antigênicas do RABV encontradas nas Américas e seus respectivos reservatórios, segundo Diaz et al., 1994 - São Paulo -2009

No Brasil, encontram-se as variantes antigênicas 2, 3, 4 e 6, entretanto, estudos utilizando este painel de AcM também demonstram a existência de outros quatro perfis antigênicos não compatíveis com os perfis esperados para este painel, os quais foram encontrados em isolados de morcegos insetívoros dos gêneros *Eptesicus*, *Nyctinomops*, *Myotis* e *Lasiurus* (FAVORETTO, 2002).

A aplicação da técnica de AcM apresenta limitações, como por exemplo, na análise de variantes virais intimamente relacionadas antigenicamente e variantes não classificadas com determinados painéis de AcM. Com o desenvolvimento de técnica do sequenciamento genético para o estudo da raiva, as limitações inerentes à técnica dos AcM foram superadas, o que permitiu estabelecer uma relação definitiva entre linhagens virais intimamente relacionadas (BRASS, 1994).

Estudos genéticos recentes realizados em isolados de RABV de morcegos insetívoros brasileiros apontam a existência de três linhagens virais gênero-específica. Tais linhagens estariam relacionadas aos gêneros *Eptesicus*, *Nyctinomops*, *Molossus* (CUNHA, 2006; KOBAYASHI et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007).

Assim sendo, a caracterização molecular é fundamental para determinar a presença dos múltiplos ciclos endêmicos e potencial transmissão inter-espécies. A co-existência de uma variada população de morcegos com humanos e animais domésticos nos centros urbanos torna imprescindível a compreensão da epidemiologia da raiva nestas áreas.

Além disso, tão importantes são estudos que gerem bases para inferência de proteção vacinal frente às variantes encontradas nas diferentes espécies de morcegos insetívoros, especialmente com as vacinas utilizadas em tratamentos pré e pós-exposição em seres humanos e nas campanhas de vacinação em massa de cães e gatos, os quais, particularmente os gatos, devido a hábitos de predatórios, estão sujeitos a infecção pelo vírus da raiva proveniente de morcegos insetívoros, representando assim um risco para os humanos e outros animais.

2 OBJETIVOS

Face à necessidade de se estabelecer os reservatórios das diferentes linhagens de RABV existentes em diferentes gêneros e/ou espécies de morcegos insetívoros existentes no Brasil este estudo teve por objetivos:

- Propor uma classificação genética para os isolados de vírus da raiva de morcegos insetívoros de diversas regiões do Estado de São Paulo com base em seqüenciamento de DNA parcial para o gene *N*.
- Estudar a concordância entre as genealogias obtidas com os seqüenciamentos parciais dos genes *N* e *G*.
- Estudar a concordância entre a classificação antigênica com anticorpos monoclonais dirigidos para a nucleoproteína viral e a classificação obtida com base no seqüenciamento parcial do gene *N*.
- Identificar na seqüência de aminoácidos marcadores moleculares específicos para as diferentes linhagens encontradas nos diferentes gêneros e/ou espécies de morcegos insetívoros analisados.
- Identificar nas seqüências de aminoácidos para as duas proteínas as mudanças de estado de caracteres nas regiões de importância funcional e imunológicas descritas na literatura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa proposta neste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e métodos:

3.1 AMOSTRA VIRAL DE REFERÊNCIA:

O vírus fixo da raiva CVS (Challenge Virus Standard) mantido em camundongos por inoculação intracerebral foi utilizado como controle positivo para as reações de imunofluorescência direta e transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

3.2 AMOSTRAS ESTUDADAS

Foram utilizadas 70 amostras (Quadro 3) de sistema nervoso central (SNC), de primeira e segunda passagem em camundongos inoculados com os seguintes gêneros/espécies de morcegos insetívoros: 16 *Myotis nigricans*, três *Myotis sp.*, 14 *Eptesicus furinalis*, 19 *Nyctinomops laticaudatus*, dois *Lasiurus ega*, um *Lasiurus cinereus*, quatro *Tadarida brasiliensis*, três *Histiotus velatus*, um *Histiotus sp.*, dois *Molossus molossus*, um *Molossus rufus*, um *Eumops sp.*, um *Cynomops sp.* e um *Cynomops abrasus*. Uma amostra foi classificada apenas como família *Molossidae*.

As amostras foram provenientes de 31 cidades do Estado de São Paulo, sendo que uma delas (3321/05) foi procedente da cidade de Belo Horizonte - MG. (Quadro 3).

Amostra	Ano	Gênero/espécie	Cidade
523	2007	<i>M. nigricans</i>	Ribeirão Preto - SP
636	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP
839	2007	<i>N. laticaudatus</i>	Campinas - SP
848	2005	<i>M. nigricans</i>	Ribeirão Pires - SP
964	2006	<i>E. furinalis</i>	Espírito Santo do Pinhal - SP
991	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP
1016	2007	<i>E. furinalis</i>	Campinas - SP
1068	2007	<i>L. ega</i>	Ribeirão Preto - SP
1230	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP
1231	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP
1309	2007	<i>Molossidae</i>	Campinas - SP
1542	2006	<i>M. nigricans</i>	Campinas - SP
1607	2005	<i>Eumops sp.</i>	Ribeirão Preto
1709	2006	<i>M. nigricans</i>	Nova Canaã Paulista
1748	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
1779	2006	<i>M. rufus</i>	Ribeirão Preto - SP
1992	2005	<i>H. velatus</i>	Vargem Grande Paulista - SP
2069	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
2075	2007	<i>E. furinalis</i>	Morungaba - SP
2107	2006	<i>L. ega</i>	Franca - SP
2136	2006	<i>T. brasiliensis</i>	Socorro - SP
2210	2006	<i>T. brasiliensis</i>	Salesópolis - SP
2220	2005	<i>M. nigricans</i>	Campinas - SP
2378	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
2441	2007	<i>M. nigricans</i>	Itapecerica da Serra - SP
2654	2006	<i>L. cinereus</i>	Garça - SP
2782	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP
2970	2006	<i>E. furinalis</i>	Capivari - SP
2989	2007	<i>N. laticaudatus</i>	Joanópolis - SP
2989	2006	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
3056	2007	<i>E. furinalis</i>	Barretos - SP
3105	2006	<i>M. molossus</i>	Iacri - SP
3208	2006	<i>E. furinalis</i>	Vinhedo - SP
3321	2005	<i>Histiotus sp.</i>	Belo Horizonte - MG
3529	2007	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
3640	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Rio claro - SP

Continua

Quadro 3 - Relação das amostras de RABV isoladas de morcegos insetívoros submetidas à RT-PCR para os genes *N* e *G* no presente estudo – São Paulo - 2009

Amostra	Ano	Gênero/espécie	Cidade
3782	2005	<i>T. brasiliensis</i>	Campinas - SP
3784	2007	<i>M. nigricans</i>	Mauá - SP
4157	2005	<i>M. nigricans</i>	Águas de Lindóia - SP
4336	2005	<i>Myotis sp.</i>	Atibaia - SP
4356	2007	<i>M. molossus</i>	Campinas - SP
4441	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
4836	2005	<i>H. velatus</i>	Jarinu - SP
4896	2005	<i>M. nigricans</i>	Caçapava - SP
4933	2005	<i>Myotis sp.</i>	Estrela - SP
5766	2005	<i>M. nigricans</i>	Campinas - SP
5882	2006	<i>M. nigricans</i>	São Roque - SP
6673	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
6883	2006	<i>H. velatus</i>	Campo Limpo Paulista - SP
7268	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
7589	2006	<i>Cynomops sp.</i>	Ribeirão Preto - SP
8061	2006	<i>E. furinalis</i>	Campinas - SP
8089	2005	<i>N. laticaudatus</i>	São Sebastião - SP
8300	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
8565	2006	<i>N. laticaudatus</i>	Mauá - SP
8665	2005	<i>M. nigricans</i>	Ribeirão Preto - SP
8690	2005	<i>E. furinalis</i>	Morungaba - SP
9141	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
9185	2005	<i>T. brasiliensis</i>	Mogi das Cruzes - SP
9286	2005	<i>C. abrasus</i>	Ribeirão Preto - SP
9397	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Marília - SP
9569	2006	<i>N. laticaudatus</i>	Campinas - SP
9634	2005	<i>Myotis sp.</i>	Ribeirão Preto - SP
9881	2005	<i>M. nigricans</i>	Paulínia - SP
9916	2005	<i>M. nigricans</i>	Ribeirão Preto - SP
10061	2006	<i>M. nigricans</i>	Taboão da Serra - SP
10423	2006	<i>N. laticaudatus</i>	Campinas - SP
10494	2006	<i>E. furinalis</i>	Marília - SP
10529	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP
10891	2006	<i>M. nigricans</i>	Campinas - SP

Conclusão

Quadro 3 - Relação das amostras de RABV isoladas de morcegos insetívoros submetidas à RT-PCR para os genes *N* e *G* no presente estudo – São Paulo - 2009

Todas estas amostras foram positivas para a raiva, tanto na IFD, quanto na prova biológica realizada em cultura celular e/ou camundongos, sendo os isolados em SNC de camundongos armazenados a -80 °C até a sua utilização.

3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

A IFD para a detecção do vírus da raiva foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Dean et al. (1996).

3.3.1 Diluição do conjugado:

O conjugado utilizado para a reação foi produzido pela Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur, conjugado este dirigido para a detecção do nucleocapsídeo viral do vírus da raiva.

A diluição do conjugado foi realizada em cérebros de camundongos negativos para raiva, bem como em cérebros de camundongos infectados com o vírus CVS. Esta diluição varia de acordo com o lote do conjugado.

3.4 ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR DE NEUROBLASTOMA MURINO (N2A)

O isolamento viral em células N2A foi realizado de acordo com protocolo descrito Castilho et al., (2007).

3.5 INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS

A técnica de inoculação intracerebral em camundongos foi realizada segundo protocolo descrito por Koprowski (1996).

3.6 TIPIFICAÇÃO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

A tipificação com anticorpos monoclonais (AcM) foi realizada segundo Diaz et al. (1994), e as amostras submetidas a esta técnica encontram-se no quadro 4.

Amostra	Ano	Gênero/espécie
523	2007	<i>M. nigricans</i>
839	2007	<i>N. laticaudatus</i>
1016	2007	<i>E. furinalis</i>
1068	2007	<i>L. ega</i>
2069	2005	<i>N. laticaudatus</i>
2107	2006	<i>L. ega</i>
2136	2006	<i>T. brasiliensis</i>
2782	2006	<i>E. furinalis</i>
2989	2006	<i>N. laticaudatus</i>
3056	2007	<i>E. furinalis</i>
3321	2005	<i>Histiopus sp.</i>
3529	2007	<i>N. laticaudatus</i>
3784	2007	<i>M. nigricans</i>
4356	2007	<i>M. molossus</i>
4896	2005	<i>M. nigricans</i>
7268	2005	<i>N. laticaudatus</i>
10529	2005	<i>N. laticaudatus</i>

Quadro 4 - Relação das amostras de RABV isoladas de morcegos insetívoros submetidas à técnica de tipificação antigênica com anticorpos monoclonais no presente estudo – São Paulo - 2009

3.7 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) VIRAIS

Amostras de SNC de camundongos positivas para a presença de vírus da raiva pelas provas de IFD e/ou isolamento viral realizado em cultura celular ou camundongos, foram submetidas à reação de RT-PCR para amplificação parcial dos genes *N* e *G* segundo protocolo

descrito por Carnieli (1999), com *primers* para nucleoproteína descritos por Orciari et al., (2001) e os *primer* para a glicoproteína viral descritos por Sato et al., (2004).

Como controles foram inseridos desde a fase de extração do RNA até a amplificação suspensão de cérebros de camundongos inoculados com a amostra CVS (controle positivo) e água ultra-pura livre de DNase e RNase (controle negativo).

3.7.1 Extração de RNA

A extração de RNA total do SNC dos camundongos, controles positivo e negativo foi realizada com o método do TRIzol (Invitrogen™) seguindo-se as instruções do fabricante.

3.7.2 Síntese de DNA complementar (c-DNA) – Transcrição Reversa (RT)

Para cada amostra, adicionou-se 5µL do RNA extraído ao *mix* para a transcrição reversa contendo 8µL 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 6µL do pool de dNTPs na concentração de 10mM, 4µL DTT a 100mM, 5µL de cada *primer* na concentração de 10 µM (21g e 304 para o gene *N* e Ga3222-4 e Gb 4119-39 para o gene *G*, Quadro 6) e 200U de Superscript™ II *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), 1µL de RNAsin (Invitrogen™) e 12µL de água ultra-pura livre de DNase e RNase esterilizada para um volume final de 47µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

Após a obtenção do DNA complementar foi realizada a reação de PCR pela adição para cada amostra de 10µL de cada c-DNA ao *mix* de PCR contendo 10µL de 10X PCR Buffer (Invitrogen™), 16µL do pool de dNTPs a 1,25 mM, 5µL de cada primer a 10 µM (21g e 304 para gene *N* e Ga3222-4 e Gb4119-39 para o gene *G*, (Quadro 6), 1,5mM MgCl₂, 50,5µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para um volume final de 102µL e levados ao termociclador e submetidos ao ciclo descrito no quadro 5.

Ciclo	Temperatura	Tempo
1	94°C Denaturação	5 minutos
35	94°C Denaturação	45 segundos
35	55°C Anelamento	45 segundos
35	72°C Extensão	2 minutos
1	72°C Extensão	10 minutos

Quadro 5 - Ciclos de temperaturas utilizados no presente trabalho nas PCRs para os genes *G* e *N* do RABV em isolados de morcegos insetívoros – São Paulo – 2009

Primers	Sentido	Seqüência	Gene	Posição na amostra PV
21g	senso	5' ATGTAACACCTCTACAATG 3'	N	55-73
304	anti-senso	5'TTGACGAAGATCTTGCTCAT 3'	N	1514-1533
Ga3222-4	senso	5'CGCTGCATTTTRTCARAGT 3'	G	3221-3229
Gb4119-39	anti-senso	5'GGAGGGCACCATTTGGTMTTC 3'	G	4116-4135

Quadro 6 - *Primers* utilizados nas provas de RT-PCR e seqüenciamento de DNA para os genes *G* e *N* das amostras de RABV isoladas de morcegos insetívoros no presente estudo – São Paulo - 2009

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (0,1 M de Tris, 0,09 M de ácido bórico e 0,001 M de EDTA), contendo brometo de etídeo na proporção de 7µL para cada 100ml de tampão.

Foram considerados positivos os isolados que resultaram em fragmentos de 1478 e 915 pares de bases (pb) para os genes *N* e *G*, respectivamente.

3.8 SEQÜENCIAMENTO DE DNA

Para a realização da técnica de seqüenciamento de DNA foram realizados os seguintes protocolos.

3.8.1 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se o *kit* QIAquick® Gel Extraction Kit, segundo instruções do fabricante diretamente a partir das reações de PCR.

As reações que apresentaram bandas inespecíficas foram purificadas a partir do gel com o mesmo *kit*, segundo as instruções do fabricante.

Após a purificação, as amostras de DNA foram quantificadas visualmente em gel de agarose a 2% com Low Mass DNA Ladder (Invitrogen™), segundo as instruções do fabricante.

3.8.2 Reação de seqüenciamento de DNA

A reação de seqüenciamento de DNA consistiu em 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 3,2 pmoles de cada primer senso e antisenso, referentes a cada gene em reações separadas, entre 30 a 60 ng do DNA alvo (entre 10 e 40 ng para o gene *N* e 5 a 20 ng para o gene *G*) e água DNase free q.s.p. para uma reação final de 10 µL, levando-se ao termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) para 35 ciclos de 96 °C/10 segundos, 50 °C/5 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 1°C/segundo entre cada temperatura.

A purificação da reação de seqüenciamento foi realizada por Sephadex™ G-50 fine(GE healthcare Bio-sciences), em placas com filtro Multiscreen HV com 96 orifícios.

Após a purificação, as seqüências foram obtidas em analisador genético automático ABI-3130 (Applied Biosystems™).

3.8.3 Edição de seqüências

Para cada um dos nucleotídeos mostrados nos eletroferogramas gerados para cada uma das reações de seqüenciamento foram atribuídos escores através do aplicativo Phred⁴ on line em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>, sendo utilizadas as posições que apresentaram nucleotídeos com índice Phred maior que 20 (EWING, GREEN, 1998).

Os nucleotídeos com índice Phred igual ou menor a 20 foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD), para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciadas. A seqüência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn⁵ para confirmação do seqüenciamento.

3.9 ANÁLISE GENEALÓGICA

Para a construção das árvores filogenéticas, as seqüências de DNA obtidas foram alinhadas pelo método do alinhamento múltiplo CLUSTAL/W utilizando-se o programa Bioedit (HALL, 1999), conferindo-se manualmente os alinhamentos para cada conjunto de seqüências alinhadas.

Para a reconstrução filogenética das amostras de RABV, foi utilizado o método de distância com o algoritmo Neighbor-Joining e o modelo evolutivo GTR selecionado pelo aplicativo Modeltest 3.7 através do software PAUP (SWOFFORD, 2001) com 1000 repetições de bootstrap. Foram utilizadas 83 seqüências homólogas recuperadas do GenBank (54 utilizadas para o gene *N* e 29 para o gene *G*) e as seqüências do vírus da estomatite vesicular foram utilizadas como grupos externos (M 31861 e M31860 para *N* e NC001560 para *G*) para o enraizamento das árvores.

⁴ Phred Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 2008.

⁵ BLAST Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 2006/2007/2008.

Para a análise do gene *G*, também foram usadas duas seqüências de morcegos frugívoros da espécie *A. lituratus* (5028/07 e 5029/07) retiradas do banco de seqüências de DNA da Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur.

3.10 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

As identidades de nucleotídeos e aminoácidos mínima, máxima e média para os agrupamentos encontrados entre os diversos gêneros/espécies de morcegos insetívoros para as seqüências dos genes *N* e *G* foram calculadas com o programa Excel (©1985-2003 Microsoft Corporation) a partir das matrizes de identidades calculadas com o programa Bioedit.

3.11 ANÁLISES DE MUDANÇAS E MARCADORES MOLECULARES NAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS TRADUZIDAS A PARTIR DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA.

Para análise da conservação de estados dos caracteres nas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, substituições de aminoácidos em regiões importantes das duas proteínas, bem como a existência de substituições de aminoácidos específicas para cada gênero de morcego, foi realizada apenas com as amostras dos quirópteros brasileiros presentes no alinhamento utilizado para a obtenção das árvores filogenéticas para cada gene.

Para o estudo das mudanças nos aminoácidos observadas entres as amostras analisadas, foram utilizados os softwares Mega 4.1 (© 1993 – 2008 Tamura, Dedley, Ney & Kumar) e Bioedit v. 7.0.0 (HALL, 1999), sendo que as análises das mudanças foram feitas em relação ao vírus fixo PV (Genbank accession number M13215).

4 RESULTADOS

Os resultados baseados nas metodologias definidas para o presente estudo estão descritos nos itens a seguir:

4.1 TIPIFICAÇÃO ANTIGÊNICA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS DIRIGIDOS À NUCLEOPROTEÍNA VIRAL

Entre as 40 amostras estudadas para a nucleoproteína viral que resultaram em seqüências viáveis para a análise filogenética, 17 foram submetidas à tipificação antigênica. Destas, quatro foram classificadas com variante 4 (três *M. nigricans* e um *L. ega*), um isolado de *T. brasiliensis* foi classificado como variante 6, e as outras 12 amostras, sendo seis da espécie *N. laticaudatus*, três da espécie *E. furinalis*, uma da espécie *L. ega*, uma da espécie *M. molossus* e uma do gênero *Histiopus*, tiveram perfis de reação incompatíveis com os perfis estabelecidos para o painel de AcM utilizados (Quadro 7).

Amostra	Ano	Gênero/Espécie	Perfil antigênico
523	2007	<i>M. nigricans</i>	VR 4
839	2007	<i>N. laticaudatus</i>	C4 C10 C12
1016	2007	<i>E. furinalis</i>	C4 C10 C12
1068	2007	<i>L. ega</i>	VR 4
2069	2005	<i>N. laticaudatus</i>	C4 C10 C12
2107	2006	<i>L. ega</i>	C4 C9 C10
2136	2006	<i>T. brasiliensis</i>	VR 6
2782	2006	<i>E. furinalis</i>	C4 C10 C12
2989	2006	<i>N. laticaudatus</i>	C10 C12
3056	2007	<i>E. furinalis</i>	C4 C10 C12
3321	2005	<i>Histiotus sp.</i>	C12
3529	2007	<i>N. laticaudatus</i>	C10 C12
3784	2007	<i>M. nigricans</i>	VR 4
4356	2007	<i>M. molossus</i>	C10 C12
4896	2005	<i>M. nigricans</i>	VR 4
7268	2005	<i>N. laticaudatus</i>	C4 C10 C12
10529	2005	<i>N. laticaudatus</i>	C10 C12

Quadro 7 - Resultados da tipificação antigênica com anticorpos monoclonais anti-nucleoproteína de RABV em amostras isoladas de morcegos insetívoros utilizadas no presente estudo – São Paulo - 2009

4.2 RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) VIRAIS.

Para o gene *N* foram submetidas à técnica de RT-PCR 67 isolados, sendo que 66 se apresentaram positivos na RT-PCR, enquanto um apresentou resultado negativo ao final da reação (Quadro 10).

Dos 57 isolados submetidos à RT-PCR dirigida ao gene *G*, 54 mostraram-se positivos enquanto três permaneceram negativos (Quadro 8).

Não foram detectadas contaminações para as reações de RT-PCR, uma vez que os controles negativos não apresentaram bandas resultantes da amplificação de DNA.

Amostra	Ano	Gênero/espécie	Cidade	PCR N	PCR G
523	2007	<i>M. nigricans</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
636	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
839	2007	<i>N. laticaudatus</i>	Campinas - SP	+	+
848	2005	<i>M. nigricans</i>	Ribeirão Pires - SP	+	+
964	2006	<i>E. furinalis</i>	Espírito Santo do Pinhal - SP	+	+
991	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
1016	2007	<i>E. furinalis</i>	Campinas - SP	+	+
1068	2007	<i>L. ega</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
1230	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
1231	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
1309	2007	<i>Molossidae</i>	Campinas - SP	+	+
1542	2006	<i>M. nigricans</i>	Campinas - sp	+	+
1607	2005	<i>Eumops sp.</i>	Ribeirão Preto	+	-
1709	2006	<i>M. nigricans</i>	Nova canaã pta	+	+
1748	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	NR
1779	2006	<i>M. rufus</i>	Ribeirão Preto -SP	+	+
1992	2005	<i>H. velatus</i>	Vargem Grande Paulista - SP	+	+
2069	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
2075	2007	<i>E. furinalis</i>	Morungaba - SP	+	+
2107	2006	<i>L. ega</i>	Franca - SP	+	+
2136	2006	<i>T. brasiliensis</i>	Socorro - SP	+	NR
2210	2006	<i>T. brasiliensis</i>	Salesópolis - SP	+	NR
2220	2005	<i>M. nigricans</i>	Campinas - SP	+	+
2378	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
2441	2007	<i>M. nigricans</i>	Itapecerica da Serra - SP	+	+
2654	2006	<i>L. cinereus</i>	Garça - SP	+	+
2782	2006	<i>E. furinalis</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
2970	2006	<i>E. furinalis</i>	Capivari - SP	+	+
2989	2007	<i>N. laticaudatus</i>	Joanópolis - SP	+	+
2989	2006	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
3056	2007	<i>E. furinalis</i>	Barretos - SP	+	+
3105	2006	<i>M. molossus</i>	Iacri - SP	+	-
3208	2006	<i>E. furinalis</i>	Vinhedo - SP	+	+
3321	2005	<i>Histiotus sp.</i>	Belo Horizonte - MG	+	+
3529	2007	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
3640	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Rio claro - SP	+	+
3782	2005	<i>T. brasiliensis</i>	Campinas - SP	-	NR
3784	2007	<i>M. nigricans</i>	Mauá - SP	+	+
4157	2005	<i>M. nigricans</i>	Águas de Lindóia - SP	+	+
4336	2005	<i>Myotis sp.</i>	Atibaia - SP	+	NR
4356	2007	<i>M. molossus</i>	Campinas - SP	+	+
4441	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
4836	2005	<i>H. velatus</i>	Jarinu - SP	NR	+

NR : RT-PCR não realizado

Continua

Quadro 8 – Resultados das RT-PCRs para os genes *N* e *G* para as amostras de RABV isoladas de morcegos insetívoros utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2009

Amostra	Ano	Gênero/espécie	Cidade	PCR N	PCR G
4896	2005	<i>M. nigricans</i>	Caçapava - SP	+	NR
4933	2005	<i>Myotis sp.</i>	Estrela - SP	+	NR
5766	2005	<i>M. nigricans</i>	Campinas - SP	+	NR
5882	2006	<i>M. nigricans</i>	São Roque - SP	+	+
6673	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
6883	2006	<i>H. velatus</i>	Campo Limpo Paulista - SP	+	+
7268	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
7589	2006	<i>Cynomops sp.</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
8061	2006	<i>E. furinalis</i>	Campinas - SP	+	+
8089	2005	<i>N. laticaudatus</i>	São Sebastião - SP	+	NR
8300	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
8565	2006	<i>N. laticaudatus</i>	Mauá - SP	NR	+
8665	2005	<i>M. nigricans</i>	Ribeirão Preto - SP	+	-
8690	2005	<i>E. furinalis</i>	Morungaba - SP	+	NR
9141	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	NR
9185	2005	<i>T. brasiliensis</i>	Mogi das Cruzes - SP	+	+
9286	2005	<i>C. abrasus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	NR
9397	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Marília - SP	+	+
9569	2006	<i>N. laticaudatus</i>	Campinas - SP	+	+
9634	2005	<i>Myotis sp.</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
9881	2005	<i>M. nigricans</i>	Paulínia - SP	+	NR
9916	2005	<i>M. nigricans</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
10061	2006	<i>M. nigricans</i>	Taboão da Serra - SP	+	+
10423	2006	<i>N. laticaudatus</i>	Campinas - SP	NR	+
10494	2006	<i>E. furinalis</i>	Marília - SP	+	+
10529	2005	<i>N. laticaudatus</i>	Ribeirão Preto - SP	+	+
10891	2006	<i>M. nigricans</i>	Campinas - SP	+	+

NR : RT-PCR não realizado

Conclusão

Quadro 8 – Resultados das RT-PCRs para os genes *N* e *G* para as amostras de RABV isoladas de morcegos insetívoros utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2009

4.3 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para o a sequenciamento de DNA foram utilizadas os isolados positivos na técnica de RT-PCR, que após sua purificação e quantificação, apresentaram quantidade suficiente de DNA para a realização da reação.

Dos 66 isolados positivos à RT-PCR para o gene *N*, 65 foram sequenciados e 40 resultaram em seqüências viáveis após a aferição com o aplicativo Phred e edição manual.

Para o gene *G*, dos 54 isolados positivos na RT-PCR, 52 foram seqüenciados e destes, 45 apresentaram seqüências viáveis. Vinte e nove amostras tiveram os genes *N* e *G* seqüenciados paralelamente (Quadro 9).

Amostra	Ano	Gênero/Espécie	Seqüência N	Seqüência G
523	2007	<i>M. nigricans</i>	+	+
636	2006	<i>E. furinalis</i>	-	+
839	2007	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
848	2005	<i>M. nigricans</i>	-	+
964	2006	<i>E. furinalis</i>	+	+
991	2006	<i>E. furinalis</i>	+	+
1016	2007	<i>E. furinalis</i>	+	+
1068	2007	<i>L. ega</i>	+	+
1230	2006	<i>E. furinalis</i>	-	+
1231	2006	<i>E. furinalis</i>	-	+
1309	2007	<i>Molossidae</i>	-	+
1542	2006	<i>M. nigricans</i>	-	+
1607	2005	<i>Eumops sp.</i>	-	NA
1709	2006	<i>M. nigricans</i>	+	NR
1748	2005	<i>N. laticaudatus</i>	-	NA
1779	2006	<i>M. rufus</i>	-	-
1992	2005	<i>H. velatus</i>	+	+
2069	2005	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
2075	2007	<i>E. furinalis</i>	-	-
2107	2006	<i>L. ega</i>	+	+
2136	2006	<i>T. brasiliensis</i>	+	NA
2210	2006	<i>T. brasiliensis</i>	+	NA
2220	2005	<i>M. nigricans</i>	+	+
2378	2005	<i>N. laticaudatus</i>	-	+
2441	2007	<i>M. nigricans</i>	-	+
2654	2006	<i>L. cinereus</i>	+	-
2782	2006	<i>E. furinalis</i>	+	+
2970	2006	<i>E. furinalis</i>	+	+
2989	2007	<i>N. laticaudatus</i>	-	+
2989	2006	<i>N. laticaudatus</i>	+	-
3056	2007	<i>E. furinalis</i>	+	+
3105	2006	<i>M. molossus</i>	-	NR
3208	2006	<i>E. furinalis</i>	+	-
3321	2005	<i>Histiotus sp.</i>	+	+
3529	2007	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
3640	2005	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
3782	2005	<i>T. brasiliensis</i>	NA	NA
3784	2007	<i>M. nigricans</i>	+	+
4157	2005	<i>M. nigricans</i>	+	+

+ : utilizada / - : não utilizada / NR : reação de seqüenciamento não realizada / NA : não se aplica

Continua

Quadro 9 - Resultado de seqüenciamento de DNA para os genes *N* e *G* para os isolados de RABV de morcegos insetívoros utilizados no presente estudo - São Paulo - 2009

Amostra	Ano	Gênero/Espécie	Sequência N	Sequência G
4336	2005	<i>Myotis sp.</i>	-	NA
4356	2007	<i>M. molossus</i>	+	+
4441	2005	<i>N. laticaudatus</i>	-	+
4896	2005	<i>M. nigricans</i>	+	NA
4933	2005	<i>Myotis sp.</i>	-	NA
5766	2005	<i>M. nigricans</i>	+	NA
5882	2006	<i>M. nigricans</i>	-	+
6673	2005	<i>N. laticaudatus</i>	-	+
6883	2006	<i>H. velatus</i>	+	+
7268	2005	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
7589	2006	<i>Cynomops sp.</i>	-	-
8061	2006	<i>E. furinalis</i>	+	+
8089	2005	<i>N. laticaudatus</i>	+	NA
8300	2005	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
8565	2006	<i>N. laticaudatus</i>	NA	-
8665	2005	<i>M. nigricans</i>	+	NA
8690	2005	<i>E. furinalis</i>	NR	NA
9141	2005	<i>N. laticaudatus</i>	+	NA
9185	2005	<i>T. brasiliensis</i>	+	+
9286	2005	<i>C. abrasus</i>	-	NA
9397	2005	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
9569	2006	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
9634	2005	<i>Myotis sp.</i>	+	+
9881	2005	<i>M. nigricans</i>	-	NA
9916	2005	<i>M. nigricans</i>	+	+
10061	2006	<i>M. nigricans</i>	-	+
10423	2006	<i>N. laticaudatus</i>	NA	+
10494	2006	<i>E. furinalis</i>	-	+
10529	2005	<i>N. laticaudatus</i>	+	+
10891	2006	<i>M. nigricans</i>	-	+

+ : utilizada / - : não utilizada / NR : reação de seqüenciamento não realizada / NA : não se aplica

Conclusão

Quadro 9 - Resultado de seqüenciamento de DNA para os genes *N* e *G* para os isolados de RABV de morcegos insetívoros utilizados no presente estudo - São Paulo - 2009

As regiões analisadas para cada gene foram às seguintes: do nucleotídeo 203 ao nucleotídeo 1420 do gene *N* (em relação ao vírus fixo PV accession number M13215), correspondendo ao aminoácido 45 até o aminoácido 450 da nucleoproteína viral; do nucleotídeo 3318 ao nucleotídeo 3987 do gene *G* (em relação ao vírus fixo PV accession number M13215), referentes aos primeiros 223 aminoácidos da glicoproteína viral incluindo os primeiros 19 aminoácidos referentes à região peptídeo sinal.

4.4 ANÁLISE GENEALÓGICA

Foram geradas duas árvores filogenéticas, uma para cada região analisada de cada gene, acrescidas de seqüências extraídas do GenBank.

4.4.1 Gene *N*

Além das 40 seqüências de DNA geradas neste estudo, foram utilizadas 54 seqüências de vírus da raiva retiradas do Genbank e duas seqüências do vírus da estomatite vesicular (número de acesso no Genbank M31860 e M31861) utilizadas como grupo externo para a construção da árvore filogenética (Figura 2).

Considerando os isolados seqüenciados no presente estudo, a árvore genealógica para o gene *N* demonstrou a formação de seis grupos apoiados em bootstraps de no mínimo 78% e denominados como: grupo 1 ou *Myotis*, grupo 2 ou *Eptesicus*, grupo 3 ou *Tadarida*, grupo 4 ou *Histiotus*, grupo 5 ou *Nyctinomops* e grupo 6 ou *Lasiurus*.

Para o grupo 1 (grupo *Myotis*), observou-se o agrupamento de 10 isolados referentes a este estudo e classificados como: *M. nigricans* (oito isolados) , *Myotis sp* (um isolado) e *N. laticaudatus* (um isolado).

O grupo 2 (grupo *Eptesicus*) foi composto de 12 isolados, sendo sete referentes ao presente estudo e classificados como *E. furinalis*. Dos cinco isolados retirados do Genbank, quatro foram classificados como *E. furinalis* e um foi classificado como *N. laticaudatus*.

No grupo 3 (grupo *Tadarida*) agruparam-se cinco isolados, todos referentes a este estudo, sendo três classificados como *T. brasiliensis* e dois como *N. laticaudatus*.

O grupo 4 (grupo *Histiotus*) foi composto por três isolados analisados neste estudo, dois classificados como *H. velatus* e um classificado como *Histiotus sp*.

Para o grupo 5 (grupo *Nyctinomops*) foi observado o agrupamento de 17 isolados, sendo 12 analisados neste estudo (11 *N. laticaudatus* e um *M. molossus*) e cinco retiradas do Genbank, sendo três *N. laticaudatus* e dois *Tadarida. laticaudata*.

No grupo 6 (grupo *Lasiurus*) agruparam-se três isolados referentes a esta pesquisa, dois classificados como *L. ega* e uma com *L. cinereus*.

A amostra 3208/06 ficou sozinha na árvore filogenética, ou seja, não se agrupou em nenhum dos seis grupos encontrados.

Também foram observados cinco outros grupos relacionados com amostras retiradas do Genbank, os quais foram chamados de grupos 7, 8, 9, 10 e 11.

No grupo 7, suportado por bootstrap de 100% encontram-se 11 amostras referentes a variante antigênica 3 circulante no Brasil, que tem como reservatórios os morcegos hematófagos do gênero *D. rotundus* e o morcego frugívoro *A. lituratus*.

No grupo 8, suportado por bootstrap de 88%, tem-se dois vírus fixos do RABV (PV e CVS) e sete isolados representativos da variante antigênica 2 que tem como reservatórios os canídeos domésticos e silvestres do Brasil.

O grupo 9 foi formado por três isolados de morcegos brasileiros do gênero *Molossus*, suportado por bootstrap de 98%.

O grupo 10 foi composto por 15 isolados de morcegos dos gêneros *Myotis* e *Eptesicus* procedentes da América do Norte, sendo suportado por bootstrap de 86%.

O grupo 11 também foi composto por isolados de morcegos dos gêneros *Myotis* e *Eptesicus* procedentes da América do Norte, somando um total de seis amostras e suportado por bootstrap de 99%.

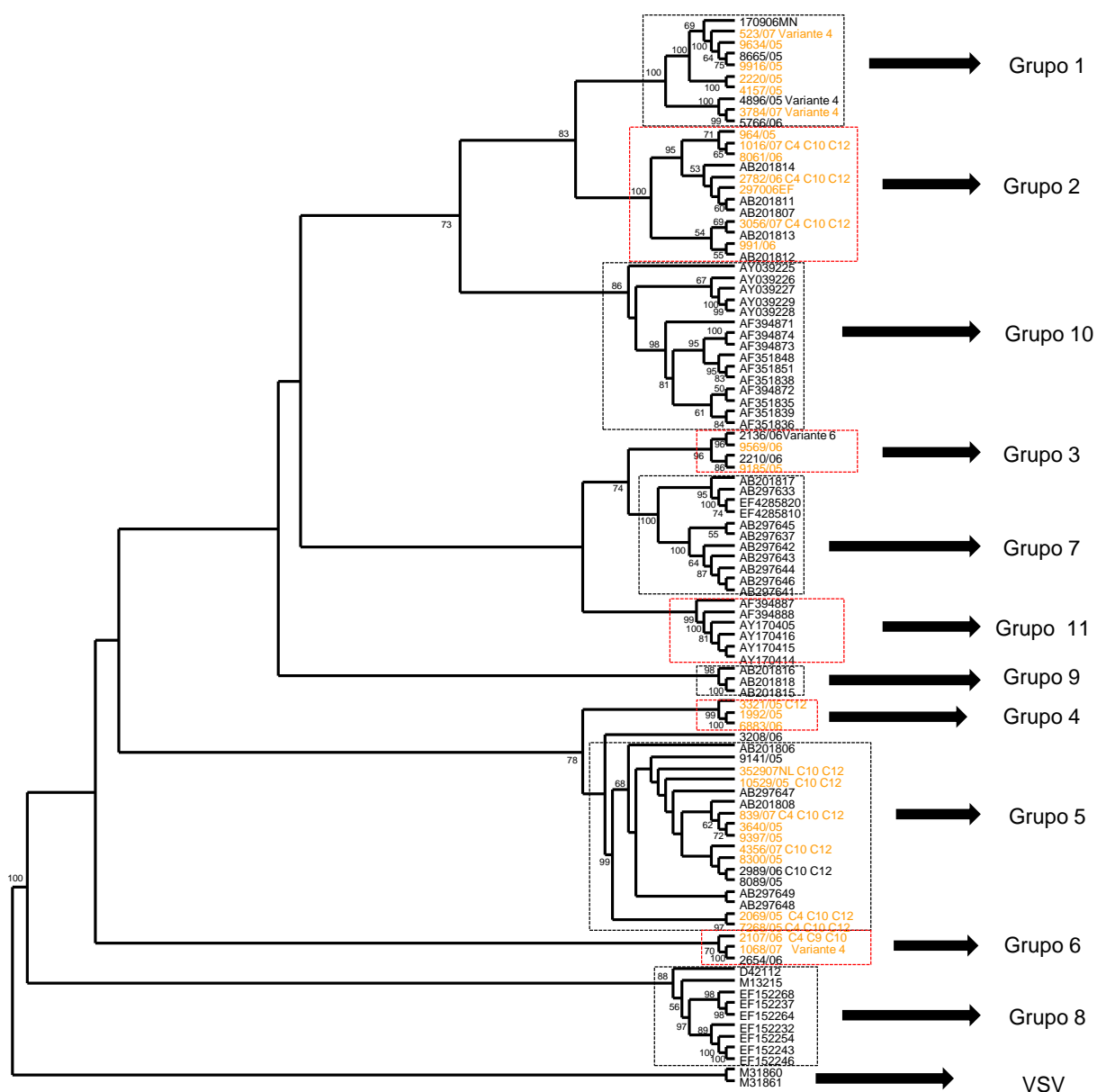


Figura 2 - Árvore de distância com algoritmo Neighbor-joining, modelo evolutivo GTR para o gene *N* de RABV (nucleotídeos 203 ao 1420) com os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Em laranja, isolados em que ambos os genes foram seqüenciados. C4C1012, C10C12, C9C4C10, C12, Variante 4 e Variante 6 referem-se aos padrões de reação encontrados na tipificação com AcM anti nucleoproteína. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009

4.4.2 Gene G

Para a árvore filogenética do gene *G*, além dos 45 isolados seqüenciados neste estudo, foram acrescentadas duas seqüências do banco de seqüências de DNA da Seção de Diagnostico do Instituto Pasteur, 29 amostras do Genbank e uma amostra do VSV (número de acesso no Genbank NC 001560) usada para o enraizamento da árvore (Figura 3).

Em relação aos isolados contemplados nesta pesquisa, a árvore filogenética formada para o gene *G* mostrou a formação dos mesmos seis agrupamentos encontrados para o gene *N*, suportados por bootstraps de no mínimo 65%.

No grupo 1 agruparam-se 13 isolados, sendo 11 referentes a este estudo (10 *M. nigricans* e um *Myotis sp.*) e dois provenientes do Genbank e classificados como morcego não hematófago.

O grupo 2 foi composto de 18 isolados, sendo 11 seqüenciados neste estudo e classificados como *E. furinalis*. As outras sete seqüências foram retiradas do Genbank, das quais quatro foram oriundas de morcegos classificados como *E. furinalis*, uma de um morcego *Eumops auriplendulus*, uma de um morcego *N. laticaudatus* e a última de um morcego não hematófago.

O grupo 3 contemplou três isolados, todos deste estudo e classificados como *T. brasiliensis*.

O grupo 4 foi composto por três isolados referentes a este estudo, sendo dois classificados como *H. velatus* e um com *Histiotus sp.*

No grupo 5 agruparam-se 14 isolados, todos referentes a este estudo, sendo 12 classificados como *N. laticaudatus*, um como *M. molossus* e um como família *Molossidae*.

No grupo 6 (grupo *Lasiurus*), agruparam-se quatro isolados, dois deste estudo e classificados como *L. ega*, sendo os outros dois oriundos do Genbank e classificados como morcego não hematófago.

O isolado 5882/06 ficou sozinho na árvore filogenética, ou seja, não se agrupou em nenhum dos 6 grupos encontrados.

Com relação às seqüências provenientes do Genbank, temos dois grupos, chamados de grupos 7 e 8, correspondentes com aos mesmos agrupamentos encontrados para a nucleoproteína.

No grupo 7, suportado pelo bootstrap de 100%, temos 13 amostras, três de morcegos e 10 de outros animais infectados com a linhagem do RABV circulante entre os morcegos hematófagos.

No grupo 8, com bootstrap de 98%, temos cinco isolados de animais infectados com a linhagem viral específica dos canídeos brasileiros e duas seqüências de vírus fixos do RABV (PV e CVS).

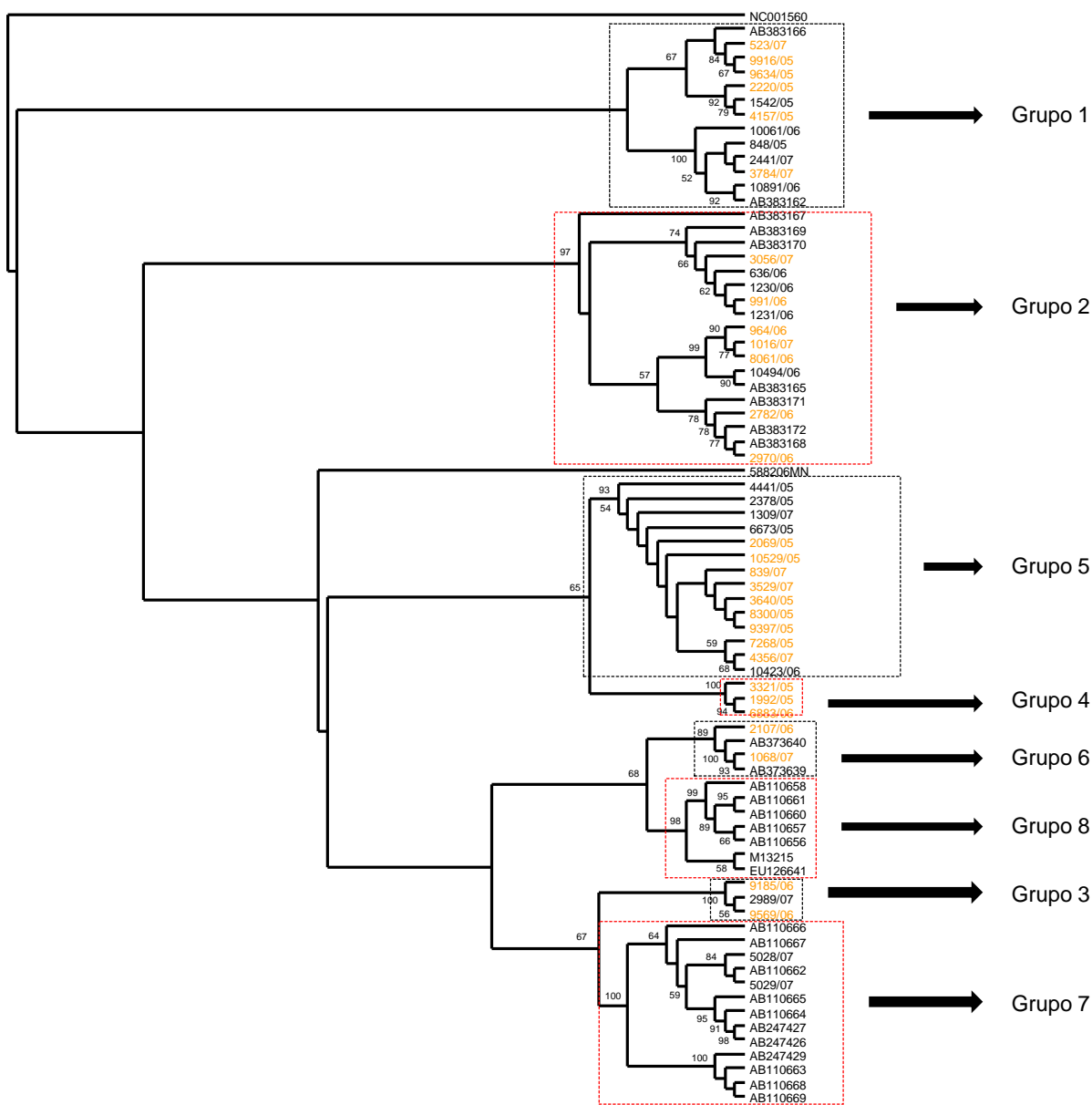


Figura 3 - Árvore de distância com algoritmo Neighbor-joining, modelo evolutivo GTR para o gene *G* de RABV (nucleotídeos 3.318 ao 3.987) com os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Em laranja, isolados em que ambos os genes foram seqüenciados. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009

4.5 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

As metodologias empregadas para o cálculo das identidades de nucleotídeos e aminoácidos para os genes estudados no presente estudo estão apresentadas nos itens a seguir.

4.5.1 Gene *N*

A identidade média para todos os isolados presentes na árvore filogenética foi de 89,31% em relação aos nucleotídeos e 96,73% em relação aos aminoácidos.

Quando as identidades médias são calculadas para todos os quirópteros presentes na árvore filogenética temos 90,41% para os nucleotídeos e 97,08% para os aminoácidos.

O resultado da análise das identidades médias calculadas para os quirópteros brasileiros foi de 90,28% para os nucleotídeos e 97,09% para os aminoácidos.

As identidades em porcentagem entre nucleotídeos e aminoácidos intra e intergrupos encontrados para o gene *N* encontram-se nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Identidades em porcentagem de nucleotídeos para o gene *N* dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para amostras de RABV - São Paulo – 2009

Continua

Grupo	Identidade		
	Média (%)	Mínima (%)	Máxima (%)
1 x 1	95,91	92,7	100,0
1 x 2	89,25	88,5	92,8
1 x 3	88,04	87,4	88,5
1 x 4	88,73	88,4	89,3
1 x 5	88,82	87,6	89,7
1 x 6	86,89	85,9	87,6
1x 7	87,29	86,4	88,1
1 x 8	83,62	82,8	84,4
1 x 9	88,09	87,2	88,6
1 x 10	89,66	88,7	90,9

Tabela 3 – Identities em porcentagem de nucleotídeos para o gene *N* dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para amostras de RABV - São Paulo – 2009

Continua

Grupo	Identidade		
	Média (%)	Mínima (%)	Máxima (%)
1 x 11	89,74	89,0	90,4
2 x 2	99,28	98,6	100,0
2 x 3	88,62	88,3	89,0
2 x 4	89,05	88,6	89,4
2 x 5	88,88	88,5	89,3
2 x 6	86,89	86,1	87,4
2 x 7	87,67	86,4	87,9
2 x 8	82,95	81,9	84,1
2 x 9	88,44	87,2	88,6
2 x 10	89,47	87,6	90,8
2 x 11	89,38	87,6	90,8
3 x 3	99,72	99,6	100,0
3 x 4	90,67	90,3	91,1
3 x 5	90,01	89,7	90,3
3 x 6	88,06	87,2	88,5
3 x 7	89,85	89,1	91,3
3 x 8	84,21	82,9	84,8
3 x 9	90,34	90,0	90,8
3 x 10	88,58	87,0	91,1
3 x 11	91,38	90,4	92,6
4 x 4	98,10	97,3	99,6
4 x 5	93,01	92,8	93,2
4 x 6	88,07	86,6	88,9
4 x 7	89,54	88,0	89,8
4 x 8	83,58	82,9	85,0
4 x 9	90,32	88,3	90,8
4 x 10	89,55	88,7	91,8
4 x 11	88,54	88,3	92,5
5 x 5	99,51	99,0	100,0
5 x 6	88,70	87,7	89,4
5 x 7	88,47	88,0	88,8
5 x 8	83,68	82,9	84,5
5 x 9	90,76	90,4	91,3
5 x 10	90,11	89,3	91,4
5 x 11	91,61	90,8	92,3
6 x 6	92,83	99,8	89,3
6 x 7	86,43	84,5	87,1
6 x 8	83,74	82,7	84,4
6 x 9	84,92	83,9	89,0
6 x 10	85,29	83,5	88,9
6 x 11	85,25	83,9	90,0
7 x 7	98,15	96,7	100,0
7 x 8	83,46	82,2	84,8
7 x 9	88,53	88,3	88,9

Tabela 3 – Identities em porcentagem de nucleotídeos para o gene N dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para amostras de RABV - São Paulo – 2009

Grupo	Conclusão		
	Identidade		
	Média (%)	Mínima (%)	Máxima (%)
7 x 10	89,21	87,4	90,3
7 x 11	90,47	89,9	91,0
8 x 8	93,76	91,1	99,8
8 x 9	84,03	83,1	85,6
8 x 10	85,14	83,0	86,6
8 x 11	84,96	84,1	86,8
9 x 9	98,30	97,7	99,2
9 x 10	90,51	89,2	91,3
9 x 11	92,19	91,7	92,6
10 x 10	94,04	91,1	98,9
10 x 11	91,63	90,7	92,7
11 x 11	98,02	95,4	99,6

Tabela 4 – Identities em porcentagem de aminoácidos para a proteína putativa N dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene, isolados de RABV - São Paulo – 2009

Grupo	Continua		
	Identidade		
	Média (%)	Mínima (%)	Máxima (%)
1 x 1	99,24	98,7	100,0
1 x 2	97,38	97,2	98,0
1 x 3	96,22	96,0	96,7
1 x 4	96,38	96,0	96,7
1 x 5	96,47	96,0	97,0
1 x 6	96,41	96,0	97,2
1 x 7	95,41	95,0	96,3
1 x 8	93,95	92,6	95,3
1 x 9	95,94	95,5	96,7
1 x 10	96,31	95,3	97,5
1 x 11	96,69	96,3	97,7
2 x 2	99,75	99,5	100,0
2 x 3	96,47	96,3	96,7
2 x 4	97,35	97,0	97,7
2 x 5	97,45	97,0	98,0
2 x 6	96,23	95,8	96,7
2 x 7	96,09	95,8	96,7
2 x 8	94,59	93,5	95,5
2 x 9	96,15	95,8	96,5

Tabela 4 – Identities em porcentagem de aminoácidos para a proteína putativa N dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene, isolados de RABV - São Paulo – 2009

Continua

Grupo	Identidade		
	Média (%)	Mínima (%)	Máxima (%)
2 x 10	96,58	95,5	97,5
2 x 11	97,08	96,7	97,7
3 x 3	100,00	100,0	100,0
3 x 4	96,58	96,3	97,0
3 x 5	96,36	97,0	97,5
3 x 6	97,00	97,0	97,0
3 x 7	98,82	96,7	97,2
3 x 8	95,28	94,3	95,8
3 x 9	97,30	97,2	97,5
3 x 10	97,17	96,3	98,0
3 x 11	97,87	97,7	98,2
4 x 4	99,13	98,7	99,7
4 x 5	97,83	97,2	98,5
4 x 6	96,47	97,2	97,0
4 x 7	95,97	95,5	96,7
4 x 8	94,90	93,5	95,8
4 x 9	97,73	96,5	97,5
4 x 10	96,85	95,8	97,7
4 x 11	97,21	96,7	98,0
5 x 5	99,72	99,2	100,0
5 x 6	97,00	96,7	97,2
5 x 7	96,91	96,3	97,2
5 x 8	94,82	93,5	95,5
5 x 9	96,72	93,5	98,2
5 x 10	96,77	95,5	97,5
5 x 11	97,50	97,2	97,7
6 x 6	98,13	97,2	100,0
6 x 7	96,21	96,0	96,7
6 x 8	94,53	93,3	95,3
6 x 9	96,91	96,7	97,2
6 x 10	96,80	95,8	97,7
6x11	97,07	96,7	97,5
7 x 7	99,50	99,0	100,0
7 x 8	95,32	94,3	96,3
7 x 9	96,60	96,5	97,0
7 x 10	96,35	95,0	97,2
7 x 11	96,91	96,7	97,7
8 x 8	97,93	95,8	99,5
8 x 9	94,38	93,3	95,3
8 x 10	96,13	94,0	97,5
8 x 11	96,13	95,0	97,5
9 x 9	99,47	99,2	100,0

Tabela 4 – Identities em porcentagem de aminoácidos para a proteína putativa N dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene, isolados de RABV - São Paulo – 2009

Grupo	Identidade		
	Média (%)	Mínima (%)	Máxima (%)
9 x 10	96,69	100,0	100,0
9 x 11	97,44	97,2	98,0
10 x 10	97,94	96,5	100,0
10 x 11	97,89	96,5	98,7
11 x 11	99,50	99,0	100,0

Entre os seis agrupamentos encontrados neste estudo, as maiores identidades médias encontradas na comparação intra grupos estão no grupo 3, sendo 99,72% em nucleotídeos e 100% em aminoácidos.

As menores identidades médias encontradas na mesma comparação estão no grupo 6, correspondendo a 92,83% em nucleotídeos e 98,13% em aminoácidos.

Na comparação intergrupos, as maiores identidades médias tanto para nucleotídeos quanto para aminoácidos foram encontradas entre os grupos 4 e 5, com valores de 93,01% e 97,84 % respectivamente.

As menores identidades médias encontradas na comparação intergrupos são de 86,89% em nucleotídeos, tanto para os grupos 1 e 6 quanto para os grupos 2 e 6, e 96,22% em aminoácidos entre os grupos 1 e 3.

4.5.2 Gene G

As identidades médias para todos os isolados presentes na árvore filogenética foram 88,07% para nucleotídeos e 93,04% para aminoácidos.

As identidades médias calculadas para os isolados dos quirópteros brasileiros foram de 88,91% para nucleotídeos e 93,52% para aminoácidos.

As identidades em porcentagem entre nucleotídeos e aminoácidos intra e intergrupos encontrados para o gene G encontram-se nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Identities de nucleotídeos para o gene *G* dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para isolados de RABV - São Paulo - 2009

Grupo	Identidade		
	Média (%)	Mínima (%)	Máxima (%)
1 x 1	95,46	92,2	100,0
1 x 2	88,32	87,6	89,4
1 x 3	88,32	87,6	89,2
1 x 4	87,73	87,0	89,1
1 x 5	87,30	86,4	89,2
1 x 6	85,23	83,2	86,8
1 x 7	85,16	84,4	86,8
1 x 8	82,77	81,7	84,1
2 x 2	98,80	97,9	100,0
2 x 3	87,37	86,7	88,0
2 x 4	88,49	0,9	89,1
2 x 5	88,70	87,9	89,2
2 x 6	85,32	83,2	86,4
2 x 7	86,89	85,9	87,9
2 x 8	81,18	79,7	82,2
3 x 3	99,67	99,5	99,8
3 x 4	89,83	89,4	90,1
3 x 5	89,42	88,9	89,7
3 x 6	86,52	85,2	87,1
3 x 7	89,42	88,9	90,0
3 x 8	82,40	81,3	83,4
4 x 4	98,07	97,4	99,4
4 x 5	91,72	91,3	92,0
4 x 6	87,26	85,2	87,9
4 x 7	86,69	86,1	87,4
4 x 8	81,90	81,3	82,8
5 x 5	99,31	98,0	100,0
5 x 6	86,57	85,0	87,3
5 x 7	87,52	86,7	88,5
5 x 8	82,33	81,3	83,2
6 x 6	93,35	87,3	99,5
6 x 7	85,53	83,1	87,1
6 x 8	82,30	79,2	84,1
7 x 7	97,58	96,4	100,0
7 x 8	82,25	81,4	83,2
8 x 8	93,99	88,2	99,8

Tabela 6 – Identities de aminoácidos para a proteína putativa G dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para isolados de RABV - São Paulo – 2009

Grupo	Identidade		
	Média (%)	Mínima (%)	Máxima (%)
1 x 1	97,39	94,6	100,0
1 x 2	93,24	91,4	96,4
1 x 3	94,66	93,7	95,0
1 x 4	92,21	91,4	93,2
1 x 5	92,88	90,5	95,5
1 x 6	90,42	88,7	93,2
1 x 7	93,82	92,8	94,6
1 x 8	90,80	88,7	91,9
2 x 2	99,51	98,2	100,0
2 X 3	92,05	91,4	92,3
2 X 4	90,42	89,2	91,4
2 X 5	90,65	89,2	91,4
2 X 6	88,31	86,5	91,0
2 x 7	92,21	91,4	92,8
2 x 8	89,32	86,9	90,5
3 x 3	96,67	99,5	100,0
3 X 4	94,43	94,1	94,6
3 X 5	94,33	93,7	95,0
3 X 6	92,10	91,0	94,6
3 x 7	96,43	95,5	96,8
3 x 8	90,57	88,7	91,4
4 x 4	99,80	98,2	100,0
4 X 5	95,36	95,0	95,5
4 X 6	90,78	89,6	93,2
4 x 7	92,97	92,3	93,2
4 x 8	90,00	88,3	91,4
5 x 5	99,47	98,2	100,0
5 X 6	90,57	89,2	92,8
5 x 7	94,24	93,2	95,0
5 x 8	89,31	87,4	90,1
5 x 12	88,34	87,4	89,2
6 x 6	97,05	94,1	100,0
6 x 7	91,98	90,5	93,7
6 x 8	89,35	86,9	91,0
7 x 7	99,51	98,2	100,0
7 x 8	91,59	89,6	92,3
8 x 8	96,13	91,0	100,0

Entre os seis grupos analisados neste estudo, as maiores identities médias intra grupos para nucleotídeos e aminoácidos foram encontradas no grupo 3 sendo respectivamente 99,67% e 99,67%.

As menores identidades intra grupos estão no grupo 6, correspondendo a 93,35% para nucleotídeos e 97,05% para aminoácidos.

Na comparação intergrupos, a maior identidade média em nucleotídeos e aminoácidos foi encontrada na comparação do grupo 4 com o grupo 5, com valores de 91,72% e 95,36% respectivamente.

As menores identidades médias encontradas na comparação intergrupos foram 85,23% para nucleotídeos na relação entre os grupos 1 e 6, e 88,31% para aminoácidos, valor encontrado na relação entre os grupos 2 e 6.

4.6 ANÁLISES DE MUDANÇAS E MARCADORES MOLECULARES NAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS TRADUZIDAS A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DE DNA

As metodologias empregadas para a análise das substituições nos aminoácidos para as proteínas putativas dos genes estudados no presente estudo estão apresentadas nos itens a seguir.

Os nomes e abreviaturas dos aminoácidos estão descritos no quadro 10 (LODISH, et al., 2005)

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

Quadro 10 - Nomenclatura, símbolos e abreviatura dos 20 aminoácidos traduzidos á partir do código genético, adaptado de Lodish et al., (2005) - São Paulo - 2009

4.6.1 Gene *N*

A análise global dos sítios variáveis em relação aos 1.218 nucleotídeos e 406 aminoácidos analisados foi feita com três alinhamentos múltiplos diferentes.

No primeiro alinhamento composto por todos os isolados presentes na árvore filogenética do gene *N* com exceção das duas amostras do VSV usadas como grupo externo (94 seqüências), foi observado uma variação de 487 nucleotídeos e 81 aminoácidos.

O segundo alinhamento utilizou 65 seqüências, o que corresponde as 64 seqüências de DNA de quirópteros brasileiros presentes no alinhamento múltiplo para a o gene *N* acrescidas do vírus fixo PV. Neste alinhamento foram encontrados 434 sítios variáveis entre os nucleotídeos e 59 entre os aminoácidos.

O terceiro alinhamento foi composto pelas 64 seqüências representativas dos quirópteros brasileiros, sendo que neste caso foram observados 413 sítios de variação para os nucleotídeos e 49 para os aminoácidos.

Para a análise das principais mudanças ocorridas entre os aminoácidos foi utilizado o segundo alinhamento, uma vez que a o vírus fixo PV serviu arbitrariamente de parâmetro para a análise destas mudanças encontradas. O isolado 3208/06 não foi contemplado nesta análise por não se encontrar em nenhum dos grupos encontrados neste trabalho.

Foram encontradas possíveis mudanças de aminoácidos específicas para alguns gêneros dos morcegos brasileiros analisados neste estudo (Quadro 11).

Posição	PV	Mudança	Grupo	Classificação
56	V	V → I	Todos os grupos com exceção do grupo 3	I: apolar V: apolar
68	D	D → E	Grupo 3	D: polar negativo E: polar negativo
84	T	T → S	Grupo 7	T: polar neutro S: polar neutro
104	T	T → K	Grupo 4	T: polar neutro K: polar positivo
179	V	V → A	Grupo 7	V: apolar A: apolar
252	T	T → S	Grupo 2	T: polar neutro S: polar neutro
267	E	E → G	Grupo 1	E: polar negativo G: polar neutro
368	E	E → D	Grupo 1	E: polar negativo G: polar neutro
379	V	V → M	Grupo 3	M: apolar
		V → T	Grupo 7	V: apolar T: polar neutro
394	Y	Y → N	Grupo 3	Y: polar neutro N: polar neutro
433	A	A → S	Grupo 2	A: apolar S: polar neutro

Quadro 11 - Substituições de aminoácidos para a proteína N específicas para gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

Foram analisados os aminoácidos localizados nas seguintes regiões da nucleoproteína viral:

- Sítio de ligação da nucleoproteína ao RNA viral (posição 298 até 352): nesta região foram observadas três mudanças de aminoácidos em relação ao vírus fixo PV (Quadro 12)

Posição	PV	Mudança	Grupo/Amostra	Classificação
331	A	A → S	2107/06 <i>L. ega</i> (grupo 6)	A: apolar S: polar neutro
332	A	A → T	Todos os grupos	A: apolar T: polar neutro
336	H	H → Q	3640/05 <i>N. laticaudatus</i> (grupo 5)	H: polar positivo Q: polar neutro

Quadro 12 - Substituições de aminoácidos para o sítio de ligação ao RNA viral da proteína N específicas para gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

- Sítio antigênico I (posição 358 até 367): esta região apresentou uma mudança de aminoácido para os grupos 2, 4 e 5 (Quadro 13).

Posição	PV	Mudança	Grupo	Classificação
367	Q	Q → K	Grupos 2, 4 e 5	Q: polar neutro K: polar positivo

Quadro 13 - Substituições de aminoácidos para o sítio antigênico I da proteína N específicas para gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

- Sítio antigênico III (posição 313-337): duas mudanças de aminoácidos, em relação ao vírus fixo PV foram encontradas neste sítio antigênico (Quadro 14).

Posição	PV	Mudança	Grupo/Amostra	Classificação
331	A	A → S	2107/06 <i>L. ega</i> (grupo 6)	A: apolar S: polar neutro
332	A	A → T	Todos os grupos	A: apolar T: polar neutro

Quadro 14 - Substituições de aminoácidos para o sítio antigênico III da proteína N específicas para gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

- Sítio antigênico IV (posição 359-366 e 375-383): os oito aminoácidos da primeira região do sítio antigênico IV não apresentaram mudanças em nenhum dos isolados. As mutações ocorridas na segunda região deste sítio antigênico encontram-se no quadro 15.

Posição	PV	Mudança	Grupo	Classificação
377	T	T → A	Grupos 7 e 9	T: polar neutro A: apolar
378	D	D → E	Todos os grupos	D: polar neutro E: polar neutro
	V	V → A	Grupos 1, 2 e 5	V: apolar
379		V → M	Grupo 3	A: apolar
		V → T	Grupo 7	M: apolar T: polar neutro

Quadro 15 - Substituições de aminoácidos para o sítio antigênico IV da proteína N específicas para gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

- Peptídeo antigênico 31D (aminoácidos 404 - 418): está região age como epítopo para linfócitos T auxiliares, apresentando duas substituições como mostrado no quadro 16.

Posição	PV	Mudança	Grupo/Amostra	Classificação
410	I	I → M	Todos os quirópteros	I: apolar M: apolar
414	G	G → S	1068/07 <i>L. ega</i> e 2654/06 <i>L. cinereus</i> (grupo 6)	G: polar neutro S: polar neutro

Quadro 16: - Substituições de aminoácidos para o sítio antigênico 31D da proteína N específicas para gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

- A serina (S) 389: necessária para a fosforilação da nucleoproteína: esta posição se mostrou conservada em todas as seqüências.

4.6.2 Gene G

A análise global dos sítios variáveis em relação aos 670 nucleotídeos correspondentes a 223 aminoácidos do gene *G* foi realizada com três alinhamentos múltiplos diferentes.

No primeiro, foram analisadas todas as 76 seqüências utilizadas para a construção da árvore filogenética menos a do VSV. Para este conjunto de dados, nos 670 nucleotídeos

analisados, são observados 287 sítios variáveis, enquanto na seqüência correspondente de 223 aminoácidos 67 sítios sofreram variação.

O segundo alinhamento corresponde às 69 seqüências de DNA de quirópteros brasileiros presentes no alinhamento múltiplo para a o gene *G* acrescidas do vírus fixo PV. Neste caso são observados 272 sítios variáveis entre os nucleotídeos e 61 entre os aminoácidos.

O terceiro alinhamento refere-se apenas às 69 seqüências representantes dos quirópteros brasileiros, sendo que nestas seqüências foram encontrados 260 sítios variáveis na análise dos nucleotídeos e 53 na análise dos aminoácidos.

Para a análise das principais mudanças ocorridas entre os aminoácidos, foram utilizadas todas as seqüências de DNA presentes no segundo alinhamento, uma vez que a amostra PV serviu arbitrariamente de parâmetro para a análise destas mudanças.

Foram analisadas a seguintes regiões da glicoproteína:

- Domínio de fusão dependente de baixo pH (aminoácidos 102 - 179): nesta região de 78 aminoácidos, 19 sofreram substituições como mostrado no quadro 17.

Posição	PV	Mudança	Grupo/Amostra	Classificação
107	R	R → H	AB110667 (Grupo 7)	R: polar neutro H: polar positivo
109	T	T → M/I T → M T → I	Grupos 1 e 2 Grupos 4, 5 e 6 Grupo 7	T: polar neutro M: apolar I: apolar
110	P	P → S	Grupo 5	P: apolar S: polar neutro
117	Y	Y → H	1068/07 (<i>L. ega</i>), AB373640 e AB373639 (Grupo 6)	Y: polar neutro H: polar positivo
118	N	N → D	1068/07 (<i>L. ega</i>), AB373640 e AB373639 (Grupo 6)	N: polar neutro D: polar negativo
121	M	M → V M → T	Grupos 5 e 3 Grupo 4	M: apolar V: apolar T: polar neutro
129	E	E → D	Grupo 6	E: polar negativo D: polar negativo
132	H	H → Q	Grupos 3, 4, 5, 6 e 7 (exceção AB110665)	H: polar positivo Q: polar neutro
137	D	D → E	AB247427 e AB247426	D: polar negativo E: polar negativo
145	K	K → T K → R	Grupo 2 6673/05 <i>N. laticaudatus</i> (grupo 3)	K: polar positivo T: polar neutro R: polar neutro
152	V	V → I	Grupos 1, 2 (com exceção de 3 amostras), 3, 4, 5 e 7	V: apolar I: apolar
160	D	D → N	Grupos 2 e 4 (2 amostras)	D: polar negativo N: polar neutro
166	R	R → K	Todas as amostras	R: polar neutro K: polar positivo
169	H	H → R	Grupos 4 e 5	H: polar positivo R: polar neutro
172	V	V → I	AB383166 (grupo1) e Grupo 5 (Exceto amostra 2378/05 <i>N. laticaudatus</i>)	V: apolar I: apolar
175	G	G → S	6 amostras do grupo 1, grupos 3, 4 e 6.	G: polar neutro S: polar neutro
176	G	G → R	Amostra 9397/05 (grupo 5)	G: polar neutro R: polar neutro
177	N	N → K	Todas as amostras	N: polar neutro K: polar positivo
179	S	S → L S → M	Grupo 1, 3, 4, 5, 6 e 7 Grupo 2	S: polar neutro L: apolar M: apolar

Quadro 17 - Substituições de aminoácidos para o domínio de fusão dependente de baixo pH da proteína G encontradas nos gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

- Sítio antigênico II (aminoácidos 34-42 e 198-200): na primeira região deste sítio, os aminoácidos 35-41 não sofreram mudanças em nenhuma das seqüências, enquanto na segunda região os aminoácidos 198 e 199 também mantiveram suas posições conservadas. As mudanças nos aminoácidos localizados no sítio antigênico II encontram-se no quadro 18

Posição	PV	Mudança	Grupo/Amostra	Classificação
34	S	S → T	Grupo 6 (exceto 2107/06 <i>L. ega</i>)	S: polar neutro T: polar neutro
42	S	S → T	1542/05 <i>M. nigricans</i> e 4157/05 <i>M. nigricans</i> (Grupo 2)	S: polar neutro T: polar neutro
200	E	E → V	Grupo 6 (exceto 2107/06 <i>L. ega</i>)	E: polar negativo V: apolar

Quadro 18 - Substituições de aminoácidos para o sítio antigênico II da proteína G encontradas nos gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

Na análise dos quatro aminoácidos importantes na patogenia viral contemplados nos 223 aminoácidos analisados (33, 132, 147, 198), foi observada variação apenas na posição 132 (Quadro 19).

Posição	PV	Mudança	Grupo/Amostra	Classificação
132	H	H → Q	Grupos 3, 4, 5 e 6	H: polar positivo Q: polar neutro

Quadro 19 - Substituição no aminoácido 132 para a proteína G encontrada nos gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

No estudo referente às possíveis mudanças de aminoácidos específicas para gêneros de morcegos insetívoros brasileiros, foram encontradas 12 substituições relacionadas no quadro 20.

Posição	PV	Mudança	Grupo	Classificação
3	P	P → H	Grupo 4	P: apolar H: polar positivo
10	P	P → L	Grupo 1	P: apolar L: apolar
12	L	L → V	Grupo 5	L: apolar V: apolar
		L → M	Grupo 4	M: apolar
28	D	D → E	Grupo 4	D: polar negativo E: polar negativo
48	V	V → A	Grupo 2	V: apolar A: apolar
49	V	V → A	Grupo 6	V: apolar A: apolar
52	E	E → D	Grupo 6	E: polar negativo D: polar negativo
110	P	P → S	Grupo 5	P: apolar S: polar neutro
121	M	M → T	Grupo 4	M: apolar T: polar neutro
129	E	E → D	Grupo 6	E: polar negativo D: polar negativo
145	K	K → T	Grupo 2	K: polar positivo T: polar neutro
187	Y	Y → F	Grupo 2	Y: polar neutro F: apolar

Quadro 20 - Substituições de aminoácidos para a proteína G específica para gêneros de morcegos brasileiros incluídos no presente estudo – São Paulo - 2009

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, isolados de vírus da raiva de diferentes gêneros de morcegos insetívoros do Brasil tiveram os genes *N* e *G* sequenciados e analisados em conjunto com seqüências recuperadas do Genbak, tendo sido encontradas sete diferentes linhagens específicas relacionadas a sete gêneros de morcegos insetívoros brasileiros.

Entre os 67 isolados a partir de sistema nervoso central de camundongos, submetidos à RT-PCR para o gene *N*, 66 resultaram positivos, enquanto que, dos 57 isolados submetidos à RT-PCR para o gene *G*, 54 resultaram positivos.

Pode-se sugerir que um título viral fora do limiar de detecção das duas técnicas de RT-PCR aqui utilizadas teria sido a causa da negatividade para as amostras sabidamente positivas para a raiva; entretanto, uma vez que as amostras de RABV em questão são de primeira e segunda passagens, em camundongos sacrificados com sintomatologia nervosa característica da raiva, e/ou positivas para a IFD, é pouco provável que esta seja uma causa relevante.

Além desta possibilidade, sabe-se que o excesso de RNA total na transcrição reversa e/ou excesso de c-DNA na fase de PCR pode inibir as respectivas reações, gerando resultados falso-negativos (KRIEG; JOHNSON, 1996), mas, uma vez que o vírus fixo CVS, altamente adaptado ao modelo biológico camundongo, manteve-se sempre positiva quando incluída como controle positivo nas RT-PCRs, pode-se sugerir que, teoricamente, não haveria excesso de título viral em isolados ainda em adaptação ao mesmo modelo.

Inibidores presentes nas amostras de sistema nervoso central de camundongos, como por exemplo RNAses, podem também levar a resultados falso-negativos (KRIEG; JOHNSON, 1996), mas o fato de que todas as amostras são da mesma natureza (SNC de *Mus musculus*), foram manipuladas sob as mesmas condições e apresentaram positividade de 98,5% para o gene *N* e 94,7% para o gene *G*, sugere que os inibidores não foram os responsáveis pela ausência de amplificação dos genes *N* e *G*.

Ainda, período e condições de armazenamento das amostras de SNC poderiam levar o RNA viral à degradação, impossibilitando sua detecção, mas, como todas as amostras foram armazenadas e conservadas sob as mesmas condições (-80 °C) e durante períodos similares, seria esperado que este fator, se fosse de fato relevante, levasse a uma menor freqüência de

positividade, interferindo nos resultados de um número maior de amostras; paralelamente, erros inerentes à realização da técnica são também pouco prováveis, uma vez que cada amostra negativa foi submetida a três tentativas de amplificação antes de ser considerada negativa.

Assim, divergências nos sítios de hibridação dos *primers* podem ser responsáveis pela não amplificação de algumas amostras, o que só poderá ser comprovado através do seqüenciamento do sítio de hibridação de tais amostras em estudos futuros.

Dada a elevada acurácia utilizada durante esta investigação na edição das seqüências de DNA, com o intuito de conferir confiabilidade a cada posição seqüenciada, alguns dos isolados de RABV seqüenciados não foram incluídos nas análises genealógicas subseqüentes, por falhas na geração de sinal de seqüências.

Por exemplo, dos 66 isolados positivos na RT-PCR para o gene *N*, 65 foram submetidos à reação de seqüenciamento de DNA a partir dos respectivos produtos de PCR, dos quais 40 resultaram escores de eletroferograma suficientes para serem utilizados na análise filogenética.

Além disso, entre os 54 isolados positivos na RT-PCR para o gene *G*, 52 foram submetidos ao seqüenciamento de DNA para este gene, sendo que 45 resultaram em escores de eletroferograma suficientes para serem utilizados na análise genealógica.

As causas das falhas inerentes aos baixos escores obtidos na análise dos eletroferogramas para alguns dos isolados podem ser primariamente devidas à baixa concentração de DNA utilizada na reação de seqüenciamento, uma vez que vários isolados foram submetidos ao seqüenciamento com a concentração mínima de DNA necessária para o tamanho do fragmento seqüenciado.

Como já sugerido anteriormente para o caso de ausência de amplificação por PCR em isolados sabidamente positivos para a raiva, falhas de execução cometidos ao longo dos procedimentos de seqüenciamento de DNA provavelmente não desempenharam papel para a ausência de sinal de fluorescência ou para os baixos escores obtidos para alguns fragmentos amplificados dos genes *G* e *N*, uma vez que cada amostra foi seqüenciada pelo menos três vezes antes de ser descartada da análise genealógica.

Assim, com as seqüências de DNA obtidas, a análise genealógica dos isolados estudados nesta pesquisa demonstrou que os mesmos segregaram em seis grupos com elevados valores de bootstrap (Figuras 2 e 3), grupos estes particulares aos gêneros de morcegos insetívoros dos quais os isolados foram obtidos, considerando tanto o gene *N* quanto o gene *G*.

Entretanto, apesar da mesma classificação em linhagens gênero-específicas terem emergido quando se consideram os 29 isolados para os quais se obtiveram seqüências de ambos os genes, foram observadas diferenças nas topologias das duas árvores em relação à ancestralidade entre os grupos, considerando-se as raízes das árvores e grupos de seqüências não relacionadas aos quirópteros.

Dentre estas, a mais evidente diferença topológica relaciona-se aos isolados provenientes da linhagem viral que tem como reservatórios os canídeos brasileiros. Para o gene *N*, as seqüências de canídeos obtidas no GenBank apresentaram divergência próxima à raiz da árvore, separando-se do grande agrupamento de morcegos (Figura 2), enquanto que na árvore para o gene *G* (Figura 3), a linhagem de canídeos não está a parte do grande grupo dos morcegos, sendo que esta linhagem e o grupo 6 segregaram em agrupamentos separados, mas que constituem agrupamentos irmãos com valor de bootstrap de 68.

Esta mesma topologia de árvores pode ser observada em pesquisa conduzidas por Kobayashi et al. (2005) para o gene *N*, e Sato et al. (2004) para o gene *G*.

Pode-se sugerir que estes diferentes padrões de segregação para os genes *N* e *G* sejam devidos aos diferentes processos de seleção exercidos nestes genes durante a história evolutiva destas linhagens, relacionados às diferentes funções exercidas por cada uma das proteínas codificadas (HOLMES, et al., 2002).

A glicoproteína está diretamente envolvida em ligação aos receptores celulares, é alvo para neutralização viral e importante para a patogenicidade do RABV, apresentando de fato uma maior taxa de mutação (KISSI et al., 1999; HOLMES et al., 2002; WUNNER, 2007).

Considerando-se isto, se diferentes hospedeiros, como por exemplo, diferentes gêneros de quirópteros, apresentarem pequenas diferenças estruturais no receptor de membrana celular para a glicoproteína do RABV, diferentes linhagens virais com glicoproteínas com maior afinidade por esta ou aquela subclasse de receptor podem ter sido favorecidas e selecionadas, estabelecendo-se de modo independente em cada tipo de hospedeiro.

Paralelamente, considerando-se as elevadas restrições funcionais exercidas sobre a proteína *N* (WUNNER, 2007), substituições de aminoácidos que impeçam sua função levam a progênies virais incapazes de se propagar, refletindo numa menor taxa de mutação para o gene que a codifica (KISSI et al., 1999; HOLMES et al., 2002). Sendo assim, a pressão de seleção para o gene *N*, é possivelmente exercida por proteínas intracelulares do hospedeiro envolvidas no ciclo

de replicação viral, de elevada restrição funcional e, portanto, pequena taxa de mutação. Com isso as pressões de seleção para o gene *N* em diferentes hospedeiros, provavelmente apresentem maior concordância com a própria filogenia das espécies hospedeiras.

A existência dos grupos gênero-específicos para os dois genes estudados, sem considerar as diferenças topológicas em relação à raiz da árvore, pode-se associar este evento aos diferentes caminhos evolutivos de uma mesma quasi-espécie ancestral do vírus da raiva, quando em interação com diferentes gêneros de morcegos, resultando disto as linhagens atuais apresentadas nos nós terminais de cada uma das árvores.

Explanando de outro modo, cada gênero de morcego pode ter levado à seleção de uma quasi-espécie ancestral do RABV de modo diferente, originando as linhagens gênero-específicas encontradas neste estudo, o que embasado pelo fato de que uma mesma linhagem de RABV pode, após baixa passagem, resultar em mutações associáveis a dado tipo de hospedeiro (KISSI et al., 1999).

A heterogeneidade de isolados de RABV expressa genealogicamente sob a forma de agrupamentos associáveis a específicos tipos de mamíferos é um fato já relatado para uma série diversa de hospedeiros, como canídeos, guaxinins, cangambás norte-americanos, primatas não-humanos e quirópteros (DIAZ et al., 1994; DE MATTOS et al., 1996; DE MATTOS et al., 2000; ITO et al., 2001; FAVORETO et al., 2002; RUPPRECHT et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007; CARNIELI JR et al., 2007).

Dentre os fatores que podem ser apontados para a gênese da heterogeneidade das linhagens do RABV, inclui-se a duração da infecção, a rota de transmissão, a carga viral, a resposta imune do hospedeiro e interações entre as proteínas virais e dos hospedeiros (KISSI et al., 1999).

Outro fator importante para essa heterogeneidade é inerente à falta de mecanismo de correção de replicação e reparação dos vírus RNA, a qual resulta na geração das quasi-espécies sobre as quais se exercerão os processos seletivos. Esta mesma característica de ausência de atividade corretiva 3'-5' é associada à DNA polimerase utilizada nas PCRs aqui descritas para a geração de fragmentos de DNA a serem seqüenciados, o que pode levar a artefatos de técnica por inserção de nucleotídeos errôneos, podendo resultar em interpretações genealógicas inaccuradas (KISSI et al., 1999).

Entretanto, uma evidência importante ainda não sugerida para o RABV é que o processo de seleção e adaptação dos vírus aos seus hospedeiros está intimamente ligado ao repertório de RNAs transportadores disponíveis no citoplasma das células hospedeiras em questão, e sua afinidade com os códons presentes no genoma dos vírus, para que estes possam ser reconhecidos pelo RNAs transportadores do hospedeiro e assim serem traduzidos em proteínas (JENKINS, HOLMENS, 2003; SHACKELTON, HOLMES, 2008).

A consequência direta desta relação é que diferentes populações quasi-espécie ancestrais de RABV com diferentes códons, podem ter apresentado diferentes relações de afinidade com os anti-códons disponíveis, de acordo com a disponibilidade deste ou daquele tRNA considerando-se espécies distintas de mamíferos, levando-se em conta a degeneração do código genético, sendo aqueles com complementaridade elevada códon-anticódon selecionados, originando as linhagens atuais e aqueles com baixa complementaridade, eliminados.

Por exemplo, considerando-se o aminoácido serina, sabe-se que quatro diferentes códons permitem sua incorporação a uma cadeia de peptídeos: UCU, UCC, UCA e UCG, havendo, portanto, no máximo quatro tRNAs possíveis; se uma dada linhagem de RABV possuir o códon UCU e o hospedeiro ao qual esta linhagem está em fase de adaptação não apresentar o tRNA e maior afinidade específico para este códon, mas sim para um dos outros três códons para este aminoácido, esta linhagem de RABV não terá sucesso em inserir serina em suas proteínas.

Entretanto, se o contrário ocorrer, esta linhagem será eficiente em inserir serina em suas proteínas, estendendo-se o conceito para os demais códons e anti-códons, resultando na manutenção de um dado conjunto de códons e, portanto, de determinadas assinaturas genéticas sinônimas mas distinguíveis entre linhagens de RABV.

Com isto, se cada gênero de morcegos de fato apresentar diferentes utilizações preferenciais de códons, isto pode ter se refletido nas linhagens de RABV ao longo do tempo evolutivo, resultando numa íntima seleção hospedeiro-parasita em um nível molecular.

Em relação às identidades intra e intergrupos para as seis linhagens gênero-específicas encontradas, a análise das seqüências do gene *G* resultou em identidades intragrupos, tanto em nucleotídeos quanto em aminoácidos, sempre maiores que a identidades intergrupos (Quadros 14 e 15).

Para o gene *N*, o mesmo resultado é observado para as identidades entre os aminoácidos, no entanto, entre os nucleotídeos há uma exceção na relação entre os grupos 4 e 5, que

apresentaram uma identidade de nucleotídeos de 93,01%, que é superior à menor identidade intra grupos encontrada entre os três isolados de morcegos do grupo 6 que foi de 92,83% (Tabelas 3 e 4).

Isto pode ser explicado pelo fato de que um número restrito de isolados com valores muito divergentes entre si foram utilizadas para a formação do grupo 6, sendo, a partir deste estudo, necessária a adição de um número mais amplo de isolados de RABV detectados em *Lasiurus* para verificar este fato.

Para critérios de classificação genética das linhagens de RABV, foram inicialmente utilizados apenas os dados referentes ao gene codificador da nucleoproteína, pois é este o gene mais conservado do vírus da raiva e mais apropriado para este fim, quando não se dispõe do genoma completo do vírus (HUGHES et al., 2005).

Devido ao número de isolados contidos em cada grupo ser variável (de 3 a 17 amostras), e não ter sido feito um estudo estatístico para o conhecimento do número de amostras necessárias para a comprovação da hipótese de gênero especificidade para todas as linhagens do RABV aqui descritas, considera-se como mais significativo o que foi observado nos grupos com maior número de amostras, ou seja, grupo 1 (10 amostras), grupo 2 (12 amostras) e grupo 5 (17 amostras).

Sendo assim, dentro do grupo 1 foi observada, em termos de nucleotídeos, uma identidade mínima de 92,7% e máxima de 100%, enquanto que, para os aminoácidos, estes valores variaram de 98,7% e 100%.

No grupo 2 a variação das identidades em nucleotídeos ficou entre 98,6% e 100%. Já em aminoácidos, estes valores variaram de 99,5% e 100%.

Para o grupo 5, as variações de identidades observadas em relação aos nucleotídeos foram de 99,0% e 100% e em relação aos aminoácidos foram de 99,2% e 100%.

O fato de as identidades encontradas para todos os grupos serem maiores para os aminoácidos, em relação aos nucleotídeos, pode ser explicado pelo predomínio de mutações sinônimas em relação às mutações não sinônimas encontradas no gene *N*.

Segundo os dados apresentados, relativos aos morcegos do Estado de São Paulo, pode-se sugerir que para os grupos 1, 2 e 5, as identidades mínimas encontradas são pontos de corte para sua classificação em um destes três grupos.

Com relação ao alinhamento do gene *N*, foi observado que os isolados dos grupos 10 e 11, provenientes dos gêneros *Myotis* e *Eptesicus* existentes na América do Norte, apresentaram valores de porcentagens de identidades em seqüências de nucleotídeos e aminoácidos maiores que alguns dos valores encontrados na relação entre diferentes grupos dos isolados de morcegos brasileiros (Tabelas 3 e 4). Isto indica que para o caso da raiva em morcegos, o fator hospedeiro é tão importante quanto o fator geográfico para a diferenciação e evolução das linhagens, visto que em função do isolamento geográfico entre morcegos de um mesmo gênero após a emergência de uma dada linhagem gênero-específica, pode-se esperar a emergência de padrões regionais para estas linhagens.

Paralelamente, pode-se sugerir que diferentes linhagens existentes em morcegos de um mesmo gênero, mas com localização geográfica diferente, possam ter, ao contrário, emergido após a separação geográfica destas populações de morcegos de um mesmo gênero, os quais só então adquiriram suas linhagens de RABV que evoluíram de modo independente.

Para o gênero *Myotis*, sabe-se que sua origem no novo mundo ocorreu há aproximadamente 10 milhões de anos, sendo que especiação mais recente para este gênero data de aproximadamente 5 milhões de anos (STADELMANN et al., 2006).

Somando-se a isso o fato de que a emergência do primeiro *Lyssavirus* em quirópteros aconteceu há no máximo aproximadamente 11.000 anos (BADRANE, TORDO, 2001), é mais provável a hipótese de que primeiro as populações de morcegos se estabeleceram de modo isolado em seus habitats por milhões de anos antes de se originarem as diversas linhagens do RABV que se originaram a partir de linhagens ancestrais distintas.

Ponderando as mutações ocorridas nas seqüências de aminoácidos putativas para as duas proteínas estudadas, também se observam claramente os padrões distintos de evolução destas linhagens de acordo com os seus diferentes hospedeiros.

Para a proteína *N*, o sítio de ligação do RNA viral à nucleoproteína mostrou-se bastante conservado, sendo observadas mutações em apenas quatro aminoácidos. Isto é esperado porque esta é uma região com uma função importante durante o encapsidamento do RNA genômico (WUNNER, 2007), o que permite inferir que os vírus isolados estavam de fato se replicando com eficiência.

Outra região que se manteve conservada para todas as linhagens do RABV contidas na análise genealógica do gene *N* foi a serina 389, necessária para a fosforilação da nucleoproteína

(WUNNER, 2007). Este fato confere grande confiança ao resultado das reações de seqüenciamento e filogenia para este gene.

Buscando estabelecer a analogia entre a classificação genética e antigênica dos mesmos isolados, não se encontrou relação entre estas classificações quando foi utilizado o painel de oito anticorpos monoclonais descrito por Diaz et al. (1994), uma vez que isolados com um mesmo perfil antigênico (C4 C10 C12), se agruparam em linhagens distintas. Este padrão de reação é um dos quatro padrões de reações não previstos neste painel, que foram observados em isolados analisados neste trabalho (Quadro 9). Os três padrões de reações incompatíveis caracterizados como C4 C9 C10, C4 C10 C12 e C12, já haviam sido descritos por Favoretto et al., (2002), mas o paralelismo entre assinaturas antigênicas e genéticas não havia sido investigado.

Três isolados representativos da linhagem *Myotis*, apresentaram o perfil antigênico esperado para a espécie *Tadarida brasiliensis* (variante antigênica 4).

Um dos isolados do grupo 3 (2136/06) foi classificado antigenicamente como pertencente a variante antigênica 6, definida para a espécie *Lasiurus cinereus* (grupo 6).

O compartilhamento dos mesmos epítomos nas diferentes linhagens do RABV encontradas neste estudo pode ser um dos motivos pela falta de acurácia para da classificação antigênica com este painel.

Assim sendo, na utilização dos genes *N* e *G* para uma diferenciação mais acurada das seis linhagens de RABV encontradas em morcegos insetívoros neste estudo, podem-se propor as seguintes posições de aminoácidos como assinaturas moleculares específicas para estas linhagens:

Grupo 1: nucleoproteína G267, D368; glicoproteína L10.

Grupo 2: nucleoproteína S252, S433; glicoproteína A48, T145 e F187.

Grupo 3: nucleoproteína E68, M379, N394.

Grupo 4: nucleoproteína K104; glicoproteína H3, M12, E28, T121.

Grupo 5 glicoproteína V12, S110.

Grupo 6 glicoproteína A49, D52, D129.

Embora não fosse objetivo deste estudo, encontraram-se também para a linhagem associada ao morcego hematófago *D. rotundus*, caracterizada antigenicamente como variante antigênica 3, marcadores moleculares para nucleoproteína viral nos aminoácidos S84, A179 e T379.

Ainda que marcadores moleculares tenham sido encontrados para todas as seis linhagens referentes a este estudo, é mais sensato que apenas sejam considerados como preditivos de linhagens aqueles encontrados nos grupos 1, 2 e 5, pois, como exposto anteriormente, estes grupos foram aqueles representados pelo maior número de isolados de RABV.

Assim sendo, para questões de epidemiologia molecular onde é preciso a discriminação do animal agressor em um caso de suspeita de raiva, um determinado isolado pode ser classificado com segurança como sendo originário do gênero *Myotis* do gênero *Eptesicus*, ou do gênero *Nyctinomops* por meio de sequenciamentos de DNA referentes às regiões nucleotídicas correspondentes aos aminoácidos citados anteriormente.

Além disso, uma vez que foram detectadas substituições de aminoácidos, inclusive por classes químicas diferentes, em sítios antigênicos e regiões importantes funcionalmente nas duas proteínas putativas, pode-se especular que existam também diferenças antigênicas detectáveis entre estas linhagens, as quais poderiam ser utilizadas para a padronização de um painel de anticorpos monoclonais mais adequado para a sua classificação e utilização pela rede de laboratórios participantes da vigilância epidemiológica da raiva.

Em função das significativas relações de gênero-especificidade encontradas na árvore genealógica obtida para o gene *N*, foram observadas seis isolados de RABV que não corresponderam as linhagens caracterizadas para os seus reservatórios nos grupos 2, 3, 5 e 7:

De modo similar, na árvore genealógica obtida para o gene *G* este fenômeno foi observado para três amostras de RABV, nos grupos 2, 3 e 5, sendo que, para duas delas, a topologia foi à mesma para os genes *G* e *N*.

O que pode explicar este fato é o evento conhecido como salto inter-espécies (*spillover*), no qual um dado reservatório é infectado com uma linhagem de um patógeno não característico da sua espécie, um evento já estabelecido para a raiva sendo descrito para várias espécies de mamíferos de diferentes regiões (HOLMES, 2002).

Esta possibilidade torna-se mais plausível considerando-se o fato de que os morcegos de diferentes famílias podem compartilhar um mesmo abrigo, o que favorece a transmissão do RABV entre eles (UIEDA, 1995)

Para o gene *N* foram encontrados *spillovers* referentes aos isolados: AB201807 proveniente de um morcego classificado como *N. laticaudatus* infectado com a linhagem representativa do grupo 2; amostra 9569/06 referente ao RABV isolado de um morcego

classificado como *N. laticaudatus* infectado com a provável linhagem encontrada para o grupo 3; amostra 4356/07 isolada da espécie *M. molossus* e amostras AB297649 e AB297648 isoladas de morcegos classificados com *T. laticaudata*, infectadas com a linhagem representativa do grupo 5; e finalmente a amostra AB297633 isolada da espécie *M. rufus* e classificada como sendo da linhagem encontrada para o grupo 7 (*D. rotundus*).

Para o gene *G*, os *spillovers* encontrados foram relacionados aos isolados: AB383172, proveniente de um morcego da espécie *N. laticaudatus* infectada com a linhagem característica do grupo 2; amostra 4356/07 isolada de um espécime *M. molossus* infectado com a linhagem característica do grupo 5; e amostra 9569/06 referente ao RABV isolado de um morcego classificado como *N. laticaudatus* infectado com a provável linhagem encontrada para o grupo 3.

Além dos isolados agrupados em linhagens gênero-específicas correspondentes aos gêneros de seus reservatórios e dos isolados classificados como *spillover*, ainda foram encontrados, para cada gene, um isolado que não se agrupou em nenhuma das linhagens estabelecidas. Para o gene *N*, o isolado 3208/06 recuperado de um morcego da espécie *E. furinalis*, e, para o gene *G*, o isolado 5882/06 proveniente de um morcegos da espécie *M. nigricans* não obtiveram classificação

Considerando-se estas duas amostras, para a sua caracterização como linhagens ainda não estabelecidas, ou mesmo como *spillovers* de linhagens gênero-específicas não contempladas neste estudo, é necessário encontrar, em pesquisas futuras, outros isolamentos geneticamente próximos a elas.

Os resultados discutidos neste estudo já foram temas de outros artigos e teses e mostraram resultados concordantes aos encontrados nesta pesquisa (FAVORETTO et AL., 2002; KOBAYASHI et al.. 2005; CUNHA, 2006; KOBAYASHI, 2007).

No entanto, o número de amostras, a diversidade de gêneros, a análise simultânea dos genes *N* e *G* e os métodos de análise utilizados não haviam sido realizados para amostras brasileiras de RABV isoladas de morcegos insetívoros, o que possibilitou o aprimoramento de resultados obtidos por outros autores e o aprofundamento na discussão destes.

Estudos evolutivos com os isolados analisados na presente investigação poderão melhor elucidar a relação filogenética entre diferentes linhagens de RABV que têm como reservatórios os morcegos, além permitir inferir dados sobre a idade e dinâmica dos processos co-evolutivos parasita-hospedeiro destas linhagens de RABV.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente pesquisa e embasados pela literatura consultada permitiram chegar-se às conclusões que se seguem:

- Com base em seqüenciamento de DNA parcial para os genes *N* e *G*, isolados do vírus da raiva de morcegos insetívoros do Estado de São Paulo podem ser classificados em três grupos genéticos gênero-específicos, a saber: *Myotis*, *Eptesicus* e *Nyctinomops*.
- As genealogias obtidas com os seqüenciamentos parciais dos genes *N* e *G* foram concordantes quanto aos agrupamentos de isolados do vírus da raiva.
- Não houve concordância entre a classificação antigênica com anticorpos monoclonais dirigidos para a nucleoproteína viral e a classificação obtida com base no seqüenciamento parcial do gene *N*.
- Para os agrupamentos de vírus da raiva próprios de *Myotis*, *Eptesicus* e *Nyctinomops* brasileiros, foram identificados marcadores moleculares específicos, que permitem sua distinção de outras linhagens do vírus da raiva.
- Foram identificados diferentes tipos de mutações nas seqüências de aminoácidos para a nucleoproteína e para a glicoproteína, nas regiões de importância funcional e imunológicas entre isolados de vírus da raiva associados a quirópteros brasileiros.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organization Panamericana de la Salud, 2003. v. 2, p.351-383.
- ACHA; P. N.; ARAMBULO, P. V. III. Rabies in the tropics, history and current status. , In: KUWERT, E.; MERIEUX, C.; KOPROWSKI, H.; BÖGEL, K. **Rabies in the tropics**. Berlin: Springer-Verlag., p. 343-359, 1985
- ALMEIDA, M. F.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; SILVA, M. M. S. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Revista da. Saúde Pública**, v. 28 n. 5, p. 341-344, 1994.
- ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, D. New *Lyssavirus* Genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrghzatan. **Emerging Infectious Diseases**. v. 9, n. 3, p. 333-337, 2002.
- BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in Lyssavirus history from Chiroptera to the Carnivora orders. **Journal of virology**. v. 75, n.17, p. 8096-8104, 2001.
- BARBOSA, T. F.; MEDEIROS, D. B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; CASSEB, L. M.; MEDEIROS, R.; PEREIRA, A. S.; VALLINOTO, A. C.; VALLINOTO, M.; BEGOT, A. L. LIMA, R. J.; VASCONCELOS, P. F.; NUNES, M. R. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. **Virology**. v. 370, n. 2, p. 228-36, 2008.
- BRASS, D. A. Monoclonal antibody characterization of bat-rabies isolates.. In: BRASS, D. A. **Rabies in bats: natural history and public health implications**. Connecticut: Livia Press, p. 189-206, 1994.
- CARINI, A. Sur une grande Épizootie de rage. **Annales de L'Institut Pasteur (Paris)**, v. 25, p. 843-846, 1911.
- CARNIELI, P. **Produção de sondas genéticas não-radioativas para o diagnóstico do vírus rábico pela técnica de RT-PCR e imunoquimioluminescência**.1999. 98p. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, 1999.

CARNIELI JR., P., FAHL, W. O.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R. S. P.; MORATO, R. G.; SPÍNDOLA, R. O.; MACHADO, L. M.; ÚNGAR DE SÁ, J. E.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Characterization of *Rabies vírus* isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 131, p. 33-46.

CASTILHO, J. C.; IAMAMOTO, K.; LIMA, J. Y. O.; SCHEFFER, K. C.; CARNIELI JR, P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; ACHKAR, S. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**. v. 4, n. 47, p. 12-18, 2007.

CHILDS, J. E.; REAL, L. A. Epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER W. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007 .p. 123-199.

CUNHA, E. M. S.; SILVA, L. H. Q.; LARA, M. C. C. S. H.; NASSAR, A. F. C.; ALBAS, A.; SODRÉ, M. M.; PEDRO, W. A. Bat rabies in the North-northwestern regions of the state of São Paulo, Brazil: 1997-2002. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 6, p. 1082-1086, 2006.

CUNHA, E. M. S. **Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos. Avaliação da Patogenicidade e proteção cruzada em camundongos**. 2006. 98 p. (Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.

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

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: WHO.1996. p. 88-95

DE MATTOS, C. A.; FAVI, M.; YUNG, V.; PAVLETIC, C.; DE MATTOS, C. C. Bat rabies in urban centers in Chile. **Journal of wildlife diseases**, v. 36, p. 231-240, 2000.
DE MATTOS, C. A.; DE MATTOS, C. C.; SMITH, J. S.; MILLER, E. T.; PAPO, S.; UTRERA, A.; OSBURN, B. I. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, p. 1553-1558, 1996.

DIAZ, A.; M.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic Analysis of Rabies-virus Isolates from Latin América and the Caribbean. **Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 41, n. 153-160, 1994.

EWING, B.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. II. Error Probabilities. *Genome Research*, v.8, p. 186-194, 1998.

FAUQUET, E. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELGERGER, U.; BALL, L. A. Virus taxonomy. In: **Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 8th ed San Diego: Academic press. 2005. p. 630-634.

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

FINKE, S.; COX, H. J.; CONZELMANN, K. K. Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene. **Journal of Virology**, v. 74, n. 16, p. 7261-7269, 2000.

GREGORIN, R.; TADDEI, V. A. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). **Journal Neotropical Mammalogy**, v.9, n.1, p.13-32, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**. v. 41, p. 95-98, 1999.

HOLMES, E. C.; WOELK, C. H.; KASSIS, R.; BOURHY, H. Genetic Constraints and Adaptive Evolution of Rabies Virus in Nature. **Virology**, v. 292, p. 247-257, 2002.

HUGHES, G. J.; ORCIARI, L. A.; RUPPRECHT, C. E. Evolutionary timescale of rabies virus adaptation to North American bats inferred from the substitution rate of the nucleoprotein gene. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1467-1474, 2005.

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

JENKINS, G. M.; HOLMES, E. C. The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. **Virus Research**, v.92, p. 1-7, 2003.

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus., In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: WHO, 1996. p.3-8.

KISSI, B.; TORDO, N.; BOUHY, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. **Virology**, v. 209, p. 526-537, 1995.

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

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E. M. S.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Molecular Epidemiological Analysis of Bat Rabies Viruses in Brazil. **The Journal of veterinary medical science**, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; KATO, M.; ITOU, T.; CUNHA, E. M. S.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. **Archives of virology**, v. 153, n. 11, p. 1995-2004, 2007.

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

KOTAIT, E.; CARRIERI, M. L.; CARNIELI JR, P.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; SCHEFFER, K. C.; ACHKAR, S. M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 2-8, 2007.

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

KUZMIN, I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T.; SMITH, J. S.; HALON, C. A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C. E. Bat lyssaviruses (*Aravan* and *Khujand*) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. **Virus Research**, v. 97, p. 65-79, 2003.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDARIA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P. *Biologia Celular e Molecular*. In: **Mecanismos básicos da genética molecular**. 5th ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.119.

MEBATION, T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p. 11496-11502, 2001.

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

PAWAN, J. L. The transmission of rabies in Trinidad by the vampire bat. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 30, p. 101-130, 1936.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, p. 327-343, 2002.

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

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y. MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S. M.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic and Phylogenetic Analysis of Glicoprotein of Rabies Virus Isolated from Several Species in Brazil. **Journal of veterinary and medical science**, v. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.

SCATTERDAY, J. E.; GALTON, M. M. Bat rabies in Florida. **Veterinary Medicine**, v. 49, p. 133-135, 1954.

SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. The role of alternative genetic codes in viral evolution and emergence. **Journal of Theoretical Biology**, v. 254, p. 128-134, 2008.

SILVA, A. R. Isolamento de vírus rábico de morcego não-hematófago da espécie *Phyllostomus hastatus hastatus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 4, p. 115-120, 1961

STADELMANN, B.; LIN, K. L.; KUNZ, T. H.; RUED, M. Molecular phylogeny of New World Myotis (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 32-48, 2007.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2001. 1 CD-ROM.

TADDEI, V. A. Morcegos: algumas considerações sistemáticas e biológicas. **Bol. Tec. Coord. Assist. Téc. Integral** v. 172, p. 1-31, 1983.

TORDO, N. Characterization and molecular biology of rabies virus.. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: WHO, 1996. p 28-51

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

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, N. F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 3914-3918, 1986b.

UIEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOMES, SILVA, M. M. S. Espécies de quirópteros diagnosticados com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**, v. 1, p. 17-35, 1996.

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

VELASCO-VILLA, A.; GÓMEZ-SIERRA, M.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, G.; JUÁREZ-ISLAS, V.; MELÉNDEZ-FÉLIX, A.; VARGAS-PINO, F.; VELÁZQUEZ-MONROY, O.; FLISSER, A. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 951-958, 2002.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. A chave para determinação de quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto, São Paulo. **Boletim de Ciências**, n.1, p.1-72, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Consultation on Rabies**. 1° Report. (Technical Report Series, 931). 2004. World Health Organization, Geneva.

WUNNER,H. W. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, H. W. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p 23-111.

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