

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTABILIDADE ANTIGÊNICA E PATOGENIA DE AMOSTRAS DO VÍRUS
RÁBICO APÓS SUCESSIVAS INOCULAÇÕES EM CAMUNDONGOS.**

Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista

Porto Alegre

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTABILIDADE ANTIGÊNICA E PATOGENIA DE AMOSTRAS DO VÍRUS
RÁBICO APÓS SUCESSIVAS INOCULAÇÕES EM CAMUNDONGOS.**

**Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista`*
Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva – Virologia Veterinária**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

Porto Alegre

2007

*** Médica Veterinária , ULBRA 2003/2**

Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista

**ESTABILIDADE ANTIGÊNICA E PATOGENIA DE AMOSTRAS DO VÍRUS
RÁBICO APÓS SUCESSIVAS INOCULAÇÕES EM CAMUNDONGOS.**

Aprovada em 15 de janeiro de 2007

APROVADA POR

Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

Prof. Dr. Amauri Simoneti

Prof. Dr. Celso dos Anjos

Prof. Dr. Rudi Weiblen

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aurea Beatriz e Luiz Carlos, por me mostrarem “desde sempre” a importância da educação, por me incentivarem incondicionalmente e me darem exemplo de dignidade e coragem. Sem este apoio, com certeza, isto não seria possível. À minha pequena família (Céres, Aurinha, Laura e Júlia) por estarem sempre presentes, com alegria e carinho. Ao meu marido Vicente, por me incentivar sempre a seguir em frente, independente do quão tortuoso possa ser o caminho e agüentar todas as minhas ausências e o meu estresse.

Ao meu orientador Paulo Michel Roehle, pela grande oportunidade de trabalhar com virologia; pela confiança, incentivo e amizade; enfim, por todo aprendizado que um grande pesquisador pode transmitir.

À Dra. Ana Cláudia Franco e ao Dr. Frans Rijsewijk, pela grande ajuda técnica e emocional e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À Dra. Rejane Schaefer, pelo “convite” para trabalhar com o vírus da raiva.

Ao Eduardo Schmidt por todo aprendizado prático, principalmente nos trabalhos com camundongos.

À todos os colegas de laboratório, já que sem a formação de uma equipe não haveria resultados tão promissores.

Ao Dr. Augusto Cunha, diretor do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - IPVDF e os demais funcionários deste Instituto, por permitirem a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, gostaria de deixar explícito aqui o meu agradecimento a todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte deste trabalho.

Muito obrigada !!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	06
LISTA DE FIGURAS	07
LISTA DE ABREVIATURAS	08
RESUMO	09
ABSTRACT	10
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1 O vírus rábico (VR)	11
1.2 Proteínas virais	12
1.3 Replicação do vírus	13
1.4 Patogenia	14
1.5 Sinais clínicos	15
1.6 Diagnóstico	16
1.6.1 Diagnóstico sorológico	17
1.7 Epidemiologia	18
1.7.1 Ciclo urbano	18
1.7.2 Ciclo silvestre	19
1.7.3 Situação da raiva no Brasil	19
1.8 Caracterização e variabilidade de amostras do VR	21
2. OBJETIVOS	23
3. CAPÍTULO 1- Análise de amostras do vírus da raiva isoladas nas regiões norte e centro oeste do Brasil com anticorpos monoclonais anti-lissavírus	24
5. CAPÍTULO 2- Estabilidade antigênica do vírus da raiva após vinte sucessivas passagens em camundongos	38
6. CAPÍTULO 3- Estabilidade antigênica de amostras do vírus da raiva após inoculações seriadas em camundongos	51
7. CAPÍTULO 4- Discussão geral	65
8. CAPÍTULO 5- Conclusões	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Membros do gênero <i>lyssarirus</i> : classificação genotípica e distribuição geográfica -----	11
Tabela 2. Principais vetores da raiva silvestre e sua distribuição geográfica -----	21
Tabela 3. Amostras analisadas e perfís de reatividade frente ao painel de anticorpos monoclonais (AcMs) anti-lyssavirus -----	34
Tabela 4. Perfil de reatividade das amostras VR1, VR2 e VR3 frente aos AcMs DB3, DB4, L18 e L26 capazes de diferenciar antigenicamente tais amostras -----	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama representando as proteínas do vírus rábico -----**12**
- Figura 2.** Esquema demonstrativo da transmissão e patogenia do vírus rábico -----**15**
- Figura 3.** Taxa de mortalidade: percentagem de camundongos mortos de cada grupo inoculado em cada dia pós inoculação (dpi) da amostra VR1. Dados com 2, 5, 10, 15 e 20 inoculações sucessivas em camundongos (2P, 5P, 10P, 15P e 20P). Os dados estão representados com uma variação de 20% entre as colunas.-----**58**
- Figura 4.** Taxa de mortalidade: percentagem de camundongos mortos de cada grupo inoculado em cada dia pós inoculação (dpi) da amostra VR2. Dados com 2, 5, 10, 15 e 20 inoculações sucessivas em camundongos (2P, 5P, 10P, 15P e 20P). Os dados estão representados com uma variação de 20% entre as colunas.-----**58**
- Figura 5.** Taxa de mortalidade: percentagem de camundongos mortos de cada grupo inoculado em cada dia pós inoculação (dpi) da amostra VR3. Dados com 2, 5, 10, 15 e 20 inoculações sucessivas em camundongos (2P, 5P, 10P, 15P e 20P). Os dados estão representados com uma variação de 20% entre as colunas.-----**59**
- Figura 6.** Título viral infeccioso das amostras VR1, VR2 e VR3 com 2, 5, 10, 15 e 20 inoculações sucessivas em camundongos (2P, 5P, 10P, 15P e 20P). A titulação viral foi realizada em camundongos de 21 dias -----**59**

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcM (s) - anticorpo (s) monoclonal (is)
- ABL - “Australian Bat Lyssavirus”
- BHK - “Baby Hamster Kidney”
- CER - “Chicken Embrio Rellated”
- CVS-31 - “Challenge Virus Standard” –31
- DICC₅₀ - doses infectantes em 50% do cultivo celular
- EBL 1 - “European Bat Lyssavirus” 1
- EBL 2 - “European Bat Lyssavirus” 2
- ELISA “Enzyme-linke immunosorbent assay”
- E-MEM - “Eagle’s Minimum Essential Medium”
- FITC - “Fluorecein Isotiocianate Conjugated”
- G - glicoproteína
- IFD - imunofluorescência direta
- IFI - imunofluorescência indireta
- L - polimerase viral
- MIT – “Mouse intracerebral test”
- MNT – “Mouse neutralization test”
- M1 ou P - fosfoproteína
- M2 - proteína de preenchimento ou matriz
- N- nucleoproteína
- PBS - “Phosphate-buffered saline”
- PV - Pasteur vírus
- RNA- “Ribonucleic acid”
- RT-PCR – “Reverse-trnscriptase Polymerase chain reaction”
- SFB - soro fetal bovino
- SNC - sistema nervoso central
- VR - vírus da raiva

ESTABILIDADE ANTIGÊNICA E PATOGENIA DE AMOSTRAS DO VÍRUS RÁBICO APÓS SUCESSIVAS INOCULAÇÕES EM CAMUNDONGOS.

RESUMO

A raiva é uma zoonose causada pelo vírus da raiva (VR), um membro do gênero *Lyssavirus* da família *Rhabdoviridae*. Apesar do VR ser considerado antígenicamente estável, amostras com variações antigênicas têm sido detectadas. Na busca de identificar possíveis variantes circulantes no Brasil, um dos objetivos do presente estudo foi identificar as características antigênicas de amostras de vírus rábico circulantes nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil. Para tanto, amostras do VR coletadas naquelas regiões, isoladas de diferentes hospedeiros, tiveram seu perfil antigênico avaliado por imunofluorescência indireta frente a um painel de anticorpos monoclonais preparados contra antígenos de lissavírus. Foram identificados três perfís antígenicamente distintos: um característico de amostras de origem de cães domésticos, outro de amostras de morcegos hematófagos e outro de amostras de morcegos não hematófagos. O segundo objetivo deste estudo consistiu em avaliar a estabilidade antigênica e a patogenia de amostras com tais perfís antigênicos distintos. Para atingir este objetivo, três amostras de VR com diferentes perfís antigênicos foram submetidas a vinte inoculações sucessivas em camundongos. À medida em que as passagens eram realizadas, o perfil antigênico das mesmas era monitorado. Os resultados obtidos revelaram que todas as amostras mantiveram-se relativamente estáveis e todas as amostras ao longo as 20 inoculações mantiveram altamente patogênicas. Duas delas (a amostra com perfil antigênico de cães e a amostra com perfil antigênico de morcegos hematófagos) mantiveram-se antígenicamente estáveis ao longo de todas as 20 inoculações. Por outro lado a amostra com perfil antigênico usualmente detectado em morcegos não hematófagos apresentou uma modificação antigênica após a sétima passagem sucessiva. Isto pode indicar diferenças no grau de adaptação do vírus à espécie hospedeira natural. Sumarizando os resultados desses estudos, conclui-se que as variantes do VR circulantes nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil possuem características antigênicas comuns a amostras cujos hospedeiros naturais são cães domésticos, morcegos hematófagos e morcegos não hematófagos. As variantes detectadas apresentam um elevado grau de estabilidade antigênica; a variante cujo hospedeiro natural são morcegos não hematófagos parece menos estável antígenicamente. Essa menor estabilidade antigênica poderia ter relação com o grau de adaptação à espécie hospedeira natural, hipótese que será examinada mais profundamente em estudos futuros.

Palavras-chave: vírus da raiva, caracterização antigênica; variantes

ANTIGENIC STABILITY AND PATOGENY ON RABIES VIRUS STRAINS AFTER CONSECUTIVE INOCULATIONS IN MICE.

ABSTRACT

Rabies is caused by rabies virus (RV), a member of the genus Lyssavirus within the family Rhabdoviridae. Despite the acknowledged antigenic stability of RV, variants have been identified. In search for RV variants circulating in Brazil, one of the objectives of the present study was to identify the antigenic profile of RV isolates from different natural host species in North and Central West regions of Brazil. The isolates had its antigenic profiles determined by indirect immunofluorescence with a panel of monoclonal antibodies prepared to lyssavirus antigens. Three distinct antigenic profiles were detected: one characteristic of isolates from domestic dogs, another in isolates from vampire bats and another in non haematophagous bats. A second aim of the present study was to evaluate the degree of antigenic stability and patogeny of RV isolates with such distinct antigenic profiles. For that, three RV isolates were submitted to twenty successive inoculations in mice and periodically monitored in search for antigenic alterations. The results obtained revealed that in fact the three isolates were quite stable antigenically and all strains after 20 consecutive inoculations maintained highly patogenics. Two of the viruses (dog and vampire bat profiles) remained antigenically stable throughout the twenty successive passages in mice. On the other hand, the isolate with an antigenic profile commonly found in non haematophagous bat viruses revealed an antigenic modification after the seventh passage in mice. This could be indicative of differences in the degree of adaptation of the isolate to its natural host species. Summarizing the results of these studies, it was concluded that RV variants circulating in the Centre-West and North regions of Brazil display antigenic profiles common to those usually detected in isolates whose natural hosts are domestic dogs, haematophagous and non hematophagous bats. Such variants display a relatively high degree of antigenic stability; however, the variant whose natural hosts are non haematophagous bats seem less antigenically stable. Such lesser degree of antigenic stability might be related to the degree of adaptation of the virus to its natural host species. Such hypothesis shall be examined more deeply in future studies.

Key-words: rabies virus, antigenic characterization and variants

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O vírus rábico (VR):

O VR é um RNA vírus, de fita simples não segmentado, pertencente à família *Rhabdoviridae*, sendo considerado o protótipo do gênero *Lyssavirus*.

Já foram identificados, até o momento, sete genótipos do VR: o genótipo 1, também denominado vírus da raiva clássica, inclui todas as amostras de vírus da raiva propriamente dito. Os demais genótipos constituem aqueles vírus denominados “vírus relacionados à raiva”, sendo formado pelos demais membros do gênero. O genótipo 2 corresponde ao vírus denominado Lagos bat, o genótipo 3 corresponde ao vírus Mokola, o 4, ao vírus Duvenhage; o 5, ao vírus denominado “European Bat Lyssavirus 1”, ou EBL1; o 6 corresponde ao “European Bat Lyssavirus 2” ou EBL2 e o genótipo 7, correspondente ao lyssavírus australiano de morcegos, ou “australian bat lyssavirus” (ABL, Bourhy et al., 1993; Amengual et al., 1997; Gold et al., 1998). Características do VR estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Membros do gênero *lyssavirus*: classificação genotípica e distribuição geográfica.

Genótipos do VR	Nomenclatura	Distribuição geográfica
Genótipo 1	Vírus da Raiva	Mundial
Genótipo 2	Lagos bat	África,
Genótipo 3	Mokola	África,
Genótipo 4	Duvenhage	África,
Genótipo 5	European Bat Lyssavirus 1 (EBL1)	Europa
Genótipo 6	European Bat Lyssavirus 2 (EBL 2)	Europa
Genótipo 7	Australian Bat Lyssavirus (ABL)	Austrália

Bourhy et al, 1993; Amengual et al, 1997; Gold et al, 1998.

1.2 Proteínas virais:

O genoma do VR codifica cinco proteínas: nucleoproteína (N), glicoproteína (G), fosfoproteína (M1 ou P), proteína de preenchimento ou matriz (M2) e polimerase viral (L) (Tordo, 1996). As duas primeiras (N e G) são as mais extensamente estudadas (Figura 1).

A proteína N é um polipeptídeo com 450 aminoácidos e está intimamente associada ao RNA viral, protegendo-o da ação de ribonucleases (Tordo et al, 1986). A proteína N desempenha papel fundamental na regulação da transcrição do RNA viral, assim como na replicação do mesmo através da encapsidação do RNA genômico recém sintetizado.

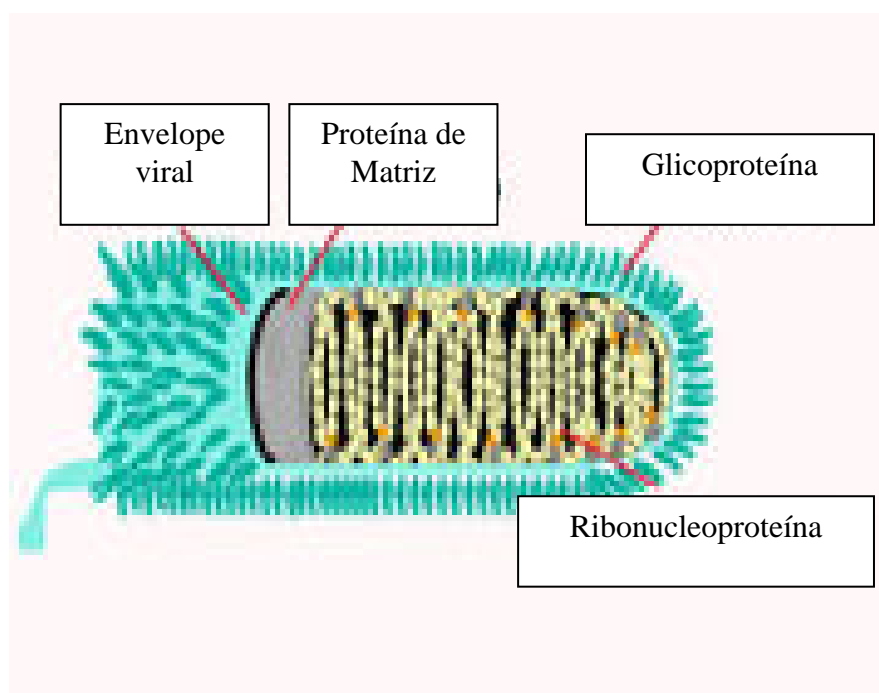


Figura 1: Diagrama representando as proteínas do vírus rábico.
(adaptado de: <http://fiona.umsmed.edu/~yar/zoo.html>)

1.3 Replicação do vírus:

A glicoproteína, juntamente com receptores celulares é responsável pela fixação do VR à célula hospedeira (Tordo, 1996). Ocorre, então, a adsorção à célula hospedeira e posteriormente a internalização. A entrada do vírus na célula se dá através de fusão do envelope viral com a membrana endossomal (Whitt et al, 1991, Tsiang, 1993) o genoma viral é liberado no citoplasma, onde ocorre a transcrição e replicação.

Ocorre primeiramente a transcrição de uma seqüência líder com 50 nucleotídeos, seguida de síntese de 5 mRNAs monocistrônicos codificando sucessivamente as proteínas N, P, M, G e L (Tordo et al, 1986). A fim de controlar esta progressão seqüencial, sinais de início (S) e de parada da transcrição ou poliadenilação (P), são reconhecidos pelo complexo de transcrição. Acredita-se que ocorra a dissociação do complexo a cada sinal de parada da transcrição e reinício no próximo sinal de transcrição. Como consequência deste fato há uma gradual diminuição na taxa de transcrição da região 3', em favor da região 5' do genoma. O gene que codifica a nucleoproteína viral é o mais freqüentemente traduzido. A tradução e a síntese das proteínas N, P, M, G e L a partir de seus respectivos mRNAs, ocorre nos ribossomos livres no citoplasma. A tradução da glicoproteína inicia nos ribossomos livres, mas a finalização de sua síntese e glicosilação, ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Wunner, 1991).

O RNA nascente é encapsulado pela nucleoproteína simultaneamente à transcrição. Esta encapsidação parece induzir a mudança da transcrição para a replicação. A proteína N recém sintetizada se liga à seqüência líder no RNA e por algum mecanismo evita que os sinais de terminação da transcrição sejam reconhecidos pela polimerase viral (Wagner et al, 1996). A replicação do genoma viral é iniciada com síntese de cópias do RNA de fita positiva. A fita positiva serve como molde para a síntese de novas cópias do RNA de fita negativa. Durante o processo de montagem, o complexo N-P-L faz a encapsulação do RNA genômico fita negativa para formar o complexo RNP e a proteína M forma uma cápsula, ou matriz em torno do RNP. O complexo RNP-M migra até uma área da membrana plasmática contendo insertos de glicoproteína, onde tem início o enrolamento do

ribonucleocapsídeo (Wagner et al, 1996). Finalmente, o complexo RNP-M se liga à glicoproteína e o vírus completo brota da membrana plasmática.

1.4 Patogenia:

A maioria das infecções pelo VR é originada pela inoculação do vírus por via percutânea, através da mordida de animais infectados. O contato com ferimentos abertos e membranas mucosas e, mais recentemente, através de órgãos infectados transplantados, podem ocasionalmente levar à transmissão da raiva (Irons et al, 1957; Kent & Finegold, 1960; Winkler, 1973; Tillotson et al, 1977; King, 1993, Hellenbrand et al, 2005; Kusne et al 2005; Johson et al, 2006).

O período de incubação da raiva é muito variável após infecções naturais. Geralmente, este período é de 2 a 12 semanas. Períodos extremamente longos, superiores a um ano, também já foram relatados (Smith, et al, 1991). Isto ocorre porque diversos fatores podem estar envolvidos no tempo de evolução da infecção, como o local da mordida, a carga viral presente na ocasião da agressão, as variações na suscetibilidade da espécie envolvidas e a imunidade do animal agredido.

Após a infecção, o vírus pode replicar-se nas células musculares, próximas ao local da inoculação, antes de invadir o sistema nervoso central (SNC). Esta replicação representa um passo necessário à invasão do sistema nervoso (Tsiang, 1993). Contudo, ocasionalmente pode ocorrer a entrada direta do vírus no SNC, sem replicação prévia no músculo (Shankar et al., 1991). Uma vez infectando células neuronais o vírus é conduzido aos nervos periféricos e através de transporte axoplásmico retrógrado, ao SNC (Tsiang, 1993) (Figura 2).

No sistema nervoso, a disseminação viral resulta da combinação de fluxo axoplásmico retrógrado, transmissão célula-célula via junções sinápticas e passagem direta do vírus através de conexões intercelulares (Iwasaki, 1991). Após a infecção do sistema nervoso, o vírus espalha-se pelos nervos periféricos de forma centrífuga, para os tecidos não neuronais, distribuindo-se por todo o organismo. Antígenos virais já foram detectados em células da epiderme, folículos pilosos, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosa gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais, tecidos neuroepiteliais

dos ureteres, bexiga e uretra (Charlton, 1988). A replicação do vírus rábico nas glândulas salivares e subsequente excreção através da saliva representa o principal mecanismo de disseminação e perpetuação do vírus na natureza (Schneider, 1991).

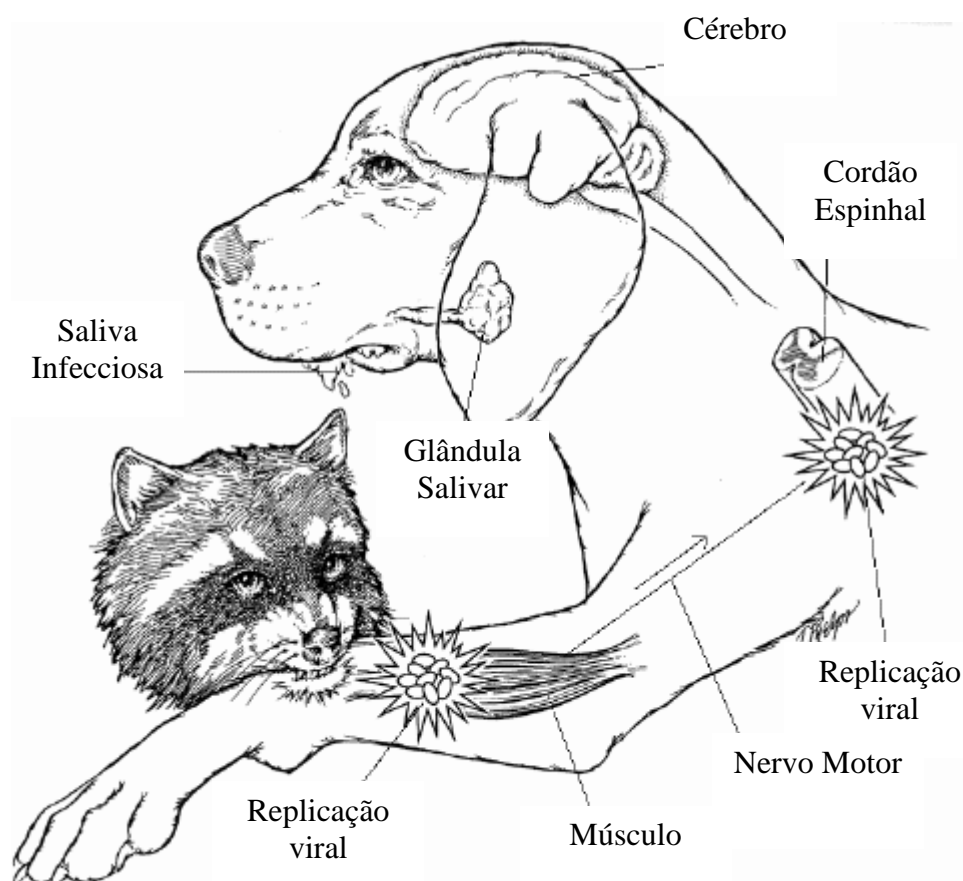


Figura 2: Esquema demonstrativo da transmissão e patogênese do vírus rábico (adaptado de: homepage.usask.ca/~.../rabiestransmission.gif)

1.5 Sinais clínicos:

Apesar da apresentação clínica da raiva ser muito variada, existem duas apresentações clássicas da doença: a forma paralítica e a forma furiosa (Mayr e Guerreiro, 1988). A primeira é mais comum em bovinos e a segunda em caninos.

Os sinais clínicos tornam-se aparentes após o envolvimento do SNC. Os sinais da raiva paralítica incluem claudicação sutil dos membros posteriores, ataxia e subsequente paresia dos membros pélvicos. Além disso, sinais de comprometimento

dos nervos lombares e sacrais podem ocorrer, provocando constipação, tenesmo, parafimose em machos e gotejamento de urina. A morte do animal ocorre devido ao comprometimento dos centros nervosos vitais (Rebuhn, 2000).

A forma furiosa da raiva caracteriza-se clinicamente por hipersensibilidade, agressividade, salivação intensa, convulsões, tremores, orelhas e olhos alertas, cegueira, pressão da cabeça, berros e opistótono. Além destes, podem ocorrer ainda sinais inespecíficos, como prurido e letargia. Os animais infectados pelo VR podem apresentar todos estes sinais ou desenvolver uma infecção inaparente que cursa sem o desenvolvimento de sinais clínicos específicos, levando à morte súbita do animal (Rebuhn, 2000).

1.6 Diagnóstico:

Infelizmente, o diagnóstico clínico da raiva ainda continua a ser o único disponível em muitos países subdesenvolvidos (King, 1993). Nesses casos, equívocos são frequentes devido à grande variabilidade de sinais clínicos e ao fato de que os mesmos podem ser provocados por outras causas de encefalites. A associação dos sinais clínicos, histórico e situação epidemiológica da enfermidade na região devem ser considerados, mas a confirmação laboratorial é fundamental para o diagnóstico definitivo.

Os primeiros passos em direção a um diagnóstico laboratorial de raiva foram dados por Pasteur, ao reproduzir a infecção através da inoculação de saliva de cães infectados em outros cães e coelhos. Mais adiante, Negri (1903) observou que certas inclusões eram visíveis no encéfalo de animais infectados. Esta prova, denominada detecção de corpúsculos de Negri (que são agregados de nucleocapsídeos no citoplasma celular; verdadeiras “fábricas” de vírions) foi durante longo período bastante utilizada no diagnóstico de raiva. Entretanto, sua sensibilidade é baixa, permitindo a detecção de cerca de aproximadamente 70 % dos casos positivos. Subseqüentemente, a identificação de antígenos virais através da técnica de imunofluorescência direta (IFD) (Kissling, 1975) passou a ser amplamente utilizada pelos laboratórios de diagnóstico, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Em um laboratório com equipamento e pessoal adequadamente treinado, a IFD chega a atingir sensibilidade próxima ou igual a 100 %. Por isso, esta técnica permanece

como o método de eleição para o diagnóstico rápido de raiva. Usualmente, a IFD é acompanhada de um teste confirmatório, que na maioria dos laboratórios baseia-se na inoculação do material suspeito em camundongos lactentes (MIT).

Buscando diminuir as necessidades de inoculação em animais, tanto por razões humanitárias como de custo, alguns laboratórios têm substituído o procedimento envolvendo camundongos pela inoculação em cultivos celulares (Webster & Casey, 1996).

Vêm sendo aplicadas ao diagnóstico e caracterização de amostras do VR técnicas moleculares de detecção do genoma viral, sendo que uma grande variedade delas encontra-se já documentada (Kissi et al, 1995; Mattos et al, 1999; Van der Poel et al, 2000; Ito et al, 2001 e 2003, Schaefer et al, 2002 e 2005; Paez et al, 2003; Carnieli et al, 2006).

Em princípio, a maioria destas técnicas busca a amplificação do genoma viral. Para tanto, é realizada uma etapa de síntese de uma cadeia de DNA complementar ao genoma viral (cDNA). Esta etapa é realizada utilizando-se uma enzima denominada transcriptase reversa, que foi originalmente encontrada nos retrovírus, e que tem a capacidade de sintetizar um polímero de DNA a partir de um “molde”, representado pelo RNA viral. Uma vez obtido o cDNA e utilizando-se outra enzima, denominada DNA polimerase, é possível amplificar esta “cópia” em DNA do genoma viral de tal forma que ao final do processo teremos milhões de cópias de DNA, representativas do vírus. Este tipo de teste que envolve uma série de passos de amplificação de DNA é denominado reação da polimerase em cadeia (Tordo et al, 1996)

1.6.1 Diagnóstico sorológico:

A detecção de anticorpos contra o VR é realizada usualmente através da técnica de soroneutralização em camundongos (MNT). Uma grande variedade de técnicas sorológicas que não utilizam animais de laboratório vem sendo desenvolvidas. Diversas linhagens celulares são suscetíveis à infecção pelo VR, sendo as células BHK e CER (Baby hamster kidney e Chiken embryo related respectivamente) as mais utilizadas (Crick, & King.; 1988, King, A.; 1996). Com a possibilidade de cultivo do VR *in vitro*, a tendência é a substituição da técnica envolvendo animais de laboratório pela SN em cultivos celulares, diminuindo assim o custo e o tempo necessário para a obtenção de resultados. A inibição da

imunofluorescência é outra técnica que têm sido empregada na investigação de anticorpos contra raiva em diferentes espécies. Além destas, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) também têm sido aplicados para a detecção de anticorpos (Elmgren, L.D. & Wandeler, A.I., 1996) Estes trazem a vantagem de serem independentes tanto de animais como de cultivos celulares.

1.7 Epidemiologia:

A raiva infelizmente permanece endêmica em diversas partes do mundo. Alguns países como a Inglaterra, Irlanda e Japão, além da Escandinávia obtiveram sucesso na erradicação da doença. A alta adaptabilidade do vírus, o qual pode adotar como reservatórios diferentes espécies, permite esta ampla distribuição (Cruz, 2000).

Na natureza, o VR é mantido por ciclos ocasionalmente inter-relacionados, denominados ciclos urbano e silvestre. O ciclo urbano envolve o cão doméstico como hospedeiro natural do vírus. Ocasionalmente, gatos, humanos e outras espécies são envolvidos nesse ciclo, tornando-se invariavelmente hospedeiros finais da infecção. No ciclo silvestre (ou, mais apropriadamente, ciclos silvestres), o vírus pode utilizar como reservatórios naturais diferentes espécies, as quais podem variar em função da fauna da região geográfica. Assim, na Europa o reservatório natural do VR em seu ciclo silvestre é a raposa (*Vulpes vulpes*); na América do Norte, além das raposas, gambás (*Mephitis mephitis*) e guaxinins (*Procyon lotor*) são também hospedeiros naturais do vírus. Na América Latina, os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são os principais hospedeiros do vírus na natureza.

1.7.1 Ciclo urbano:

Como dito acima, o ciclo urbano da raiva tem como principal hospedeiro natural o cão doméstico. A importância zoonótica da raiva é mais evidente neste ciclo, pois a principal forma da transmissão do vírus ao homem é através da mordida de cães infectados. Ocasionalmente, felinos também podem ser transmissores da raiva urbana (Schaefer et al, 2002).

Ainda em ambientes urbanos, o VR têm sido identificado em diversas espécies de morcegos não hematófagos (*Tadarida brasiliensis*, *Nyctinomops macrotis*, *Myotis Nigricans*, *Artibeus lituratus* e *Molossus molossus*) (Ridrigues, F.

M. et al, 1975, Martorelli, L. F. et al., 1995, Uieda, W. et al, 1995, Passos, E. C., et al, 1998, Cunha, E. M. et al, 2005), embora o significado epidemiológico destes achados ainda seja pouco conhecido. Não obstante, a presença de morcegos contaminados com o vírus nestes ambientes alerta para mais esta potencial fonte de contaminação.

1.7.2 Ciclo silvestre:

Os ciclos silvestres envolvem diferentes espécies animais, em distintas regiões geográficas (Tabela 02). No Brasil, os morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) são os principais reservatórios do VR neste ciclo. Estes são os principais transmissores da infecção a bovinos, fonte preferencial de alimento para esta espécie. Não obstante, na indisponibilidade de bovinos para sua alimentação, os morcegos *D. rotundus* podem atacar outras espécies na busca de alimento, inclusive a humana, como recentemente reportado na região norte do País. Em recente episódio, os morcegos hematófagos foram responsáveis por uma verdadeira epidemia de raiva humana (Gonçalves, M.A.S. et al, 2002, Sato, G. et al, 2006, da Rosa, E.S et al, 2006). Nesse episódio os habitantes da região, acostumados a dormir ao ar livre em redes, tornaram-se presas fáceis para morcegos hematófagos em busca de alimentos. Frequentemente as mordeduras eram localizadas nos membros inferiores de crianças, as quais, durante o sono, não chegavam a ser perturbadas pela pequena incisão causada pelos morcegos.

1.7.3 Situação da raiva no Brasil:

A raiva ainda é um grande problema de saúde pública em diversas partes do mundo. No Brasil, atualmente esta zoonose encontra-se em diferentes níveis de endemicidade, dependendo da região considerada. Além da região é também importante analisar a situação epidemiológica da raiva conforme o ciclo envolvido, uma vez que a manutenção do ciclo urbano da raiva oferece maiores riscos aos seres humanos. Progressos consideráveis têm sido registrados no controle da raiva no País. Programas de controle eficazes e adequadas medidas profiláticas levaram a uma acentuada redução nos casos de raiva urbana em diversos Estados. Tem sido registrado, porém, um aumento na ocorrência de raiva em herbívoros, transmitida pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Assim como têm sido maiores os

registros de casos de raiva em morcegos não hematófagos, principalmente em áreas urbanas.

No Rio Grande do Sul (RS) assim como nos demais Estados da região sul, a raiva urbana está controlada. A raiva em morcegos hematófagos permanece enzoótica, ocorrendo esporádicos surtos de raiva em bovinos.

O eficiente programa de controle adotado pelo Estado de São Paulo impulsionou a região sudeste a um decréscimo significativo nos casos de raiva urbana transmitida por cães e gatos, porém houve um aumento nos casos de raiva herbívora nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Na região Centro-Oeste do Brasil, assim como nas regiões Norte e Nordeste, a raiva urbana ainda permanece situação endêmica, elevando os números de casos de raiva humana. Além disso, trabalhos de caracterização das amostras de vírus da raiva isoladas nestas regiões, de diferentes hospedeiros, encontraram bovinos infectados com variantes caninas do VR e vice versa, situação pouco comum em regiões onde a raiva está controlada. Tais resultados demonstram a possibilidade de eventuais inter-relações entre os ciclos urbano e silvestre da raiva (Batista et al., 2006).

Tabela 2: Principais vetores da raiva silvestre e sua distribuição geográfica.

Região do mundo	Europa	Estados Unidos	América Latina
Principal vetor da raiva silvestre	Raposa	Gambá e guaxinins	Morcego hematófago, sagüís, diversas espécies de morcegos não hematófagos e canídeos selvagens

King, 1993, Uieda, W. et al, 1995, Passos, E. C., et al, 1998, Batista-Morais, N. et al, 2000

1.8 Caracterização e variabilidade de amostras do VR:

Historicamente, o VR tem sido considerado um vírus bastante estável. Isso é notório ao constatarmos que algumas das amostras de vírus vacinais ainda hoje utilizadas são derivadas do vírus isolado por Pasteur no final do século dezanove, não obstante, há pelo menos quarenta anos já eram buscadas evidências de que essa estabilidade não era absoluta. Estudos subsequentes que levaram ao desenvolvimento da vacina anti-rábica preparada em cérebro de camundongos lactentes (Fuenzalida e Palácios, 1955), amplamente utilizada na América Latina, já apontavam para diferenças antigênicas significativas entre amostras, o que levou a que fosse recomendada a utilização de três amostras diferentes de VR para a produção da vacina (Diaz et al 1989).

Já em 1970, Shope et al. demonstraram que amostras de VR eram diferenciáveis sorologicamente. Devido ao genoma composto por RNA, acreditava-se que uma inoculação em um hospedeiro não natural (ex. camundongos de laboratório), poderia alterar a constituição genômica e/ou antigênica do vírus, não mais refletindo a amostra original. Tal conceito é coerente com a natureza de quasispécie do vírus rábico. Entretanto, análises genômicas têm comprovado que após uma ou duas passagens em camundongos em laboratório, os perfís genômicos e antigênicos permanecem estáveis, apesar do potencial para apresentar variabilidade.

Nos anos 80, com a adaptação da metodologia de produção de anticorpos monoclonais as variantes antigênicas do VR ficaram bem mais transparentes (Flamand et al, 1980; Wiktor et al, 1984). Estes estudos e muitos outros que os sucederam (King, 1991; Ito et al, 2001 e 2003; Schaefer et al, 2002 e 2005; Teixeira

et al, 2005; Batista, 2005 e 2006, Carnieli, 2006) permitiram verificar que amostras obtidas de diferentes hospedeiros naturais pareciam apresentar características antigênicas particulares. Estas características foram distintivas e permitiram em muitos casos identificar os reservatórios naturais das mesmas.

A caracterização antigênica com anticorpos monoclonais evidenciou que amostras isoladas de caninos apresentam perfil antigênico distinto de amostras isoladas de morcegos hematófagos (Ito et al, 2001 e 2003; Schaefer et al, 2002 e, 2005).

Igualmente, foi demonstrado que amostras isoladas de morcegos não hematófagos podem apresentar perfís antigênicos distintos das amostras isoladas de morcegos hematófagos, o que sugere que tais amostras não são apenas fruto de “escape” eventual de vírus de morcegos hematófagos para espécies não hematófagas. De fato, esses achados sugerem que tais variantes vem se adaptando ou co-evoluindo com morcegos não hematófagos. Além disso, algumas amostras ocasionalmente isoladas de símios e de canídeos selvagens apresentam perfís distintos das demais variantes reconhecidas; é possível que aqui igualmente estas amostras com perfís incomuns ou “atípicos” sejam novos esforços adaptativos em busca de outra espécie para atuar como potencial reservatório do agente.

Além do hospedeiro, alguns autores associam a variabilidade do VR à sua distribuição geográfica, o que não têm sido evidenciado no Brasil (Shoji et al, 2006). Outros autores acreditam ainda em uma associação de ambos fatores. (Smith et al, 1986; Dietzschold et al, 1988; Umoh et al, 1990; King et al, 1990). O estudo destas variantes e a associação das mesmas com diferentes hospedeiros naturais têm sido o foco da atenção de um grande número de pesquisadores dedicados ao estudo da raiva.

OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Contribuir para maior conhecimento do vírus da raiva e suas interações com seus hospedeiros, possibilitando fornecer subsídios e alternativas de controle mais eficazes, visando a eventual erradicação dessa infecção.

Objetivos específicos:

- Avaliar diferenças antigênicas entre amostras do vírus da raiva circulantes nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil;

- Pesquisar alterações antigênicas e patogênicas nas amostras submetidas a vinte passagens em camundongos e determinar a estabilidade antigênica de variantes do VR.

CAPÍTULO 1

Caracterização antigênica de amostras do vírus da raiva isoladas nas regiões Norte e Centro Oeste do Brasil com anticorpos monoclonais contra antígenos de lissavírus.

Antigenic characterization rabies virus isolates from Brazilian`s Northern and Central Western regions with monoclonal antibodies to lissavirus antigens

Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista¹; Eduardo Schmidt²; Thaís Fumaco Teixeira¹; Rejane Schaefer³; Eduardo Caldas⁴, Péricles Massunaga⁴ e Paulo Michel Roehle^{1,2}.

1- Laboratório de Virologia, DM-ICBS / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil;

2- Equipe de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS, Brasil.

3- Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

4- Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) Programa Estadual de Controle e Profilaxia da raiva

Autor para correspondência: **Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista**

Endereço: Avenida Independência 1110/22 Porto Alegre, RS

Telefone: 51- 30124231

E-mail: hruthner@yahoo.com.br

Abstract:

Rabies virus (RV) is the only member of the *Lyssavirus* genus so far isolated in South America. RV is classified as genotype 1 within the genus, which comprises another 6 genotypes (Lagos Bat, genotype 2; Mokola, genotype 3; Duvenhage, genotype 4; EBL1, genotype 5; EBL2 genotype 6 and ABL, genotype 7). Despite antigenically stable, variants have been found among RV isolates from distinct natural hosts. The generation of such variants is certainly an evolutionary event and may be important for the virus' biology in nature. In order to examine the occurrence of such variants in North and Central West regions of Brazil, 61 rabies viruses (dogs, cattle, horses, cats and human) isolated from different species within that geographic region were examined. The isolates were submitted to antigenic analyses by indirect immunofluorescence using a panel of twelve monoclonal antibodies (Mabs). In addition, the analysis allowed to differentiate isolates whose natural hosts are dogs from those whose natural hosts are haematophagous bats, often isolated from cattle. Three out of four isolates from horses and one from a dog displayed patterns of reactivity similar to those found in insectivorous bats, indicating that non-haematophagous bats may play a role in the transmission of the virus to other species.

Key words: rabies virus, antigenic characterization, variants

Resumo:

O vírus da raiva (VR) é o único lissavírus isolado na América do sul. Este VR é classificado como genótipo 1, sendo que o gênero compreende mais 6 genótipos (Lagos bat, genótipo 2; Mokola, genótipo 3; Duvenhage, genótipo 4; EBL1, genótipo 5; EBL2, genótipo 6 e ABL, genótipo 7). Apesar de antigenicamente estável, variantes do vírus da raiva tem sido isoladas de diferentes espécies. A identificação de variantes é certamente importante para a biologia dos vírus na natureza. A fim de examinar a ocorrência destas variantes nas regiões norte e centro oeste do Brasil, 61 amostras do VR isoladas de diferentes espécies (caninos, bovinos, eqüinos, felinos e humano) foram analisadas. Os isolados foram submetidos à análise antigênica através de imunofluorescência indireta com um painel composto por 12 anticorpos monoclonais (AcMs). Além disto, através desta análise, foi possível a diferenciação entre amostras que têm caninos como hospedeiros naturais caninos, daquelas cujos hospedeiros naturais são morcegos hematófagos. Três das quatro amostras isoladas de eqüinos e uma isolada de um canino apresentaram um perfil de reatividade distinto dos demais, perfil este encontrado anteriormente apenas em morcegos não hematófagos, indicando que estes podem ter participação na transmissão do vírus a outras espécies.

Palavras-chave: vírus da raiva, caracterização antigênica, variantes

Introdução

A raiva é uma doença quase sempre fatal que atinge o sistema nervoso central (SNC) de todos os animais de sangue quente. É causada pelo vírus da raiva (VR) membro da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (Tordo, 1996). A enfermidade é mantida na natureza por pelo menos dois ciclos incidentalmente relacionados entre si, denominados ciclos urbano e silvestre (Koprowski, 1996). No Brasil, o ciclo silvestre é mantido pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*, embora algumas espécies de sagüis (*Callithrix spp.*) possam em algumas regiões do País, particularmente as regiões norte e nordeste, estar envolvidas, porém com importância geograficamente restrita, em função de seu habitat (Batista-Morais et al, 2000; Ramos et al, 2002). O ciclo urbano da raiva, mantido essencialmente por caninos, apresenta distintos perfis de incidência em diferentes regiões do Brasil. No Rio Grande do Sul, por exemplo, a raiva urbana está controlada, não tendo sido registrados novos casos da enfermidade desde 1988 (Schaefer et al, 2002). As regiões norte, nordeste e centro-oeste do País ainda mantém um número significativo de casos de raiva urbana, sendo eventualmente detectados nestas regiões casos de raiva humana (Toporovski et al, 2005).

O gênero *Lyssavirus* está atualmente dividido em sete genótipos (Bourhy et al., 1993; Amengual et al., 1997; Gold et al., 1998; Buchen-Osmond, 2003): Vírus da raiva clássica (genótipo 1), Lagos bat (genótipo 2), Mokola (genótipo 3), Duvenhage (genótipo 4), EBL1 (genótipo 5), EBL2 (genótipo 6) e ABL (genótipo 7). O genótipo 1 apresenta distribuição mundial enquanto os demais, denominados vírus relacionados à raiva, têm uma distribuição mais restrita. No Brasil, apenas o genótipo 1 foi identificado até o momento, embora existam o que se denomina "variantes" dentro desse genótipo. Dentre essas variantes, mencione-se como exemplo que amostras de origem de morcegos hematófagos são diferenciáveis antigênica e molecularmente de amostras de caninos (Ito et al, 2001e 2003; Schaefer et al, 2002).

Na caracterização antigênica de variantes, os anticorpos monoclonais (AcMs) têm sido amplamente utilizados (King, 1991; Losa-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997). Na maioria dos estudos envolvendo tais análises, diferentes isolados são testados frente a painéis de AcMs, freqüentemente através do teste de imunofluorescência indireta, onde o AcM é utilizado como anticorpo primário (King, 1991; Schaefer, 1999; Metlin et al, 2004; Teixeira et al, 2005). A constatação de

presença ou ausência de fluorescência com cada um dos AcMs, permite a determinação de um perfil de reatividade, ou perfil antigênico, o que viabiliza a comparação entre diferentes amostras de vírus. Além da diferenciação entre variantes, esse tipo de análise pode inclusive permitir a identificação da fonte de infecção, funcionando como uma importante ferramenta epidemiológica (Schaefer et al., 2002).

O presente estudo reporta a caracterização de amostras de lissavírus oriundas das regiões norte e centro oeste do Brasil, isoladas de diferentes espécies animais.

Material e Métodos

Amostras de vírus:

Foram analisadas 61 amostras isoladas de diferentes espécies: 30 de caninos domésticos, 20 de bovinos, 04 de eqüinos, 02 de felinos, 01 de humano e 04 de espécies não identificadas. Destas amostras, 46 foram isoladas na região Centro Oeste, incluindo os municípios de: Novo Gama, Posse, Flores, Mimoso, Formosa, Alto Paraíso, Cabeceiras, Mambaí, Luziânia e Valparaíso, no Estado de Goiás e N. Bandeirante, Santa Maria, Guará, Brazilândia, Gama e Vargem Bonita, no Distrito Federal. As 15 demais amostras, foram isoladas do Território do Tocantins, na região Norte, (incluindo os municípios de: S. Salvador, Santa Fé, Araguaína, Tocantins, Marabá, Guaraí, Lagoa da Confusão, Itapoã e Bom Jesus). As amostras foram isoladas no período entre abril de 1998 e dezembro de 2001.

Anticorpos monoclonais:

Para a caracterização antigênica, foi utilizado um painel constituído por 12 anticorpos monoclonais (AcMs) preparados contra antígenos do nucleocapsídeo de diferentes lissavírus. Tais AcMs foram produzidos em camundongos BALB/C, conforme técnicas usuais, tendo sido utilizado vírus total para a produção do antígeno a ser inoculado nos camundongos. Os AcMs preparados com antígenos de uma amostra de vírus rábico isolada de um bovino no Rio Grande do Sul, foram denominados 5A3, 5G2 e E5A7 (Schaefer, 1999). O AcM produzido contra amostra padrão de vírus rábico, foi denominado CVS-1 (Pantoja, 1995). Os AcMs preparados com antígenos do vírus Lagos bat, foram denominados "L3" e "L18" (King, 1991). Os Acms preparados com antígenos do vírus "Danish bat", foram denominados "DB1", "DB3", "DB4", "D3" e "DB9" (King, 1991). O AcM denominado "M11", foi preparado com antígenos do vírus Mokola (King, 1991).

Caracterização antigênica:

As análises foram realizadas através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) sobre impressões de tecido nervoso de camundongos infectados com as diferentes amostras de vírus. As impressões foram realizadas sobre lâminas de microscopia, as quais foram fixadas em acetona a 4 °C por 30 minutos. A seguir, as mesmas foram lavadas em PBS (NaCl 0,15 M, Na₂HPO₄ 0,07 M, KH₂ PO₄ 8 mM,

H₂O q.s.p. 1 L, pH 7,2) e após em água destilada e secas à 37 °C. Posteriormente, diferentes áreas sobre as impressões foram delineadas com esmalte, sendo que uma diluição apropriada de cada AcM foi colocada sobre uma das áreas delimitadas. A seguir, as lâminas foram incubadas durante 30 minutos em câmara úmida a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas como descrito anteriormente e cobertas com uma diluição apropriada de conjugado fluoresceína/anti-IgG de camundongo (Dako/ Denmark). A seguir, as mesmas foram novamente incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37 °C, sendo após lavadas novamente em PBS e água destilada, e montadas com glicerina a 50 % em PBS. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência (Axiolab), as amostras foram classificadas em positivas e negativas conforme a presença ou ausência de fluorescência, respectivamente.

Resultados:

As amostras analisadas puderam ser divididas em três grupos, sendo o primeiro, constituído por 32 amostras. Destas, 22 amostras foram isoladas de caninos domésticos, 6 de bovinos, 1 de humano, 1 de felino e 2 de espécies não identificadas. Este grupo (grupo 1) foi positivo ao teste de IFI frente aos AcMs 5A3, 5G2, 7C1, E5A7, L3, DB1 (Tabela 1). Já o grupo 2, formado por 25 amostras, sendo 12 de bovinos, 7 de caninos domésticos, 1 de eqüino, 1 de felino e 4 de espécies não identificadas, distinguiu-se do grupo anterior por apresentar reatividade não só frente aos AcMs que reagiram com o grupo 1, como também frente aos AcMs DB3 e DB4. Já o grupo 3, foi formado por 4 amostras (3 de eqüinos e 1 de cão doméstico), as quais, além de reagirem com todos os AcMs que reconheceram tanto o primeiro como o segundo grupo, apresentaram reação positiva com o AcM denominado L18.

Discussão:

No presente estudo, através da análise com AcMs anti-lissavírus, foi possível identificar três variantes do genótipo 1. O grupo aqui denominado grupo “1” foi formado com as amostras de VR que apresentam o perfil antigênico usualmente encontrado em amostras originárias de cães domésticos infectados. Ocasionalmente, quando a prevalência da infecção em cães é muito elevada, podem ser observadas em outras espécies amostras de VR com o mesmo perfil detectado em amostras originárias de cães. Tais amostras são provavelmente fruto de contatos eventuais de tais espécies com cães infectados. Nesses casos, o hospedeiro de onde o vírus é isolado constitui-se em hospedeiro terminal cuja importância na manutenção do vírus na natureza é praticamente insignificante.

As amostras neste estudo, incluídas no grupo “2”, apresentaram o perfil antigênico mais frequentemente detectado em amostras de VR isoladas de morcegos hematófagos. Tais amostras são geralmente isoladas de bovinos, uma vez que estes são fonte de alimento preferencial para morcegos hematófagos. Neste estudo, porém, amostras de outras espécies apresentaram o mesmo perfil antigênico, o que sugere algum tipo de desequilíbrio entre as populações animais envolvidas. É possível que um aumento da população de morcegos hematófagos ocasione a necessidade da busca de outras fontes de alimentos, levando à disseminação do vírus a espécies que não estão usualmente envolvidas em determinado ciclo. Isso poderia levar ao fenômeno aqui identificado, onde amostras cujo perfil antigênico indicam origem de morcegos hematófagos são encontradas em cães, cavalos ou outras espécies. Uma amostra isolada de um felino igualmente apresentou um perfil sugestivo de amostras de morcegos hematófagos; é bem provável que, devido aos hábitos dos felinos, o gato tenha sido contaminado ao brincar ou ingerir um morcego contaminado que tenha, em função da infecção, se tornado alvo de um ataque felino. Caso semelhante foi relatado por Schaefer et al, onde foi demonstrado que um felino fora contaminado com uma amostra de vírus de origem de morcegos (Schaefer et al, 2002).

Além das variantes detectadas em bovinos e caninos, foram identificadas algumas amostras com perfil antigênico distinto, revelado essencialmente pela reação positiva frente ao anticorpo monoclonal L18 em testes de imunofluorescência indireta (grupo 3). Este perfil fora encontrado anteriormente apenas em amostras de morcegos não hematófagos (Schaefer 2005) e revela a possibilidade da ocorrência de

variantes em outras espécies, onde os morcegos não hematófagos despontam como os mais prováveis hospedeiros naturais destas variantes.

Os perfis antigênicos, apresentados pelas amostras nos diferentes grupos, mostram variações em dois ou três AcMs. Como todas as amostras são pertencentes a um mesmo genótipo, é esperado que as mesmas apresentem perfis antigênicos bastante semelhantes. Embora aparentemente pequenas essas diferenças já tiveram sua significância previamente confirmada por análises genômicas em estudos prévios (Ito et al, 2001; Schaefer et al, 2005), onde demonstraram refletir com precisão diferenças observadas entre variantes. O estudo genômico das amostras ora analisadas deverá vir a complementar, futuramente, o quadro fortemente sugerido pelas análises aqui apresentadas com os AcMs.

Os resultados aqui obtidos demonstram que as amostras de VR encontram-se aparentemente adaptadas a certas espécies hospedeiras as quais foram denominados, no presente estudo, “hospedeiros naturais” do vírus. Para que tal adaptação ocorra, ao longo do processo evolutivo, acredita-se que determinados antígenos são conservados, enquanto outros perdidos, como aqui sugerido. Tais modificações são bastante estáveis, pois amostras originárias de determinado hospedeiro natural retém o mesmo perfil antigênico, mesmo após uma passagem em um hospedeiro terminal, como é o caso das amostras originárias de morcegos hematófagos, isoladas de bovinos. Além disso, estudos em nosso laboratório indicam que mais de cinco passagens de amostras de VR em camundongos de laboratório não foram suficientes para alterar os perfis antigênicos dessas amostras, confirmando a relativa estabilidade dos perfis antigênicos apresentados (Batista et al, 2005). Isso sugere que as mudanças detectáveis através dos AcMs são provavelmente importantes para a adaptação das variantes a seus hospedeiros naturais. Assim, o perfil de reatividade observado, seria um reflexo do esforço adaptativo da amostra viral buscando adequar-se ou co-evoluir com o hospedeiro natural. Nesse caso, o perfil aqui detectado através dos AcMs, seria nada mais que uma expressão desse fenômeno. Estudos futuros deverão auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos nessas interações vírus-hospedeiro.

Quadro 1: Amostras analisadas e perfís de reatividade frente ao painel de anticorpos monoclonais (AcMs) anti-lissavírus .

Amostras	5A3	5G2	E5A7	CVS - 1*	L3	DB1	DB3	DB4	L18	D3	DB9	M11
Grupo 1: Bovinos: 1328, 1457, 1708, 1913, 936, 1158, 1907 Caninos: 196, 203, 1017, 1215, 1387, 435, 1226, 1666, 457, 502, 525, 533, 553, 642, 648, 680, 752, 776, 819, 945, 949, 1042 Felinos: 832 Humano: 1331 Sem identificação: 948	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Grupo 2: Bovinos: 295, 1190, 228, 569, 879, 897, 999, 1603, 1766, 1907, 2470, 992, 1052 Caninos: 225, 950, 987, 1195, 1221, 471, 877 Eqüino: 1459 Felino: 1604 Sem identificação: 1411, 528, 2243	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Grupo 3: Canino: 1134 Eqüino: 448, 1322, 1323	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

* CVS-1 refere-se a um AcM produzido contra antígenos da amostra padrão de raiva (Pantoja, 1995). 5A3, 5G2 e E5A7 correspondem a AcMs produzidos contra antígenos de uma amostra de vírus rábico isolada de um bovino do Rio Grande do Sul (Schaefer, 1999). Foram denominados L3 e L18 os AcMs preparados com antígenos do vírus Lagos bat. Os Acms preparados com antígenos do vírus "Danish bat" foram denominados DB1, DB3, DB4, D3 e DB9. O AcM denominado M11 foi preparado com antígenos do vírus Mokola (King, 1991).

Referências bibliográficas:

AMENGUAL, B.; WHITBY, J.E.; KING, A.; et al. Evolution of European bat lyssaviruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2319-2328. 1997.

BATISTA, H.B.C.R.; TEIXEIRA, T.F.; SCHMIDT, E.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M. Antigenic stability of rabies virus isolates. **Virus Reviews & Research**. v 10, p 112, 2005.

BATISTA-MORAIS, N.; BENEDITO, N. R.; MATOS-CHAVES, H. H.; BRITO-NETO, J.; SILVA, L. M. Rabies in Tamarins (*Callithrix jacchus*) in the State of Ceara, Brazil, a Distinct Viral Variant? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v 95(5), p. 609-610, Sep/Oct 2000.

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

BUCHEN-OSMOND, C. Taxonomy and classification of Viruses **In Manual of Clinical Microbiology**, 8th ed v.2, p 1217-1226 ASM Press, Washington DC, 2003.

DELPIETRO, H.A.; HURÍ-DHOMEN, F.; LARGHI, O.P.; et al. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. **Journal of Veterinary Medicine**, v. B44, p. 477-483. 1997.

GOLD, A.R.; HYATT, A.D.; LUNT, R. KATTENBELT, J.A.; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S.D. Characterization of a novel lyssavirus isolated from pteropid bats in Australia. **Virus Research**, v. 54, p. 165-187. 1998.

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

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAZAI, T.; ITO, F.H.; ARAI, Y. T.; TAKASAKI, T.; KURANE, Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v 26, p. 317-330, 2003

KING, A.A. **Studies of the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies**. Thesis. Guilford, U.K., University of Surrey, 254 p. 1991

KOPROWSKI, H. MESLIN, F-X, KAPLAN M.M. (eds) **Laboratory Techniques in Rabies**, 4 ed World Health Organization Geneva,. 1996

LOZA-RUBIO, E.; VARGAS, R.; HERNANDEZ, E.; et al. Investigation of rabies virus strains in Mexico with a panel of monoclonal antibodies used to classify lyssaviruses. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 30, p. 31-35. 1996.

METLIN, A E.; COX, J.; RYBAKOV, S.S.; HUOVILAINEN, A; GROUZDEV, K.N.; NEUVONEN, E. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia **Journal of Veterinary Medicine**, v 51, p. 94-96, 2004

PANTOJA, L.D. **Caracterização de amostras brasileiras do vírus rábico com anticorpos monoclonais** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 96p, 1995

RAMOS, P. M.; RAMOS, P. S. Acidentes humanos com macacos em relação a tratamentos profiláticos para a raiva, no Município de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v 35(6), p. 575-577, nov-dez,2002

SCHAEFER, R. **Produção de anticorpos monoclonais contra vírus rábico de origem bovina e caracterização de amostras.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 71p 1999

SCHAEFER, R.; CALDAS, E.; SCHMIDT, E.; ROEHE, P. M. First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years. **Veterinary Record.** v.150, p.216-217. 2002.

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

TEIXEIRA, T. F.; BATISTA, H.B.C.R.; SCHMIDT, E.; ROEHE, P. M. Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isoladas no Rio Grande do sul, Brasil **Acta Scientiae Veterinariae,** v 33(3), p. 271-275, 2005

TOPOROVSKI, R.Z.; FAVORETTO, S.R.; SOARES, S.L.; CAMPOS, ACA; LOPES, M.C.; MARTORELLI, L.F.A; SACRAMENTO, D.R.V.; DURIGON, E.L. Antigenic studies of rabies virus isolates from different animal species and humans **Virus Reviews & Research- XVI National Meeting of Virology** v 10, p. 112, 2005

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

CAPÍTULO 2

Estabilidade antigênica de amostras do vírus da raiva após vinte sucessivas passagens em camundongos

Batista, H.B.C.R.¹; Teixeira, T.F.¹; Schmidt, E.²; Roehe, P.M.^{1,2}

- 1- Laboratório de Virologia, DM-ICBS / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil;
- 2- Equipe de Virologia, Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS, Brasil.

RESUMO

O vírus rábico pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Apesar de ser considerado um vírus antígenicamente estável, diferentes isolados do vírus rábico podem apresentar variações. Este trabalho foi desenvolvido à fim de examinar a estabilidade antigênica de três amostras do vírus da raiva provenientes de diferentes hospedeiros naturais. Foram usadas neste estudo três amostras de vírus rábico que, com base no uso de um painel de anticorpos monoclonais, apresenta perfis antigênicos diferentes (amostra VR1, com perfil antigênico de canino doméstico; amostra VR2 com perfil antigênico de morcego hematófago e a amostra VR3, com perfil antigênico de morcegos não hematófagos). Estas amostras foram submetidas a 20 inoculações sucessivas em camundongos. O perfil antigênico das amostras foi examinado, a cada inoculação, através de análises com anticorpos monoclonais pela técnica de imunofluorescência indireta. As amostras com perfil antigênico de canino (VR1) e de morcego hematófago (VR2) mantiveram o mesmo perfil antigênico ao longo das 20 passagens. Já a amostra com perfil antigênico de morcego não hematófago (VR3) apresentou uma alteração de reatividade na sétima passagem. Estes achados permitem concluir que os perfis antigênicos destes isolados virais são bastante estáveis, não sendo alterados após sete (no caso de VR3) ou após vinte (amostras VR1 e VR2) sucessivas passagens em camundongos. Quando comparamos as três amostras é possível concluir que amostras com perfil antigênico de cães e de morcegos hematófagos apresentaram uma estabilidade antigênica maior do que a da amostra com perfil de morcegos não hematófagos.

PALAVRAS-CHAVE: variantes, inoculações sucessivas, vírus da raiva e estabilidade

ABSTRACT

Rabies virus belongs to the *Rhabdoviridae* family, *Lyssavirus* genus. Despite the recognized stability of rabies viruses, antigenic differences among isolates from different species have been found. This work was carried out in order to examine the antigenic stability of three rabies virus isolates from different natural hosts origin. The three rabies virus isolates used had shown different antigenic profiles, based on their reactivity with a monoclonal antibody panel (RV1 strain, with a domestic canine antigenic profile, RV2 strain, with a vampire bat antigenic profile and the RV3 strain with a non hematophagous bat antigenic profile) These strains were submitted to 20 consecutive inoculations in mice. The antigenic profile of the strains was examined, after each inoculation, through monoclonal antibodies analysis using the indirect immunofluorescence technique. The canine (RV1) and hematophagous bat (RV2) strains kept the same antigenic profile in all the 20 passages. The non hematophagous bat strain antigenic profile (RV3) presented an alteration in the reactivity after the seventh passage.

These findings indicate that the antigenic profile of these viral isolates is very stable, not being altered after seven passages (RV3) or after twenty (RV1 and RV2) successive passages in mice. When these three strains are compared it is possible to conclude that the canine and hematophagous bat isolates studied here are more stable than the non hematophagous bat virus isolate.

KEY WORDS: variants, consecutive inoculations, rabies virus and stability.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose de distribuição mundial, sendo usualmente fatal e capaz de infectar todos os animais de sangue quente. Atualmente, estima-se que 55.000 pessoas morrem de raiva por ano em todo mundo. Além disso, são elevados os prejuízos causados à bovinocultura em decorrência da raiva dos herbívoros. Em adição a estes fatores, pode-se acrescentar à importância da raiva, os recursos gastos com tratamentos de humanos expostos ao vírus.

A enfermidade é causada pelo vírus da raiva (VR) membro da família *Rhabdoviridae*, protótipo do gênero *Lyssavirus*. Embora o VR seja considerado estável quando comparado a outros vírus com genoma de RNA, "variantes" do genótipo 1 são bastante reconhecidas (Flamand et al, 1980; Wiktor et al, 1984; King, 1991).

Assim, amostras de VR isoladas de caninos apresentam perfil antigênico e molecular distintos de amostras de morcegos hematófagos, sendo estes os principais vetores da raiva urbana e silvestre, respectivamente (Ito et al, 2001 e 2003; Schaefer et al, 2002 e, 2005). Além disso, variantes do VR também já foram identificadas em diversas espécies de morcegos não hematófagos (Ridrigues, F. M. et al, 1975, Martorelli, L. F. et al., 1995, Uieda, W. et al, 1995, Passos, E. C., et al, 1998, Cunha, E. M. et al, 2005). Estas variantes podem ser associadas aos hospedeiros "naturais" do vírus. Em tais hospedeiros, o vírus estabelece uma relação que permite que a infecção seja capaz de perpetuar-se na espécie. Tais variantes apresentam perfis antigênicos distintos, bastante estáveis, sendo possível identificá-los mesmo após a multiplicação do vírus em um hospedeiro terminal (usualmente uma espécie distinta do hospedeiro natural). Em função disso, buscou-se examinar a estabilidade antigênica do vírus em um hospedeiro distinto de seu hospedeiro natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de vírus:

No presente estudo foram utilizadas três amostras do VR. A amostra denominada VR1, isolada de um canino doméstico no Estado de Pernambuco (Brasil), em 2001. Já as amostras VR2 e VR3 foram isoladas de morcegos não hematófagos, do Estado do Rio Grande do sul (Brasil), nos anos de 2002 e 2003 respectivamente. A amostra VR2 foi isolada da espécie *Molossus molossus* e a amostra VR3 foi isolada da espécie *Tadarida brasiliensis*. Apesar de isolada de um morcego insetívoro a amostra VR2 apresenta perfil antigênico às amostras isoladas de morcegos hematófagos.

Inoculação de camundongos:

Foram utilizados camundongos machos albinos suíços da linhagem CF-1, com idade de 21-28 dias. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, local onde foram mantidos. Os camundongos foram separados em grupos de 5 indivíduos e cada grupo foi inoculado com uma amostra de vírus rábico (VR1, VR2 e VR3). A inoculação foi feita pela via intracerebral com 0.03ml de uma suspensão de cérebro infectado (10% em PBS, pH 7,4), como descrito por Koprowski (1996). Foi feita a observação diária dos animais que foram coletados “*in extremis*”.

Com os cérebros coletados de cada grupo de camundongos inoculados, foi preparada uma nova suspensão à 10%. Esta foi inoculada em um outro grupo de camundongos, que foram também observados diariamente e coletados “*in extremis*”. Desta maneira, foram feitas 20 inoculações seriadas de cada uma das amostras.

Análise antigênica:

-Anticorpos monoclonais:

A análise antigênica foi realizada com um painel composto por 17 AcMs, sendo 13 produzidos contra diferentes antígenos do gênero *Lyssavirus*. Os AcMs

preparados com antígenos do vírus Lagos bat, foram denominados "L3", "L4", "L28", "L23", "L26" e "L18" (King, 1991). Os Acms preparados com antígenos do vírus "Danish bat", foram denominados "DB1", "DB3", "DB4", "D9", "D3" e "DB9" (King, 1991). O AcM denominado "M11", foi preparado com antígenos do vírus Mokola (King, 1991).

Foram utilizados ainda um AcM produzido a partir da amostra padrão de VR CVS-31 (Pantoja, 1995), e três Acms produzidos contra uma amostra de vírus rábico de origem bovina: 5A3, 5G2 e 7C1 (Schaefer, 1999).

-Caracterização antigênica:

A identificação da ligação dos AcMs às amostras de VR, realizou-se através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) sobre impressões de tecido nervoso de camundongos infectados com as diferentes amostras de vírus. As impressões foram realizadas sobre lâminas de microscopia, as quais foram fixadas em acetona a 4 °C por 30 minutos. A seguir, as mesmas foram lavadas em PBS (NaCl 0,15 M, Na₂HPO₄ 0,07 M, KH₂ PO₄ 8 mM, H₂O q.s.p. 1 L, pH 7,2) e após, em água destilada e secas à 37 °C. Posteriormente, diferentes áreas sobre as impressões foram delineadas com esmalte, sendo uma diluição apropriada de cada AcM colocada sobre uma das áreas delimitadas. A seguir, as lâminas foram incubadas durante 30 minutos em câmara úmida a 37 °C. Após, as lâminas foram lavadas como descrito anteriormente e cobertas com uma diluição apropriada de conjugado fluoresceína/anti-IgG de camundongo (Dako FITC). A seguir, as mesmas foram novamente incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37 °C, sendo após lavadas novamente em PBS e água destilada, e montadas sob glicerina a 50 % em PBS. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência (Axiolab).

As amostras foram submetidas à três repetições das análises com AcMs através da IFI. Tal procedimento foi realizado a fim de fornecer maior confiabilidade aos dados obtidos.

RESULTADOS

A IFI foi capaz de identificar diferenças antigênicas ao longo das 20 passagens em camundongos a que foram submetidas as amostras. Os AcMs L3, DB1, E5A7, 7C1, 5A3 e 5G2 reagiram com as três amostras e em todas as passagens. Os AcMs D3, DB9, M11, L28, L23, D9 e L4 não reagiram com nenhuma amostra, em nenhuma passagem. Os AcMs DB3, DB4, L18 e L26 permitiram a diferenciação entre as amostras, conforme demonstrado na tabela 1.

As amostras VR1, com perfil antigênico semelhante às amostras isoladas de caninos e VR2, com perfil antigênico semelhante às amostras isoladas de morcegos hematófagos, mantiveram o mesmo perfil antigênico ao longo das 20 passagens em camundongos. Diferentemente das demais, a amostra VR3 com perfil antigênico semelhante às amostras isoladas de morcego não hematófago, apresentou uma modificação estável no perfil antigênico após 7 passagens em camundongos.

A IFI apresentou sempre os mesmos resultados, não havendo discrepância entre as três repetições realizadas.

Tabela 1: Perfil de reatividade das amostras VR1, VR2 e VR3 frente aos AcMs DB3, DB4, L18 e L26 capazes de diferenciar antigenicamente tais amostras

AcMs diferenciais frente às amostras VR1, VR2 e VR3												
Nº de passagens	VR1				VR2				VR3			
	DB3	DB4	L18	L26	DB3	DB4	L18	L26	DB3	DB4	L18	L26
01	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
02	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
03	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
04	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
05	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
06	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
07	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
08	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
09	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
10	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
11	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
12	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
13	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
14	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
15	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
16	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
17	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
18	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
19	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
20	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+

DB3 e DB4 corresponde aos AcMs preparados com antígenos do vírus "Danish bat". L18 e L26 corresponde aos AcMs preparados contra antígenos do vírus Lagos bat (King, 1991).

DISCUSSÃO

Os principais reservatórios naturais da raiva no Brasil ainda são os caninos e os morcegos hematófagos. Diversas espécies de morcegos não hematófagos, infectados, porém têm sido identificados (Ridrigues, F. M. et al, 1975, Martorelli, L. F. et al., 1995, Uieda, W. et al, 1995, Passos, E. C., et al, 1998, Cunha, E. M. et al, 2005). Sucessivamente à identificação de VR nestas espécies, diversos trabalhos de caracterização foram realizados, evidenciando diferenças tanto antigênicas quanto moleculares nas amostras de VR isoladas de morcegos não hematófagos.

Os resultados aqui obtidos demonstram haver diferença na estabilidade antigênica das principais variantes do VR circulantes no Brasil. Como evidenciado na tabela 1, a amostra isolada de canino (VR1), assim como a amostra de isolada de morcego insetívoro, porém com perfil antigênico de morcego hematófago (VR2), mantiveram o mesmo perfil ao longo das 20 inoculações. Este resultado evidencia uma acentuada estabilidade antigênica, o que pode ser uma demonstração da maior adaptação destas amostras a seu hospedeiro natural.

A amostra isolada de um morcego insetívoro, com respectivo perfil (VR3) diferentemente das demais, não manteve o mesmo perfil, deixando de reagir com o AcM L18 após 7 inoculações seriadas, demonstrando uma menor estabilidade antigênica. Isto pode ser um reflexo da menor adaptação desta variante a esta espécie de morcego. Tal fato alerta para possibilidade de que o VR em espécies insetívoras de morcegos seja mais recente em uma escala biológica evolutiva. Além disso, este trabalho ressalta para a possibilidade de que as espécies de morcegos não hematófagos encontrados no Brasil possam não ser os reservatórios naturais preferenciais deste vírus, uma vez que sabe-se que em outros continentes, existem outros genótipos dos lissavírus isolados de morcegos não hematófagos.

Evidência esta que alerta para uma possível inter-relação entre as amostras de VR isoladas de morcegos, independente do genótipo a que pertencem. Sabe-se que todos os lissavírus, com exceção do genótipo 3 (Mokola), já foram isolados de morcegos, demonstrando a importância desta espécie, considerada o reservatório mais antigo do vírus rábico, para a manutenção deste na natureza.

Com estes estudos pode concluir que o VR apresenta-se bastante estável antigenicamente, não alterando seu perfil antigênico após 7 ou 20 inoculações

sucessivas (amostras com perfil antigênico de morcegos não hematófagos ou amostras com perfil antigênico de caninos e morcegos hematófagos, respectivamente). Pode concluir ainda que amostras com perfil antigênico de morcegos não hematófagos são menos estáveis antígenicamente que as demais.

Estas evidências reforçam a necessidade de mais estudos direcionados aos morcegos não hematófagos e sua importância epidemiológica para a perpetuação do vírus rábico na natureza. Assim como alerta para esta possível fonte de contaminação. Medidas de controle visando vírus rábico em diferentes espécies de morcegos não hematófagos devem ser desenvolvidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AMENGUAL, B.; WHITBY, J.E.; KING, A.; et al. Evolution of european bat lyssavirus. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2319-2328. 1997.

BAER, G.M.; **The Natural History of Rabies**, 2 ed., Boca Raton, USA: CRC Press, 1991.

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

CUNHA, E.M.; LARA, M.C.; NASSAR, A.F.; SODRE, M.M.; AMARAL, L.F. Isolation of rabies virus in *Artibeus fimbriatus* bat in State of Sao Paulo, **Revista Saúde pública**, v. 39(4), p. 683-684, 2005

DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C.E.; TOLLIS, M.; LAFON, M.; MATTEI, J.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Antigenic diversity of glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: Implications for epidemiology and control of rabies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, supplement 4, p. s785-s798, nov, 1988.

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

GOLD, A.R.; HYATT, A.D.; LUNT, R. KATTENBELT, J.A.; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S.D. Characterization of a novel lyssavirus isolated from pteropid bats in Australia. **Virus Research**, v. 54, p. 165-187, 1998.

ITO, M.; ARAI, Y. T.; ITOU, T.; SAZAI, T.; ITO, F.H.; TAKASAKI, T.; KURANE, Genetic characterization and geografic distribution of rabies virus isolates

in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v 284, p. 214-222. 2001

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAZAI, T.; ITO, F.H.; ARAI, Y. T.; TAKASAKI, T.; KURANE, Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v 26, p. 317-330, 2003

KING, A.A. Studies of the antigenic relationships of rabies and rabies- related viruses using anti- nucleoprotein monoclonal antibodies. **Tese de doutorado**. University of Surrey, Guilford, U.K., 1991.

KOPROWSKI, H. MESLIN, F-X, KAPLAN M.M.(eds) **Laboratory Techniques in Rabies**, 4 ed World Health Organization Geneva, 1996

MARTORELLI, L.F.; AGUIAR E. A.; ALMEIDA, M.F.; SILVA, M.M.; NOVAES E.C. Isolation of rabies virus from the insectivorous bat *Myotis nigricans* **Revista Saúde Pública** v. 29(2), p. 140-141, 1995

PANTOJA, L.D. Caracterização de amostras brasileiras de vírus rábico com anticorpos monoclonais. **Dissertação de Mestrado**. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

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

RIDRIGUES, F.M.; NAGATA, C.A.; PEIXOTO, Z.M.; NILSSON, M.R. Isolation of rabies virus from an insectivorous bat *Molossus obscurus* (Geoffroy, 1805), in the State of Sao Paulo **Arquivo Instituto Biológico (São Paulo)** v. 42, p. 193-196, 1975

UIEDA, W.; HARMANI, N.M.; SILVA, M.M. Rabies in insectivorous (Molossidae) bats of southeastern Brazil **Revista Saúde Pública** v. 29(5), p. 393-397, 1995

SCHAEFER, R.; CALDAS, E.; SCHMIDT, E.; ROEHE, P. M First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years. **Veterinary Record**. v.150, p. 216-217, 2002.

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

WIKTOR, T.J.; FLAMAND, A; KOPROWSKI, H. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies -related viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 1, p. 33-46, 1980.

WUNNER, W.H.; The chemical composition of rabies virus. In: BAER, G.M. (Ed) **The Natural History of Rabies**, 2 ed., Boca Raton, USA: CRC Press, .p. 31-37 1991.

CAPÍTULO 3

**Estudos sobre a patogenia de amostras brasileiras do vírus da raiva após
inoculações seriadas em camundongos**

Batista, H.B.C.R.¹; Schmidt, E².; Teixeira, T.F¹.; Maletich, D.J¹.; Rijsewijk, F.
A.M¹.; Roehle, P. M^{1,2}.

- 1- Laboratório de Virologia, DM-ICBS / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil;
- 2- Equipe de Virologia, Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS, Brasil.

Manuscrito em preparação

RESUMO:

A raiva causada por um lyssavirus da família *Rhabdoviridae* é uma zoonose caracterizada pela indução de sinais clínicos nervosos em todos os animais de sangue quente. Sabe-se que após a inoculação do vírus este faz uma breve replicação em células musculares e então penetra nas células nervosas da região, sendo conduzido ao sistema nervoso central, onde se dissemina. Posteriormente o vírus se distribui pelos nervos periféricos de forma centrífuga para os tecidos não nervosos. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de auxiliar na compreensão da patogenia do vírus rábico. Para tanto, grupos de camundongos foram submetidos a 20 inoculações seriadas (20 passagens), com três amostras do genótipo 1 dos lyssavirus. Os camundongos foram diariamente observados e foram registradas as datas de morte de cada animal. Além disso, a cada cinco passagens as amostras foram submetidas a titulação viral. A amostra denominada VR2, com perfil antigênico de morcegos hematófagos apresentou padrão mais regular (4-8 dias) de mortalidade ao longo das 20 passagens, diferentemente das demais. Esta foi a única amostra que demonstrou aumento (36,68%) no título viral infeccioso. Estes resultados sugerem uma adaptação acentuada desta amostra de vírus ao seu hospedeiro, enquanto que as demais amostras, por apresentarem períodos de incubação mais variáveis e queda no título viral infeccioso, parecem ainda estar se adaptando.

Palavras-chave: vírus da raiva, patogenia e passagens consecutivas

ABSTRACT:

Rabies caused by lyssavirus of the *Rhabdoviridae* family is a zoonosis characterized by neurological clinical signs in all hot blooded animals. It is known that the virus is able to replicate primarily in muscle cells and then it penetrates in neuronal cells of this region, being conducted to central nervous system, where it disseminates. Later the virus is distributed through the peripheral nerves to other organs. This study was carried out in order to help the understanding of viral pathogeny after consecutive inoculations in mice. Groups of 20 mice were submitted to 20 inoculations with three lyssavirus genotype 1 strains. The inoculated mice were observed daily and the dates of death were recorded. Passages number 5, 10, 15 and 20 were submitted to viral titration. The RV2 sample, which has a hematophagous bat antigenic profile, had shown mortality more regular standard for 20 passages (4-8 days), differently from the other samples. This is the only strain that had shown viral titre increase during the experiment (36,68%). These results suggest a marked adaptation of this virus strain to the host, while the other strains had shown more variable incubation periods and viral titres fall, and seem yet to be adapting to the host.

Key-words: rabies virus, pathogeny and consecutive passages

INTRODUÇÃO

A raiva é causada por um vírus da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Esta enfermidade é uma zoonose quase que invariavelmente fatal, caracterizada pela indução de sinais de meningoencefalite, podendo potencialmente atingir todos os animais de sangue quente. O período de incubação desta zoonose é muito variável após infecções naturais. Diversos fatores podem estar envolvidos, como o local da mordida, carga viral presente na ocasião da agressão, variação da suscetibilidade de determinada espécie e imunidade do animal agredido. As amostras de campo apresentam grande variabilidade neste período, os relatos mais comuns são de um período de incubação entre 2 e 12 semanas. Períodos extremamente longos superiores a um ano já foram relatados (Smith, et al, 1991).

Após a inoculação do vírus em um hospedeiro, o que se dá usualmente através de inoculação percutânea, o vírus multiplica-se nas células musculares no local da inoculação. A seguir, penetra nas células nervosas da região, sendo então conduzidos através do transporte axoplásmico retrógrado ao sistema nervoso central (SNC) (Tsiang, 1993).

No SNC, o vírus se dissemina através da combinação de fluxo axoplásmico retrógrado, transmissão célula-célula via junções sinápticas e passagem livre do vírus através de ligações intercelulares (Iwasaki, 1991). Posterior à disseminação no SNC, o vírus se distribui pelos nervos periféricos de forma centrífuga para os tecidos não nervosos, já tendo sido identificado na epiderme, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosa gástrica e intestinal, pâncreas, parenquima renal, glândulas adrenais, tecidos neuroepiteliais, bexiga e uretra (Charlton, 1988).

A disseminação do vírus rábico no hospedeiro é bastante conhecida, porém, não o suficiente para compreender sua manutenção na natureza, apesar do relato, desde a antigüidade de histórias envolvendo provavelmente a raiva. No Brasil caninos e morcegos hematófagos são os principais reservatórios do vírus. Pouco se sabe, todavia, sobre a perpetuação deste nas colônias de morcegos hematófagos, fatos que demonstram a necessidade de mais estudos direcionados à patogenia do vírus da raiva.

Este trabalho tem por objetivo obter maior conhecimento sobre a patogenia do vírus rábico, quando este é submetido a sucessivas inoculações em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas três amostras do VR, sendo a amostra denominada VR1, isolada de um canino doméstico no Estado de Pernambuco (Brasil), em 2001. Já as amostras VR2 e VR3 foram isoladas de morcegos não hematófagos, do Estado do Rio Grande do sul (Brasil), nos anos de 2002 e 2003 respectivamente. A amostra VR2 foi isolada da espécie *Molossus molossus* e a amostra VR3 foi isolada da espécie *Tadarida brasiliensis*. Apesar de isolada de um morcego insetívoro a amostra VR2 apresenta perfil antigênico semelhante às amostras isoladas de morcegos hematófagos.

Inoculação e observação dos camundongos:

Foram utilizados grupos de 5 indivíduos (camundongos machos, albinos suíços, da linhagem CF-1, de 21 dias). Foram inoculadas, por via intracerebral, com 0,03 ml da suspensão viral de cada uma das amostras (VR1, VR2 e VR3). O encéfalo dos camundongos foi coletado, com este material preparado uma nova suspensão viral que foi, então, inoculada em outro grupo de camundongos. Desta forma foram realizadas 20 inoculações sucessivas (20 passagens em camundongos).

Os camundongos foram observados diariamente, para possível visualização dos sinais clínicos compatíveis com raiva. Foram também registradas as datas de morte dos camundongos, em dias pós inoculação (dpi).

Determinação do título viral infeccioso:

As passagens de número 2, 5, 10, 15 e 20 de cada amostra (VR1, VR2 e VR3) foram tituladas em camundongos de 21 dias, conforme técnicas usuais (Smith, J.S. et al 1996) e os títulos foram calculados também conforme técnicas descritas para o vírus rábico (Aubert, M. F. A.; 1996).

Análise estatística:

Foi utilizado o método estatístico comparativo para calcular a percentagem de diminuição e/ou aumento do título viral infeccioso. Estes cálculos foram realizados através da seguinte fórmula:

$$\frac{A - B}{A} \times 100 = \%$$

A

Onde A é o título infeccioso viral com duas inoculações em camundongos (2P) e B é o título viral infeccioso com vinte inoculações em camundongos (20P).

RESULTADOS

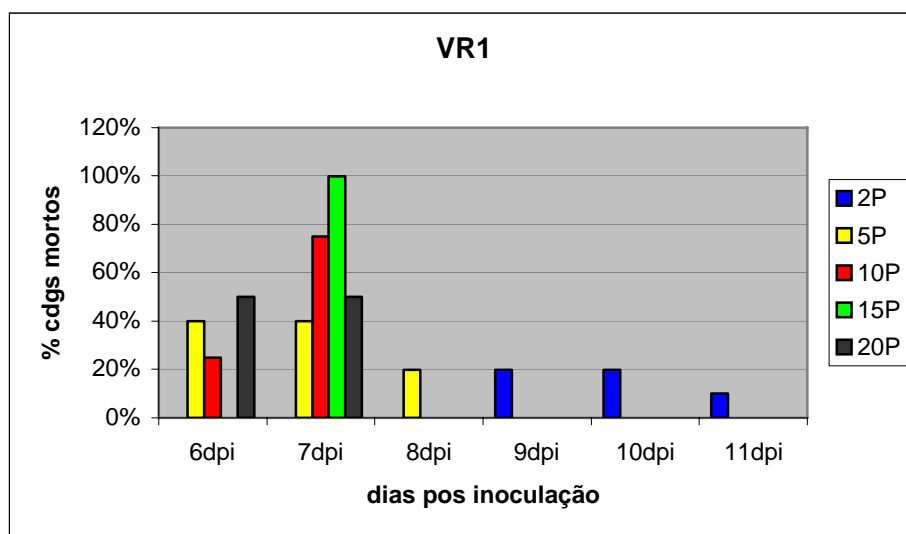
Inoculação e observação dos camundongos:

Quando os camundongos foram inoculados com a amostra VR1, o período de mortalidade variou de 5 até 11 dias pós inoculação (Figura 1). Já a amostra VR2 manteve um período de mortalidade de 4 até 8 dias pós inoculação e a amostra VR3, 5 até 10 dias pós inoculação (Figuras 2 e 3).

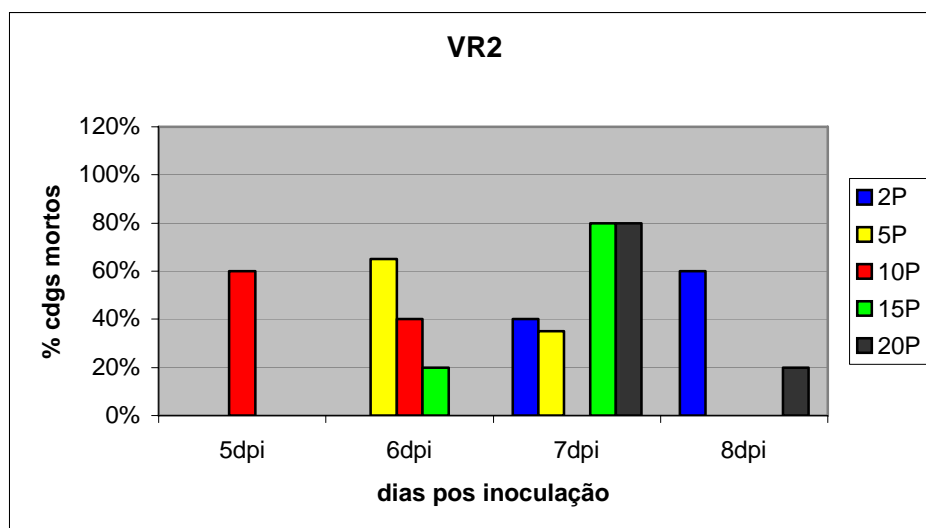
Titulação viral e análise estatística:

O título viral infeccioso das amostras VR1, VR2 e VR3 estão representados na figura 4. A amostra VR1 demonstrou uma queda de 23,69% no título viral infeccioso, 2,87 e 2,19 com 2 e 20 passagens em camundongos respectivamente. A amostra VR3 também apresentou queda no título viral infeccioso, porém menos acentuada (9,63%), 3,53 e 3,19, com 2 e 20 passagens em camundongos respectivamente. Já a amostra VR2, demonstrou um aumento de 36,68% no título viral infeccioso (3,19 e 4,36, com 2 e 20 passagens em camundongos respectivamente).

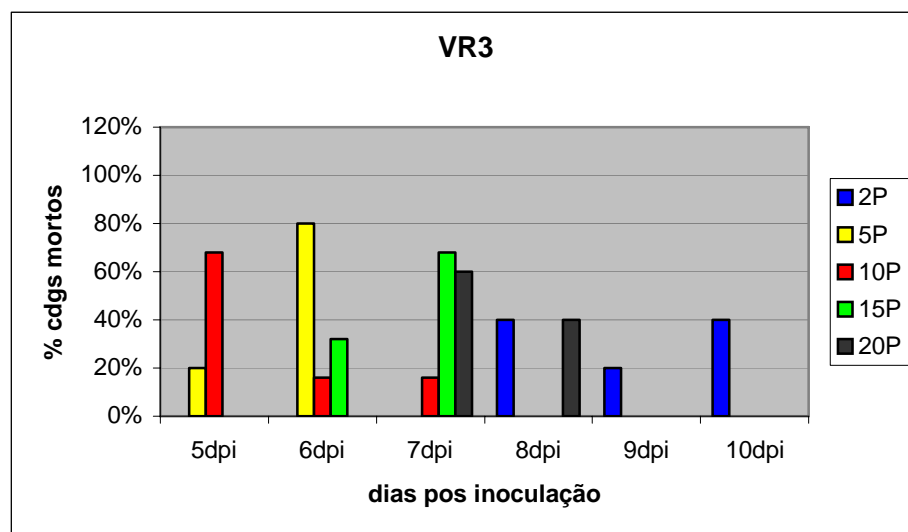
- **Figura 1:** Taxa de mortalidade: porcentagem de camundongos (cdgs) mortos de cada grupo inoculado em cada dia pós inoculação (dpi) da amostra VR1. Cada grupo de camundongos foi constituído por 5 indivíduos. Dados com 2, 5, 10, 15 e 20 inoculações sucessivas em camundongos (2P, 5P, 10P, 15P e 20P). Os dados estão representados com uma variação de 20% entre as colunas.



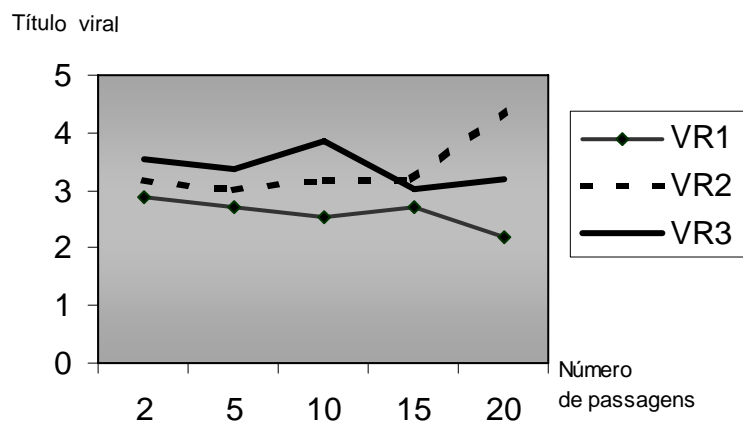
- **Figura 2:** Taxa de mortalidade: porcentagem de camundongos (cdgs) mortos de cada grupo inoculado em cada dia pós inoculação (dpi) da amostra VR2. Cada grupo de camundongos foi constituído por 5 indivíduos. Dados com 2, 5, 10, 15 e 20 inoculações sucessivas em camundongos (2P, 5P, 10P, 15P e 20P). Os dados estão representados com uma variação de 20% entre as colunas.



- **Figura 3:** Taxa de mortalidade: porcentagem de camundongos (cdgs) mortos de cada grupo inoculado em cada dia pós inoculação (dpi) da amostra VR3. Cada grupo de camundongos foi constituído por 5 indivíduos. Dados com 2, 5, 10, 15 e 20 inoculações sucessivas em camundongos (2P, 5P, 10P, 15P e 20P). Os dados estão representados com uma variação de 20% entre as colunas.



- **Figura 4:** Título Viral infeccioso das amostras VR1, VR2 e VR3 com 2, 5, 10, 15 e 20 inoculações sucessivas em camundongos (2P, 5P, 10P, 15P e 20P). A titulação viral foi realizada em grupos de 6 camundongos de 21 dias por diluição.



DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo estudar alguns aspectos da patogenia de diferentes amostras de vírus da raiva, após vinte inoculações seriadas em camundongos. Assim, amostras de vírus rábico originadas de um canino doméstico (VR1) e de morcegos não hematófagos (VR2 e VR3) foram inoculadas sucessivamente em camundongos. Dados a respeito da mortalidade dos animais e títulos virais obtidos de amostras dos cérebros destes após a morte, foram coletados.

A mortalidade das amostras de vírus rábico inoculadas, não se alteraram após as 20 inoculações, mantendo-se em 100 % para todos os animais dos três grupos. Além disso, com 15 e 20 inoculações os camundongos inoculados com as três amostras de vírus, morreram mais precocemente (6-8 dpi), como representado nas figuras 1, 2 e 3, quando comparado às passagens iniciais, onde foi possível identificar mortalidade ainda aos 11 dpi. Apesar de também ser possível observar este comportamento na amostra VR2, esta exibiu um padrão de datas de mortalidade mais regular, variando o período de incubação entre 5 e 8 dpi, independentemente da passagem analisada. Este dado pode ser uma evidência da adaptação acentuada desta amostra de vírus ao seu hospedeiro, enquanto que as demais amostras, por apresentarem períodos de incubação mais variável, parecem ainda estar se adaptando aos hospedeiros.

Paralelamente, um dos fatores que poderia influenciar no desenvolvimento da doença é o título de vírus inoculado via intracerebral. A via de inoculação utilizada também pode ter influenciado na resposta dos camundongos frente ao vírus, a inoculação pela via intramuscular, ou mesmo subcutânea poderia resultar em diferentes dados. Como os camundongos foram inoculados somente por via intracerebral e não foi feita a titulação viral antes da inoculação, é possível que a quantidade de vírus presente em cada amostra inoculada tenha sido variável, o que certamente influencia nas datas de mortes destes animais. Os resultados destas titulações mostraram que, para as amostras VR1 e VR3, houve uma queda nos títulos virais infeccioso à medida em que as passagens virais foram aumentando. Ao contrário, os títulos virais obtidos entre a passagem número cinco e vinte da amostra VR2 tenderam a aumentar.

Na verdade, a titulação viral neste trabalho foi realizada a cada cinco passagens, em todos os três grupos de animais, a partir de um *pool* de cérebros dos animais que morriam nas inoculações anteriores. É possível que a análise de cada cérebro individualmente demonstrasse resultados mais fidedignos aos títulos virais, fornecendo uma amostragem maior para o cálculo da média do título viral.

Apesar disso pode-se concluir com estes dados que as alterações de títulos, assim como as sucessivas inoculações não foram significantes o suficiente para alterar a patogenicidade das amostras de vírus rábico inoculadas. Além disso cabe salientar que neste estudo foi utilizado um modelo experimental (camundongos), o que pode influenciar tais resultados. A utilização dos hospedeiros naturais das amostras de vírus rábico aqui analisadas, (caninos- VR1, morcegos hematófagos- VR2 e morcegos insetívoros- VR3) impossibilitaria a realização de tal estudo, tanto por questões éticas e epidemiológicas, como pela dificuldade de manutenção destes animais. Assim, mesmo realizado em um modelo experimental, este estudo evidencia aspectos interessantes sobre a patogenicidade do vírus rábico, demonstrando a necessidade do conhecimento sobre a manutenção da raiva em diferentes espécies hospedeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AUBERT, M.F.A. Methods for the calculation of titres- Appendix 3 In: MESLIN, F-X., KAPLAN, M.M.; KOPROWISKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in rabies**. 4ed. World Health Organization Geneva: p.445-459, 1996

CHARLTON, K.M. **The pathogenesis of rabies**. In CAMPBELL, J.B, CHARLTON, K.M. Rabies, Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, p. 101-150, 1988

DEAN, D.J., ABELSETH, M.K., ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F-X., KAPLAN, M.M.; KOPROWISKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in rabies**. 4ed. World Health Organization Geneva: p. 88-93, 1996

IRONS, J.V., EADS, R.S., GRIMES, J.E. & CONKLIN, A. The public health importance of bats. **Texas Reports on Biology and Medicine** v. 15, p. 292-298, 1957

IWASAKI, Y. Spread of virus within the central nervous system. In BAER, G.M. **The Natural History of Rabies** 2ed Boca Raton, USA RCR press: p. 121-132 , 1991

JOHNSON, N., PHILLPOTTS, R. & FOOKS, A. R. Airbone transmission of lyssavirus **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 785-790, 2006

KENT, J.R. & FINEGOLD M.F. Human rabies transmitted by the bite of a bat: with comments on the duck-embryo vaccine **The New England Journal of Medicine** v. 263, p. 1058-1065, 1960

SMITH, J.S.; FISHBEIN, D.B.; RUPPRECHT, C.; CLARK, K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 234, p. 205-211, 1991

SMITH, J. S.; YAGER, P.A.; BAER, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody In: MESLIN, F-X., KAPLAN, M.M.; KOPROWISKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in rabies**. 4ed. World Health Organization Geneva: p. 181-192, 1996

TILLOTSON, J.R., AXEIROD, D. & LYMAN, D.O. Rabies in a laboratory worker – New York, **Morb. Mortal. Wkly Rep.**v. 26, p. 183-184, 1977

TSIANG, H. Pathophysiology of rabies virus infection of nervous system. **Advances in Virus Research**, v. 42, p. 375-412, 1993

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

WINKLER, W.G., FASHINELL, T.R., LEFFINGWELL, L., HOWARD, P. & CONOMY, P. Airbone rabies transmission in a laboratory worker. **American Medicine Association**. 226, p 1219-1221, 1973

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

No primeiro estudo componente desta dissertação foram analisadas as características de amostras de vírus rábico isoladas de diferentes espécies nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil. Tal estudo foi desenvolvido a fim de se determinar as variantes do VR circulantes em tais regiões. Foi evidenciada a presença de três variantes antigenicamente distintas do VR circulando nas regiões em estudo, que foram divididas em grupos. O primeiro grupo foi constituído por 32 amostras com perfil antigênico comum à maioria das amostras geralmente isoladas de caninos. Com o mesmo perfil foram ainda detectadas sete amostras isoladas de bovinos, uma de felino, uma de humano e outra amostra sem identificação da espécie da qual foi isolada. A identificação de amostras com perfil antigênico de VR que têm o cão doméstico como reservatório em outras espécies salienta o enorme problema representado por cães infectados. Além disso, fica evidente o alto grau de inter-relacionamento entre os ciclos epidemiológicos da raiva na região examinada. Igualmente, a identificação de sete caninos e um felino infectados com amostras com perfil antigênico semelhante àqueles geralmente encontrados em bovinos (ou seja, provavelmente de origem de morcegos hematófagos; grupo 2), confirmam este estreito inter-relacionamento.

Foram ainda encontradas em três eqüinos e um canino amostras com perfil antigênico de variantes de morcegos não hematófagos (grupo 3). Estas provavelmente refletem contaminações acidentais, em que eqüinos e caninos entram em contato com espécies não hematófagas acidentalmente, em função de os morcegos já se encontrarem abatidos ou debilitados pela infecção.

Além dos aspectos epidemiológicos, estes fatos alertam também para a co-evolução do vírus rábico em morcegos não hematófagos. Em épocas onde a caracterização antigênica de amostras de VR não era tão precisa, acreditava-se que

morcegos não hematófagos seriam contaminados através do convívio com morcegos hematófagos, possivelmente em cavernas habitadas por espécies diversas (P. Roehle, comunicação pessoal). Os dados aqui obtidos confirmam a possibilidade de que estas amostras na verdade são variantes adaptadas a espécies não hematófagas, e que com tais espécies provavelmente vem co-evoluindo. Tratam-se, portanto, de ciclos independentes, envolvendo reservatórios naturais independentes, aos quais o VR parece vir se adaptando de forma igualmente independente.

Estes achados impulsionaram a realização dos estudos que constituíram o segundo e o terceiro capítulo desta dissertação. Foram realizadas análises para determinar a estabilidade antigênica e o comportamento patogênico de três amostras do VR com perfis antigênicos distintos, submetidas a vinte sucessivas inoculações em camundongos. Este estudo revelou que as três amostras examinadas comportaram-se de forma bastante estável. A amostra com perfil antigênico de canino e a amostra com perfil antigênico de morcego hematófago mantiveram-se antigenicamente ao longo das vinte inoculações. Por outro lado, a amostra com perfil antigênico de morcego não hematófago alterou seu padrão antigênico após sete inoculações. Esta mudança no perfil antigênico se revelou estável e manteve-se inalterada até o final dos experimentos. É possível que esta estabilidade antigênica relativamente menor do que a apresentada pelas demais amostras de VR aqui analisadas, seja um reflexo de um menor grau de adaptação ao hospedeiro reservatório natural. Já foi sugerido que os morcegos hematófagos seriam a espécie originalmente infectada pelo VR; seria interessante proceder uma análise filogenética com o intuito de determinar se as amostras aqui examinadas representam estágios evolutivos mais ou menos avançados do vírus. As amostras de morcegos não hematófagos provavelmente representam amostras menos adaptadas a estas espécies e, por isso, mais sujeitas a modificações antigênicas, ainda que estas tenham sido observadas em um hospedeiro terminal, como o camundongo.

Com relação a patogenia destas as amostras, todas mantiveram-se altamente patogênicas para os camundongos. Este fato pode ser consequência também da via de inoculação utilizada nestes experimentos. Os camundongos foram inoculados por via intracerebral nestes estudos, o que impossibilita a reação do sistema imune frente ao antígeno administrado. A utilização das vias intramuscular e/ou subcutânea, associadas à menores doses infectantes de vírus, poderiam evidenciar resultados

diferentes dos aqui obtidos. Quanto a análise dos títulos virais utilizados para a inoculação dos camundongos a utilização de cada cérebro de cada camundongo inoculado poderia refletir números mais próximos a realidade. Este fato porém tornou-se inviável uma vez que a titulação viral neste estudo foi realizada em camundongos. O pool diminuiu em aproximadamente 5 vezes o número de camundongos utilizados. Outra possibilidade seria a utilização de um sistema de cultivo celular in vitro, porém acredita-se que estudos com animais possam ser mais representativos para a comparação com fenômenos naturais. Estudos futuros deverão ser realizados com vistas a esclarecer estas interessantes questões.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

- Nas regiões Centro-oeste e Norte do Brasil circulam pelo menos três perfis antígenicamente distintos de vírus rábico;
- Há inter-relação dos ciclos urbano e silvestre do vírus rábico nas regiões Centro-oeste e Norte do Brasil;
- A amostra de VR com perfil antigênico de caninos e a amostra de VR com perfil antigênico de morcegos hematófagos, mantiveram-se antígenicamente estáveis após 20 inoculações sucessivas em camundongos, demonstrando serem altamente estáveis;
- A amostra de VR com perfil antigênico de morcegos não hematófagos alterou seu perfil de reatividade após sete inoculações sucessivas em camundongos;
- As amostras de VR com perfil antigênico de caninos e com perfil antigênico de morcegos hematófagos aqui analisadas, são mais estáveis antígenicamente em comparação com a amostra com perfil antigênico de morcegos não hematófagos.
- Não houve alteração na patogenicidade após vinte inoculações sucessivas, das amostras analisadas. Mantendo-se todas altamente patogênicas para camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMENGUAL, B.; WHITBY, J.E.; KING, A.; COBO, J.S.; BOURHY, H. Evolution of european bat lyssavirus. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2319-2328. 1997
- BAER, G.M. Rabies in Nonhematophagous bats In: BAER, G.M. **The Natural History of Rabies** 2ed Boca Raton, USA RCR press: p. 79-97, 1975
- BATISTA, H.B.C.R.; SCHMIDT, E.; TEIXEIRA, T.F.; SCHAEFER, R.; ROEHE, P.M. Caracterização antigênica de amostras do vírus da raiva isoladas nas regiões Norte e Centro Oeste do Brasil com anticorpos monoclonais anti-lissavírus **Submetido á Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e zootecnia**, 2006
- BATISTA-MORAIS, N.; BENEDITO, N. R.; MATOS-CHAVES, H. H. ;BRITO-NETO, J.;SILVA, L. M. Rabies in Tamarins (*Callithrix jacchus*) in the State of Ceara, Brazil, a Distinct Viral Variant? **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95(5), p. 609-610, Sep/Oct 2000.
- BAUER, A. G.; CRUSIUS, V.A. Isolamento de vírus rábico de morcego insetívoro no rio Grande do sul **Anais da IV Conferência da Sociedade Veterinária do Rio Grande do sul**. p. 189-194, 1965
- BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Taxonomy and evolutionary studies on lyssavirues with special reference to Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 277-282, 1993
- CARNIELI, P; BRANDAO, P.E.; CARRIERI, M.L.; CASTILHO, J.G.; MACEDO, C.I.; LINDENBERG, M.M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R.C.; CARVALHO, V. A.; MONTEBELO, L.; WADA, M.; KOTAIT, I. Molecular epimiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil **Virus Research** 2006

- CHARLTON, K.M. The pathogenesis of rabies. In CAMPBELL, J.B, CHARLTON, K.M. Rabies, Boston, USA: **Kluwer Academic Publishers**, p. 101-150, 1988
- CRICK, J.; KING, A.A . Culture of rabies virus in vitro In CAMPBELL, J.B, CHARLTON, K.M. Rabies, Boston, USA: **Kluwer Academic Publishers**, p. 67-109, 1988
- CRUZ, F.W. Construção e avaliação de um BCG recombinante expressando a nucleoproteína do vírus rábico. Pelotas: UFPEL **Tese de doutorado** Departamento de biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 131p, 2000
- CUNHA, E.M.; LARA, M.C.; NASSAR, A.F.; SODRE, M.M.; AMARAL, L.F. Isolation of rabies virus in *Artibeus fimbriatus* bat in State of Sao Paulo, **Revista Saúde Pública**, v. 39(4), p. 683-684, 2005
- DIAZ A.M.O.; DELLAPIANE, N.; PALOMO L.F. Vacuna antirrabica de cerebro de raton lactante: Composición antigénica y capacidad inmunógena. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 107(3), p. 185-195, 1989.
- DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C.E.; TOLLIS, M.; LAFON, M.; MATTEI, J.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H.; Antigenic diversity of glycoprotein and nucleocapsid protein of rabies and rabies related viruses: Implications for epidemiology and control of rabies. **Reviews of Infectious Diseases**, v 10 suplement 4 p S785-S798, Nov, 1988
- ELMGREN L. D. & WANDERLER, A I. Competitive ELISA for the detection of rabies virus-neutralizing antibodies In; MESLIN, F,X; KAPLAN, M, M; KOPROWSKI, H. (eds). **Laboratory Techniques in Rabies**. 4 ed. World Health Organization Geneva: p. 105-102, 1996
- FUENZALIDA E.; PALACIOS R. Um método melhorado para la preparación de la vacuna antirrábica. **Boletín del Instituto de Bacteriología**, v. 8, p. .3-10, 1955

- GONÇALVES, M.A.S; NETO, R,S; BRAZIL, T. K Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista sociedade brasileira de medicina tropical**. v 35(5), p. 461-464, 2002
- GOLD, A.R.; HYATT, A.D.; LUNT, R.; KATTENBELT, J.A.; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S.D. Characterization of a novel lyssavirus isolated from pteropid bats in Australia. **Virus Research**, v. 54, p. 165-187. 1998
- HELLENBRAND, W; MEYER, C; RASCH, G; STEFFENS, I; AMMON, A E-alert 18 February: Cases of rabies in Germany following organ transplantation **Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, 2005
- IRONS, J.V., EADS, R.S., GRIMES, J.E. & CONKLIN, A. The public health importance of bats. **Texas Reports on Biology and Medicine** 15, p. 292-298, 1957
- ITO, M.; ARAI, Y. T.; ITOU, T.; SAZAI, T.; ITO, F.H.; TAKASAKI, T.; KURANE, Genetic characterization and geografic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v. 284, p. 214-222. 2001
- ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAZAI, T.; ITO, F.H.; ARAI, Y. T.; TAKASAKI, T.; KURANE, Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polimorfism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v 26, p. 317-330, 2003
- IWASAKI, Y. Spread of virus within the central nervous system. In BAER, G.M. **The Natural History of Rabies** 2ed Boca Raton, USA RCR press: p. 121-132, 1991
- JOHNSON, N., PHILLPOTTS, R. & FOOKS, A. R. Airbone transmission of lyssavirus **Journal of Medical Microbiology**, v. 55 p. 785-790, 2006

- KENT, J.R. & FINEGOLD M.F. Human rabies transmitted by the bite of a bat: with comments on the duck-embryo vaccine **The New England Journal of Medicine** v. 263, p. 1058-1065, 1960
- KIENY, M.P.; DESMETRE, P.; SOULEBOR, J-P.; LATHE, R. Rabies Vaccine: Traditional and Novel Approaches **Program Veterinary Microbiology Immunology** v. 3, p. 73-111, 1987
- KING, A.A.; DAVIES, P.; LAWRIE, A. The rabies virus of bats. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 165-174, 1990
- KING, A A; TURNER, G.S.; Rabies, A review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, p. 1-39, 1993
- KISSLING, R.E.; The Fluorescent Antibody Test in Rabies. In BAER, G.M. **The Natural History of Rabies** 1ed Academic Press, USA p. 401-415, 1975
- KOPROWISKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in rabies**. 4ed. World Health Organization Geneva: p.200-207, 1996
- KUSNE, S; SMILACK, J; Transmission of rabies virus from organ donor four transplantation recipients. **Liver Transplants** v. 11 (10), p. 1295-1297, 2005
- MARTORELLI, L.F.; AGUIAR E. A.; ALMEIDA, M.F.; SILVA, M.M.; NOVAES E.C. Isolation of rabies virus from the insectivorous bat *Myotis nigricans* **Revista Saúde Pública** v. 29(2), p. 140-141, 1995
- MAYR, A; GUERREIRO, M,G; **Virologia Veterinária**, (3 ed), Editora Sulina 1988
- PASSOS, E.C.; CARRIERI, M.L.; DAINOVSKAS, E.; CAMARA, M.; SILVA, M.M. Isolation of rabies virus from na insectivorous bat, *Nyctinomops macrotis*, in southeast Brazil, **Rev. Saúde Pública** v. 32, p. 74-76, 1998

- RAMOS, P. M.; RAMOS, P. S. Acidentes humanos com macacos em relação a tratamentos profiláticos para a raiva, no Município de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35(6), p. 575-577, nov-dez,2002
- REBHUN, W.C.; **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Editora Roca, p 509-511, 2000
- RIDRIGUES, F.M.; NAGATA, C.A.; PEIXOTO, Z.M.; NILSSON, M.R. Isolation of rabies virus from an insectivorous bat *Molossus obscurus* (Geoffroy, 1805), in the State of Sao Paulo **Arquivos do Instituto Biológico. (São Paulo)** v. 42, p. 193-196, 1975
- SCHAEFER, R.; CALDAS, E.; SCHMIDT, E.; KING, A A; ROEHE, P.M. First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years. **Veterinary Record**, v .150, p. 216-217, 2002
- SCHAEFER, R.; BATISTA, H.B.C.R.; FRANCO, AC.; RIJSEWIJK, F.A M.; ROEHE, P. M. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 161-170, 2005
- SCHEINER, L.G.; Spread of virus from the central nervous system. In BAER, G.M. **The Natural History of Rabies** 2ed Boca Raton, USA RCR press: p. 133-144, 1991
- SHANKAR, V; DIETZSCHOLD, B; KOPROWSKI, H. Direct entry of rabies virus into central nervous system without prior local replication. **Journal of Virology**, v. 65, p. 2736-2738,1991
- SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; GOMES, A.A.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraíba, Brazil. **Acta Virology**, v. 50 (1), p.33-37, 2006

- SMITH, J.S.; REID-SANDEN, F.L.; ROUMILLAT, L.F.; TRIMARCHI, C.; CLARK, K.; WINKLER, W.G.; Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n 4, p. 573-580, 1986
- SMITH, J.S.; FISHBEIN, D.B.; RUPPRECHT, C.; CLARK, K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 234, p. 205-211, 1991
- STEELE, J.H.; History of rabies. In: In BAER, G.M. **The Natural History of Rabies** 1ed Academic Press, USA p. 1-29, 1975
- TILLOTSON, J.R., AXEIROD, D. & LYMAN, D.O. Rabies in a laboratory worker – New York, **Morb. Mortal. Wkly Rep.** 26, p. 183-184 1977
- TSIANG, H.; Pathophysiology of rabies virus infection of nervous system. **Advances in Virus Research**, v. 42, p. 375-412, 1993
- TORDO, N; POCH, O; ERMINE, A; KEITH, G; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 83, p. 3914-3918, 1986
- TORDO, N.Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In; MESLIN, F,X; KAPLAN, M, M; KOPROWSKI, H. (eds). **Laboratory Techniques in rabies**. 4 ed. World Health Organization Geneva: p. 28-51, 1996
- UIEDA, W.; HARMANI, N.M.; SILVA, M.M. Rabies in insectivorous (Molossidae) bats of southeastern Brazil **Revista Saúde Pública** v. 29(5), p. 393-397, 1995

- UMOH, J.U.; COX, J.H.; SCHNEIDER, L.G.; Antigenic characterization of street rabies virus isolates from Nigeria using monoclonal antibodies **Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, p. 222-228, 1990
- WEBSTER, W. A & CASEY, G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture In; MESLIN, F,X; KAPLAN, M, M; KOPROWSKI, H. (eds). **Laboratory Techniques in rabies**. 4 ed. World Health Organization Geneva,p. 96-103, 1996
- WINKLER, W.G., FASHINELL, T.R., LEFFINGWELL, L., HOWARD, P. & CONOMY, P. Airborne rabies transmission in a laboratory worker. **American Medicine Association** v. 226, p. 1219-1221, 1973