

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

LUIZ FERNANDO PEREIRA VIEIRA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO GENE DA GLICOPROTEÍNA
ENTRE ISOLADOS DO VÍRUS DA RAIVA PROVENIENTES DE
MORCEGOS E HERBÍVOROS DOMÉSTICOS DO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO NO PERÍODO DE 2006 A 2010**

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2012

LUIZ FERNANDO PEREIRA VIEIRA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO GENE DA GLICOPROTEÍNA
ENTRE ISOLADOS DO VÍRUS DA RAIVA PROVENIENTES DE
MORCEGOS E HERBÍVOROS DOMÉSTICOS DO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO NO PERÍODO DE 2006 A 2010**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal, na Área
de Concentração de Sanidade Animal.

ORIENTADORA: Prof^a. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 0019/2012

Vieira, Luiz Fernando Pereira

Epidemiologia molecular do gene da glicoproteína entre isolados do vírus da raiva provenientes de morcegos e herbívoros domésticos do estado do Espírito Santo no período de 2006 a 2010 / Luiz Fernando Pererira Vieira. – 2012.

110 f. : il.

Orientador: Silva Regina Ferreira Gonçalves Pereira

Tese (Doutorado - Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

Bibliografia: f. 67 – 80.

1. *Lyssavirus* 2. Morcego hematófago 3. Morcego não-hematofago 4. Filogeografia 5. Raiva dos herbívoros I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 599.4

LUIZ FERNANDO PEREIRA VIEIRA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO GENE DA GLICOPROTEÍNA
ENTRE ISOLADOS DO VÍRUS DA RAIVA PROVENIENTES DE
MORCEGOS E HERBÍVOROS DOMÉSTICOS DO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO NO PERÍODO DE 2006 A 2010**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Juliana Galera Castilho (Doutora, Ciências Biológicas) – Instituto Pasteur

Prof. Álvaro Fabrício Lopes Rios (Doutor, Ciências Biológicas) - UENF

Prof. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof^a. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira (Doutora, Microbiologia) - UENF
(Orientadora)

À minha esposa,

Aline Carvalho Galante Vieira

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por me permitir desenvolver este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo apoio financeiro ao projeto, através do edital CNPq/MAPA/SDA Nº 064/2008.

À minha orientadora Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira, pessoa que vem me trilhando no caminho da pesquisa desde minha Iniciação Científica. Agradeço por me mostrar o que é a vida de um professor/pesquisador, além dos artigos científicos, mostrando os meandros da vida Universitária.

Ao Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) por ter cedido as amostras que compuseram este trabalho, em especial agradeço a Luiz Carlos Barbosa Tavares e a Thiago Farias da Silva.

Ao Instituto Pasteur de São Paulo, em especial a Neide Yumie Takaoka e a Ivanete Kotait, por permitirem a realização das análises moleculares em seus laboratórios. Aos pesquisadores do Instituto Pasteur, Pedro Carnieli Junior e Rafael de Novaes Oliveira, Felipe de Paula Nogueira Cruz e a então doutoranda, hoje doutora Keila Iamamoto Nogi, por me auxiliarem nas técnicas empregadas no laboratório. Agradeço a todos do Instituto Pasteur que, mais uma vez, me fizeram sentir como se estivesse em casa.

Ao meu cunhado Alan Carvalho Galante, pela ajuda nas questões de informática.

Aos colegas de equipe sempre dispostos a ajudar, alunos de iniciação científica Thiago Bernardo Pedro e Marcos Aurélio Dias Meireles e à Doutora Carla Nascimento Chicarino.

Aos meus pais Emilio Augusto Vieira Filho e Sônia Pereira Vieira, aos meus irmãos Renata, Rafaela, Emílio e Carlos André, e à minha cunhada Sabina, que sempre me apoiaram nos momentos difíceis.

Agradeço a minha esposa, Aline Carvalho Galante Vieira, que acompanhou todos os detalhes deste trabalho, sempre me animando e alimentando meu ego.

Aos meus sogros Joel dos Santos Galante e Rute Carvalho Galante, pelas orações, pensamentos positivos e carinho.

"A ciência, como um todo, não é nada mais do que um refinamento do pensar diário"

(Albert Einstein)

RESUMO

A raiva é uma doença causada por um vírus da família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. Essa enfermidade tem distribuição cosmopolita, incluindo o Brasil. O estado do Espírito Santo apresenta alta prevalência, sobretudo da raiva transmitida por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) aos bovinos e equinos, além de ser isolado em espécies de morcegos frugívoros e insetívoros. Objetivou-se realizar uma análise filogeográfica dos isolados do vírus da raiva do estado do Espírito Santo entre os anos de 2006 e 2010, além de realizar uma análise filogenética dos isolados de morcegos frugívoros e insetívoros. Foram isoladas 42 amostras de vírus da raiva, 41 amostras do estado do Espírito Santo provenientes de bovinos, equinos, morcegos insetívoros (*Nyctinomops laticaudatus*) e frugívoros (*Artibeus lituratus*); e uma isolada do morcego hematófago do estado do Rio de Janeiro. Foram sequenciados 807 nucleotídeos do gene G. Todas as sequências, exceto a isolada de *N. laticaudatus*, foram semelhantes aos isolados de *D. rotundus* em outras regiões do país, compatível com a variante 3 do vírus clássico da raiva. A partir das sequências com características do vírus da raiva rural, foi realizada uma análise filogeográfica com o modelo de substituição de nucleotídeos TIMef+G+Γ4, e o modelo de dispersão contínua usando *relaxed random walks* (RRW). A árvore filogenética apresentou três clusters principais. A análise filogeográfica demonstrou que as três linhagens do vírus se dispersam independentemente umas das outras, sendo separadas pela cadeia de montanhas no centro do estado. No entanto, em alguns pontos essa barreira física foi superada, ocorrendo a sobreposição de linhagens diferentes nas mesmas microrregiões. Foi construída uma árvore filogenética com o modelo evolutivo *Kimura-2-parâmetros*, comparando as sequências de morcegos não-hematófagos do Espírito Santo com isolados de diversos hospedeiros, recuperados no *GenBank*. A sequência de nucleotídeo isolada do morcego *N. laticaudatus* apresentou grande semelhança com sequências isoladas da mesma espécie em outros estados brasileiros. As sequências de aminoácidos dessa espécie apresentaram marcadores moleculares específicos, o aminoácido valina nas posições 12 e 121 e o aminoácido serina na posição 110. Entre as sequências de nucleotídeos de *A. lituratus* foram observados seis marcadores moleculares específicos, no entanto nenhuma destas variações de nucleotídeos resultou em alteração de aminoácido. As sequências de *A. lituratus*

formaram um sub-cluster exclusivo com sequências isoladas nessa mesma espécie no Espírito Santo e em outros estados brasileiros, sugerindo a presença de um ciclo epidemiológico distinto nesta espécie. A raiva está distribuída em todas as regiões do estado do Espírito Santo, causando enorme prejuízo à pecuária e, além da zona rural, o vírus também é encontrado em áreas urbanas.

Palavras-chave: *Lyssavirus*, morcego hematófago, morcego não-hematófago, filogeografia, raiva dos herbívoros

ABSTRACT

Rabies is a disease caused by a virus of the family Rhabdoviridae, and genus Lyssavirus. This disease has a cosmopolitan distribution, including Brazil. The State of the Espírito Santo has a high prevalence, particularly of rabies transmitted by vampire bats (*Desmodus rotundus*) to cattle and horses. The virus is also isolated in species of fruit bats and insectivores. The aim of this work was performed a phylogeographic analysis of rabies virus isolates from Espírito Santo State between the years 2006 and 2010, besides of the phylogenetic analysis of isolates from frugivorous and insectivorous bats. Forty-two samples of rabies virus were isolated, 41 samples of Espírito Santo from cattle, horses, insectivores (*Nyctinomops laticaudatus*) and frugivores (*Artibeus lituratus*) bats; and one isolated from vampire bat of the State of Rio de Janeiro. That was sequenced 807 nucleotides of the gene G. All sequences, except the isolation of *N. laticaudatus*, were similar to those isolated from *D. rotundus* in other regions of the country, compatible with variant 3 of classic rabies virus. A phylogeographic analysis was performed using the sequences of isolates with characteristics of *D. rotundus*. That was used the model of nucleotide substitution TIMeF+G+Γ4, and the dispersion model using continuous relaxed random walks (RRW). The phylogenetic tree showed three main clusters. The phylogeographic analysis showed that the three virus lineages disperse independently of each other, separated by the chain of mountains in the center of the state. However, at some points this physical barrier has been overcome, occurring overlapping samples of different lineages in the same microregion. The phylogenetic tree was constructed with the evolutionary model kimura-2-parameters, comparing the sequences of non-hematophagous bats of the Espírito Santo with isolates from different hosts, recovered in GenBank. The sequence isolated from an insectivorous bat *N. laticaudatus* showed close similarity to sequences isolated from the same species in other Brazilian states. The sequences of amino acid of this specie showed specific molecular marker, the amino acid valine in sites 12 and 121 and the amino acid serine in the position 110. Among nucleotide sequences of *A. lituratus* it was observed six specific molecular marker, however no mutation result in change of amino acid. The isolates of *A. lituratus* formed a exclusive subcluster with sequences isolated from the same species of bats from Espírito Santo and others states of Brazil, suggesting the presence of a distinct epidemiological cycle in frugivorous

species. Rabies is spread across all regions of the state of Espírito Santo, causing huge damage to livestock, and beyond of the countryside, the virus is also found in urban areas.

Keywords: *Lyssavirus*, vampire bat, non-vampire bat, phylogeography, herbivores rabies

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vírus da raiva	19
Figura 2. Genoma do vírus da raiva.	20
Figura 3. Árvore filogenética de tempo pela máxima credibilidade do clado (MMC) para sequências de 807 nucleotídeos do gene G do vírus da raiva.....	51
Figura 4. Dispersão do surto de raiva entre 1955 e 2010 no Espírito Santo, Brasil .	52
Figura 5. Árvore filogenética morcegos não-hematófagos 1	54
Figura 6. Árvore filogenética morcegos não-hematófagos 2.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de vírus da raiva isoladas no estado do Espírito Santo, Brasil, entre 2006 e 2010.	47
Tabela 2. Isolados de vírus da raiva de morcegos não hematófagos no município de Vitória, estado do Espírito Santo, Brasil	49

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVOS.....	14
2.1.	Objetivo geral.....	14
2.2.	Objetivos específicos.....	14
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1.	Histórico.....	15
3.2.	Taxonomia viral.....	17
3.3.	Estrutura viral.....	18
3.4.	Genoma.....	19
3.5.	Replicação viral.....	21
3.5.1.	Adsorção.....	21
3.5.2.	Penetração e desnudamento.....	22
3.5.3.	Transcrição, tradução e replicação.....	22
3.5.4.	Montagem e brotamento.....	26
3.6.	Sinais Clínicos.....	28
3.7.	Métodos de Diagnósticos.....	30
3.8.	Epidemiologia.....	31
3.9.	Atuação em Focos de Raiva.....	34
3.9.1.	Ações Permanentes em Áreas Epidêmicas.....	35
3.9.2.	Ações Permanentes em Áreas Endêmicas.....	36
3.9.3.	Atendimento a Focos em Áreas Esporádicas.....	36
3.10.	Biologia dos morcegos.....	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1.	Amostras.....	40
4.2.	Imunofluorescência direta.....	42
4.3.	RT-PCR e sequenciamento.....	42
4.3.1.	Extração do RNA total.....	42
4.3.2.	Transcrição reversa.....	43
4.3.3.	PCR (Reação em cadeia pela polimerase).....	44
4.3.4.	Purificação do DNA.....	45

4.3.5. Reação de sequenciamento.....	46
4.4. Análise Filogeográfica.....	47
4.5. Análise filogenética dos isolados de morcegos não-hematófagos.....	48
5. RESULTADOS.....	50
5.1. Análise filogeográfica.....	50
5.2. Análise filogenética dos isolados de morcegos não-hematófagos.....	53
6. DISCUSSÃO.....	56
6.1. Análise filogeográfica.....	57
6.2. Análise filogenética dos isolados de morcegos não-hematófagos.....	61
7. CONCLUSÕES.....	65
8. RECOMENDAÇÕES	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO A – PAPER 1	81
ANEXO B – PAPER 2	99

1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa causada por um vírus da família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. As características morfológicas e genéticas dos vírus dessa família são partícula viral em forma de projétil, nucleocapsídeo helicoidal, envelope com projeções glicoproteicas, genoma formado por uma única fita de RNA de polaridade negativa, a qual codifica cinco genes para as proteínas N, P, M, G e L.

O gênero *Lyssavirus* possui 11 espécies de vírus, dentre elas o *Rabies virus*, que é o vírus clássico da raiva. No Brasil, apenas esse sorotipo é encontrado em diversos hospedeiros, principalmente quirópteros e carnívoros.

O vírus clássico da raiva possui diversas variantes virais relacionadas à espécie hospedeira, que mantém o vírus em um ciclo epidemiológico específico. Essas variantes possuem características imunológicas e genéticas diferentes. A principal divergência está entre isolados provenientes de quirópteros e canídeos, mas, além dessa divergência filogenética principal, ainda é possível observar a distinção de linhagens entre os isolados de morcegos hematófagos e não-hematófagos, ou entre canídeos domésticos e silvestres. No Brasil são relatadas linhagens virais específicas para os morcegos *Desmodus rotundus*, *Lasiurus spp.*, *Histiotus montanus*, *Eptesicus furinalis*, *Molossus spp* e *Nyctinomops laticaudatus*, já entre canídeos é observada a distinção entre cães domésticos e canídeos silvestres (*Cerdocyon thous*).

A raiva urbana vem sendo controlada no Brasil, o número de casos reduziu drasticamente desde 1970 até 2011, saindo da casa dos milhares para dezenas de casos de raiva em cães por ano. Atualmente os casos estão concentrados nos estados do norte e nordeste do país. Por outro lado, a raiva em herbívoros domésticos está longe de ser controlada. São diagnosticados em média, anualmente, 2700 herbívoros com raiva, sem nenhuma tendência de diminuição ao longo dos anos. Esse número de casos já seria alarmante, mas é ainda mais preocupante quando se sabe que a maior parte dos casos de raiva em herbívoros não é diagnosticada no país, pois há um sub-envio de amostras para diagnóstico laboratorial.

No estado do Espírito Santo são registrados todos os anos, em média, 76 casos de raiva em herbívoros domésticos. O relevo predominante do Espírito Santo é o planalto na região central do estado, que corresponde a 60% do território. Esse relevo oferece muitos abrigos naturais ao principal transmissor da raiva aos herbívoros no Brasil, o morcego hematófago *Desmodus rotundus*.

O prejuízo aos pecuaristas tem importância na economia do estado, tendo em vista que o setor do agronegócio é responsável por 30% do produto interno bruto (PIB), emprega 40% da população economicamente ativa e a pecuária é responsável por 20% da renda deste setor. Predomina no estado a agricultura familiar, com pequenas propriedades (83% das propriedades têm área menor que 50 ha). O rebanho bovino tem mais de 2 milhões de cabeças, mas na maioria das propriedades há pouca tecnificação e baixa produtividade, o que resulta em pouca renda para as famílias.

Em todo o país, inclusive no Espírito Santo, é relatada a presença de morcegos não-hematófagos habitando regiões urbanas, e em muitos casos alojam-se em habitações humanas. A proximidade dos morcegos com os humanos é preocupante, tendo em vista que os mesmos podem transmitir a raiva. A principal forma de transmissão nesses casos seria um contato acidental com esses morcegos, que em situações normais não agredem os humanos, mas quando infectados com o vírus da raiva são encontrados em locais e horários não habituais, o que possibilitaria o encontro de ambos.

A epidemiologia da raiva é muito complexa, com a participação de diversos hospedeiros e suas respectivas linhagens virais, hospedeiros que se deslocam pelo voo e hospedeiros terrestres, além da diversidade de relevos e biomas encontrados no país. Os aspectos epidemiológicos da raiva estão relacionados com os hábitos dos hospedeiros e a forma de transmissão do vírus entre eles. Contudo, o monitoramento dos deslocamentos dos hospedeiros e o momento da infecção dos mesmos são muito difíceis de se obter.

A bioinformática vem auxiliar na inferência do deslocamento do vírus no espaço em relação ao tempo, utilizando a análise filogeográfica. Esse tipo de análise pode ser realizada com o *software* BEAST, que utiliza a estatística Bayesiana pelo método de Monte Carlo via Cadeia de Markov para analisar os modelos evolutivos e modelos de dispersão viral, utilizando dados de sequências genéticas, localização geográfica e data do isolamento viral.

Apesar do grande número de casos de raiva em todo o Espírito Santo, nenhum estudo de filogenia molecular foi desenvolvido no estado. Os casos de raiva em herbívoros apresentam contiguidade entre as regiões, portanto, o entendimento da epidemiologia da raiva no Brasil só poderá ocorrer quando o vírus da raiva tiver sido caracterizado molecularmente em todo, ou em grande parte do país, tornando necessárias a caracterização molecular e a epidemiológica da raiva no estado do Espírito Santo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar molecular e filogeneticamente amostras de vírus da raiva isolados de morcegos e herbívoros domésticos provenientes do estado do Espírito Santo, entre os anos de 2006 e 2010.

2.2. Objetivos específicos

a) Sequenciar o gene G das amostras de vírus da raiva isoladas no estado do Espírito Santo.

b) Realizar uma análise filogeográfica da dispersão do vírus da raiva entre os isolados de herbívoros (bovinos e equinos) e morcegos entre os anos de 2006 e 2010.

c) Realizar a caracterização molecular das amostras de vírus da raiva isoladas de morcegos frugívoros e insetívoros do Espírito Santo, comparando-as com isolados de diversos outros hospedeiros da Brasil.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico

A raiva é a mais antiga doença reconhecidamente infecciosa. Na Mesopotâmia, há cerca de 2.300 a.C, determinava-se o seguinte: “Se um cão é louco e as autoridades tomam conhecimento do fato e de seu dono; se ele não o prende e o cão morde um homem e causa a sua morte, seu dono deve pagar 2/3 de uma mina (40 shekels) de prata. Se o cão morde um escravo e causa a sua morte, o dono do cão deve pagar 15 shekels de prata” (DE MATTOS et al., 2001).

Muitas civilizações antigas foram bastante familiares da raiva. Na Ilíada (700 a.C.), Hector foi comparado a um cão raivoso. Escolas chinesas advertiam sobre o perigo de cães raivosos em 500 a.C. Aristóteles (400 a.C.) associou a doença aos animais, mas erroneamente excluiu os humanos de contraírem a raiva de cães. Celsus inventou o termo hidrofobia e descreveu um caso clínico de raiva humana (KOPROWSKI, 1996). Em Roma, Cordamus supôs que o veneno (i.e. o vírus) estava presente na saliva (DE MATTOS et al., 2001).

Muita superstição havia acerca da raiva e sua possível cura, até se iniciarem os estudos e experimentações sobre a doença no final da Idade Média e início da Renascença (DE MATTOS et al., 2001). Girolamo Fracastoro, em 1546, escreveu um tratado “A Ferida Incurável”, onde detalhou a doença, inclusive com relato de caso clínico humano desde a mordida até o óbito do paciente. Fracastoro acompanhou diversos casos de raiva e pôde concluir que a doença não tem cura após terem aparecidos os sinais clínicos (KOPROWSKI, 1996).

No Velho Mundo, a raiva é conhecida há milhares de anos, mas, nas Américas, é difícil precisar se havia o vírus antes da chegada dos europeus. É possível que já houvesse a enfermidade antes da chegada de Colombo, pois, logo após a colonização, o bispo Petrus Martyr-Anglerius escreveu sobre morcegos que, com suas mordidas venenosas, levavam à morte os homens atacados por esses. Contudo, somente 200 anos após a invasão espanhola, casos de raiva foram relatados nas Américas. No México, em 1709, houve relatos de casos e, na América do Norte, em 1753, a raiva foi descrita em cães e mais tarde em raposas (DE MATTOS et al., 2001).

Por muitos anos, a mordida de um animal raivoso foi considerada a possível fonte de infecção da raiva, mas somente em 1804 Zinke usou a saliva de um cão raivoso para a transmissão da doença (DE MATTOS et al., 2001).

O estudo mais metódico da raiva iniciou-se com Louis Pasteur que em colaboração com Thuillier, Roux e Chamberland concluíram, em 1881, que a sede do vírus da raiva era o sistema nervoso central e que a inoculação intracerebral era a melhor forma para a transmissão da doença. Em 1885, Pasteur descobriu como atenuar o vírus, o que permitiu a tentativa de vacinação. A atenuação foi realizada através de passagens, seriadas em cérebros de coelhos. Após várias passagens o vírus perde o tropismo pelo sistema nervoso central (FERREIRA, 1976).

O dia 6 de julho de 1885 é um marco para a história da raiva: Um menino de nove anos de idade, agredido por um cão raivoso em várias regiões do corpo, recebeu a primeira profilaxia pós-exposição com a vacina de Pasteur, constituída de material dissecado da medula espinhal de coelhos, previamente, inoculados com vírus “fixo” (DE MATTOS et al., 2001).

A técnica de vacinação, contudo, não foi aceita por toda a comunidade médica e Louis Pasteur encontrou um problema quando um menino vacinado contra a raiva morreu da doença. O médico da família, George Clemenceau, aconselhou os pais a processar Pasteur, afirmando que a morte da criança fora causada pelo vírus utilizado na vacina. Hoje se sabe que a vacina de Pasteur realmente não é totalmente segura e pode levar o paciente a óbito (KOPROWSKI, 1996).

Negri, em 1903, detectou inclusões intracitoplasmáticas em neurônios de animais raivosos. Em 1913, essas inclusões tiveram reconhecido valor diagnóstico (DE MATTOS et al., 2001; FERREIRA, 1976; LIEBERMANN, 1988). A composição química dos corpúsculos de Negri só foi desvendada após a invenção do microscópio eletrônico (DE MATTOS et al., 2001).

A transmissibilidade da raiva por meio de morcegos hematófagos foi sugerida, em 1935, por Sílvio Torres, e confirmada em 1936 por Pawan, com a relevância de também ser transmitida aos humanos (MAIR e GUERREIRO, 1972).

No Brasil, em 1973, instituiu-se o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR), com o objetivo de promover atividades sistemáticas de combate à raiva humana, mediante o controle da antropozoonose nos animais domésticos e o tratamento específico das pessoas agredidas. Os casos de raiva humana diminuíram sensivelmente desde a implantação do Programa, mas ainda assim morrem 20

peças em média anualmente no Brasil, para o período avaliado entre 2000 e 2010 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2010).

O ano de 2004 é outro marco na história mundial da raiva, quando aconteceu o primeiro sucesso no tratamento da raiva, que foi transmitida por um morcego nos Estados Unidos da América (WILLOUGHBY et al., 2005). Em 2008, o Brasil testemunhou o terceiro caso de cura da raiva no mundo após tratamento semelhante ao ocorrido nos EUA. Basicamente, o tratamento consiste em indução ao coma, terapia de suporte e uso de antivirais (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009).

3.2. Taxonomia viral

A família *Rhabdoviridae* é composta pelos vírus RNA de sentido negativo, da grande ordem *Mononegavirales*. A organização genética dos vírus da família *Rhabdoviridae* é similar a dos vírus das famílias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* e *Bornaviridae* classificadas na mesma ordem. São vírus envelopados que se replicam no citoplasma das células, com exceção de alguns rhabdovírus de plantas que se replicam no núcleo (ICTV, 2006; ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

Os rhabdovírus são amplamente distribuídos na natureza, onde infectam vertebrados, invertebrados e muitas espécies de plantas. Os rhabdovírus que causam a raiva e outros que causam doenças em peixes parecem ter seu ciclo confinado exclusivamente aos vertebrados. Os demais rhabdovírus são transmitidos aos vertebrados e plantas por um vetor artrópode (ROSE e WHITT, 2001).

Mais de 70 rhabdovírus de vertebrados foram identificados e classificados. Os vírus que infectam mamíferos são separados em três gêneros: *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus* e *Lyssavirus* (ICTV, 2006).

O gênero *Lyssavirus* possui 11 espécies de vírus, o vírus clássico da raiva, *Rabies virus*, distribuído em todo o mundo; e os vírus relacionados à raiva: *Lagos bat virus*, *Mokola virus* e *Duvenhage virus*, originários da África; *European bat lyssavirus* tipo 1 e *European bat lyssavirus* tipo 2, originários da Europa; *Australian bat lyssavirus*, originário da Austrália; *Aravan virus*, e *Khujand virus*, originário da Ásia Central; *Irkut virus*, originário do Leste da Sibéria e o *West Caucasian bat virus*, originário da região caucasiana. Excetuando-se o vírus clássico da raiva, que possui

diversos hospedeiros mamíferos e o *Mokola vírus*, o qual não se sabe qual é a espécie reservatório, todos os demais *Lyssavirus* tem como reservatórios, mamíferos da ordem Chiroptera (ICTV, 2011; WHO, 2010).

3.3. Estrutura viral

O vírion tem a forma de um projétil, ou seja, é um cilindro com uma das extremidades arredondadas e a outra em ângulo de 90°. O comprimento das partículas pode variar de 100 a 430nm, em média tem 180nm de comprimento e 80 de diâmetro (figura 1) (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

O nucleocapsídeo helicoidal possui uma fita de RNA com 12kb de comprimento. Esse RNA está envolto por aproximadamente 1200 cópias da nucleoproteína (proteína N), cada molécula de nucleoproteína cobre nove nucleotídeos. A proteína N apresenta dois lobos, onde, entre eles, fica alojado o RNA genômico. A associação da proteína N torna o RNA resistente a ação das RNases (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

O nucleocapsídeo ainda está associado a duas outras proteínas, a fosfoproteína (proteína P) e a proteína large (proteína L), o número de cópias dessas proteínas em cada vírion é 466 e 50 respectivamente. A junção de quatro proteínas P com uma proteína L forma a RNA-polimerase do vírus. A proteína P atua na ligação da proteína L ao complexo proteína N-RNA molde (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

A proteína da matriz é a de menor tamanho, porém a mais numerosa no vírion, aproximadamente 1800 cópias. Essa proteína é responsável pela compactação do nucleocapsídeo. Além de interagir com o nucleocapsídeo, a proteína M interage com o envelope viral, sugerindo que a proteína M faz a ligação do nucleocapsídeo com o envelope (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

O envelope viral consiste de uma bicamada lipídica proveniente da membrana da célula infectada. Um único tipo de proteína está presente no envelope, a glicoproteína (proteína G). Essas proteínas são arranjadas em trímeros, que formam as cerca de 300 a 400 espículas do envelope (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

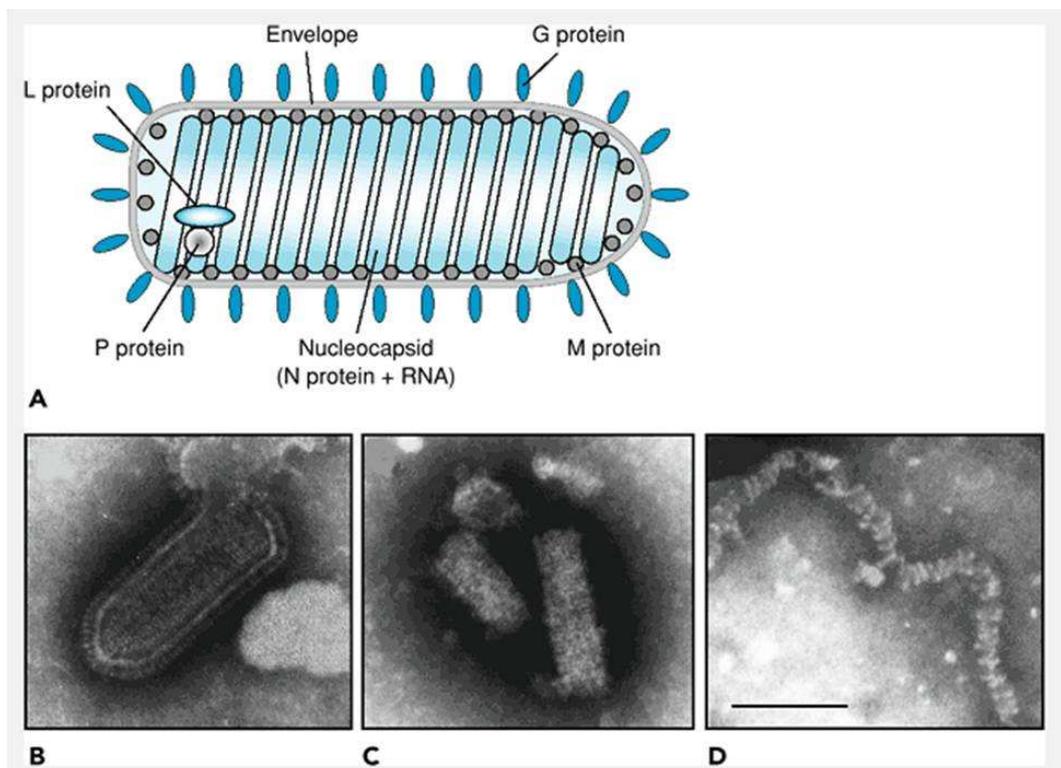


Figura 1. Vírus da raiva. (A) Esquema representando as cinco proteínas do vírus, genoma e envelope viral. (B) Partícula viral completa de um rhabdovírus, vista por micrografia eletrônica. (C) Nucleocapsídeo ligado à proteína M, ou seja, partícula viral sem envelope. (D) Nucleocapsídeo sem a proteína M (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

3.4. Genoma

O genoma do vírus da raiva é formado por um único segmento de RNA de fita simples. No início e final do genoma há uma sequência de aproximadamente 50 nucleotídeos chamadas “líder” e “trailer”, respectivamente. Essas duas sequências não codificam proteínas, mas funcionam como promotores da transcrição e replicação, e como sinais para a encapsidação do genoma e antígenoma. As duas sequências são transcritas durante a replicação viral, mas o RNA formado não tem função conhecida (YANG et al., 1998).

O genoma do vírus, com o tamanho de 12 kb, contém cinco ORFs (*open reading frame*), que codificam as seguintes proteínas na sequência, 3' - N, P, M, G e L - 5'. A ORF da nucleoproteína possui 1350 bases (posição 71 a 1421 no genoma

completo), o que resulta em uma proteína de 450 aminoácidos (aa). A segunda ORF (posição no genoma: 1514 a 2405) codifica a proteína P que possui 297 aa. A ORF da proteína M está localizada entre os nucleotídeos 2496 e 3101, ela codifica uma proteína de 202 aa. A glicoproteína possui 524 aa e é codificada por uma ORF localizada entre os nucleotídeos 3318 e 4890. A proteína L é a maior, com 2142 aa, sua ORF está localizada entre os nucleotídeos 5387 e 11843 do genoma completo do vírus da raiva (Figura 2) (TORDO et al. 1986; TORDO et al., 1988).

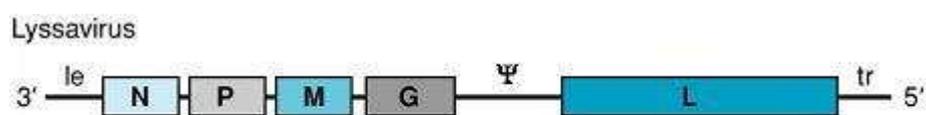


Figura 2. Genoma do vírus da raiva. Fita única de RNA de polaridade negativa, as letras N, P, M, G e L representam os genes que codificam as proteínas representadas pelas mesmas letras. "Le" e "tr" são as sequências líder e trailer, respectivamente (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

Tordo et al. (1986) analisaram o DNA complementar ao genoma do vírus da raiva e observaram que a sequência de nucleotídeos consenso do iniciador da transcrição é composta por nove nucleotídeos localizados entre 12 e 30 nucleotídeos à montante do códon de início de transcrição. Os quatro primeiros (AACA) e dois últimos (CT) nucleotídeos da sequência consenso são invariáveis. Nas posições cinco e seis, há dois resíduos de pirimidina, mas a citosina é mais frequente que a timina; e finalmente, a sétima posição que é variável. Essa organização é relatada para o vírus Sendai (*Sendai virus* – SeV, família *Paramyxoviridae*, gênero *Respirovirus*) e no vírus da estomatite vesicular (*Vesicular stomatitis virus* – VSV), onde há um ou dois nucleotídeos variáveis, respectivamente, separados por duas regiões conservadas. A sequência de iniciação do vírus da raiva e do VSV compartilham cinco posições de nucleotídeos invariáveis, o que demonstra a proximidade genética entre os dois.

Os *Lyssavirus* possuem um genoma bastante simples e compacto, com pouco desperdício de espaço. Entre o gene N–P, há dois nucleotídeos; entre os

genes P–M e M–G, há cinco nucleotídeos; e entre os genes G–L, há 423 nucleotídeos (TORDO et al., 1986).

Entre o gene G e o gene L há uma região que se assemelha à sequência consenso de início de transcrição e outra sequência que se assemelha ao sinal de parada, contudo nenhum mRNA ou proteína correspondente a essa região foi detectada. Acredita-se que essa região seja um pseudogene (TORDO et al., 1986). Alguns estudos demonstraram que essa região não é essencial para a replicação do vírus, por outro lado, alguns trabalhos mostram que ocorreu redução da neuroinvasividade quando essa região foi retirada do genoma viral, o que indica que ela pode participar de algum papel na patogênese (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

3.5. Replicação viral

As etapas da replicação do vírus da raiva podem ser divididas em adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação do genoma, montagem e brotamento.

3.5.1. Adsorção

O vírus da raiva é capaz de se ligar em receptores de diferentes células, contudo a glicoproteína tem maior afinidade pelos receptores das células neuronais, o que reflete no neurotropismo do vírus (TUFFEREAU et al., 1998a). As moléculas de superfície dos neurônios identificadas como receptores para o vírus da raiva são os receptores de acetilcolina (GASTKA et al., 1996; LENTZ, 1982), molécula de adesão neuronal (CD56) (THOULOZE et al., 1998) e o receptor do fator de crescimento de nervo de baixa afinidade p75^{NTR} (TUFFEREAU et al., 1998b; TUFFEREAU et al., 2001).

A ligação da glicoproteína aos receptores celulares é dependente de pH. A conformação ideal para a adsorção é alcançada entre os níveis de pH 6,5 a 5,6 (WUNNER et al., 1984).

3.5.2. Penetração e desnudamento

A penetração ocorre por endocitose mediada por receptores, através de vesículas revestidas com clatrina (MATLIN et al., 1982). Uma subsequente redução do pH no compartimento endocítico conduz a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma. Essa fusão é catalisada pela proteína G, e resulta na liberação do cerne de ribonucleoproteína (RNP) no citoplasma da célula.

Durante o processo de endocitose o endossoma sofre invaginação que formam múltiplas vesículas (chamadas de corpos multivesiculares) (GRUENBERG et al., 2004). Muitas partículas virais, ao invés de promoverem a fusão de seu envelope com a membrana do endossoma, fazem a fusão com os corpos multivesiculares e, portanto não são liberados diretamente no citoplasma da célula. Sua liberação fica dependendo da fusão do corpo multivesicular com a membrana do endossoma. Esse processo de liberação é ineficiente e muitas partículas virais acabam sendo degradadas pelas proteases dos lisossomos (LE BLANC et al., 2005).

A fusão do envelope viral com a membrana endossomal é mediada por duas regiões da glicoproteína. Uma região chamada peptídeo de fusão, localizada entre os aminoácidos 103 e 179, a qual atravessa a membrana alvo (DURRER et al., 1995); e a outra região é o ectodomínio proximal a membrana que fica imediatamente após a sequência de ancoramento da membrana, a qual intensifica a atividade de fusão (JEETENDRA et al., 2002; SHOKRALLA et al., 1998).

Com a fusão do envelope viral e membrana do endossoma ocorre a liberação dos componentes internos do vírus no citoplasma da célula e a proteína M se dissocia do nucleocapsídeo (RIGAUT et al., 1991).

3.5.3. Transcrição, tradução e replicação

3.5.3.1. O complexo N-P-L-RNA

Para a produção de RNA o vírus possui uma RNA polimerase dependente de RNA. Essa enzima é completamente competente na produção de mRNA, ou seja não depende da ação de proteínas do hospedeiro (MOYER et al., 1975). A RNA

polimerase do vírus é formada por dois tipos de subunidades proteicas codificadas pelo genoma viral, a proteína L e a proteína P (EMERSON et al., 1975). Essa RNA polimerase somente é capaz de utilizar o RNA como molde quando o mesmo está ligado à nucleoproteína (BISHOP et al., 1971; EMERSON et al., 1972). O sinal para a iniciação da encapsidação do RNA líder está entre os nucleotídeos 20 e 30 do genoma e é uma sequência rica em adenina (YANG et al., 1998).

Ao contrário do que ocorre no vírus da estomatite vesicular (protótipo da família *Rhabdoviridae*), no vírus da raiva, a principal proteína fosforilada é a N, apesar de ter uma proteína chamada "fosfoproteína" (P). A fosforilação da nucleoproteína influencia na encapsidação do RNA, na transcrição e replicação. A proteína N não fosforilada liga-se mais fortemente ao RNA líder, no entanto a transcrição e replicação são drasticamente diminuídas (WU et al., 2002). A proteína N possui dois pontos de fosforilação, o aminoácido serina na posição 389 e o aminoácido treonina na posição 375. A primeira fosforilação é bastante frequente, já a segunda aparece mais raramente (YANG et al., 1999).

A fosforilação da proteína N, não é necessária para a ligação entre a proteína P e proteína "N livre" (antes de se ligar ao RNA), no entanto a fosforilação da proteína N está associada com a estabilização da ligação da proteína P ao nucleocapsídeo (proteína N-RNA) (TORIUMI e KAWAI, 2004).

As proteínas L e P também possuem domínios de ligação, a proteína P funciona como um co-fator não catalítico da polimerase viral, mas sua função exata ainda não está bem clara (CHENIK et al., 1998). É sabido que a proteína P funciona com um chaperona ajudando a proteína N a se ligar corretamente ao RNA líder nascente e acredita-se que ela esteja envolvida com o transporte retrógrado do axônio para o corpo celular (RAUX et al., 2000), além disso a proteína P previne a expressão de interferon em células infectadas com o vírus (BRZÓZKA et al., 2005).

Diante da observação que a nucleoproteína livre, ou ligada somente à proteína P é desfosforilada, e que a fosforilação ocorre depois que a nucleoproteína se liga ao genoma, Wu et al. (2002) propuseram um modelo que explica a relação entre a fosforilação da proteína N e a eficiência de transcrição e replicação: A proteína N não fosforilada tem maior afinidade pelo RNA e, portanto estimula a encapsidação. Posteriormente, a interação do complexo RNA-nucleoproteína promove uma mudança conformacional, que permite a fosforilação da serina 389.

Por fim, a fosforilação, promove um ambiente que permite a melhor interação entre o RNA e a polimerase (proteína L), que inicia a polimerização da nova fita de RNA.

A proteína L é a maior proteína do vírus, ela possui diversas atividades catalíticas tais como, polimerização do RNA, adição da estrutura quepe na extremidade 5' do mRNA, adição da cauda poliA na extremidade 3' do mRNA e metilação do RNA (BANERJEE, 1987). A proteína L do vírus da raiva possui sequências motivos conservadas entre as proteínas L de diferentes vírus da ordem *Mononegavirales* (ordem que agrupa vírus RNA de polaridade negativa e não segmentado) (SCHNELL e CONZELMANN, 1995).

3.5.3.2. Transcrição e tradução

A formação de mRNA tendo como molde o RNA parental é chamada de transcrição primária. Após a formação de cópias do RNA parental, a transcrição pode ocorrer utilizando como molde o RNA da progênie viral, a essa transcrição dá-se o nome de transcrição secundária. O mecanismo de funcionamento das duas é idêntico, a não ser pelo grande número de RNA molde na transcrição secundária (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

Com exceção dos gene N e Líder, há, em cada junção gênica, uma sequência de final do gene, uma região intergênica e uma sequência de início do gene. O início da transcrição do mRNA requer ambas as sequências, a de fim de gene e a sequência de início de gene (TORDO et al., 1986).

A sequência de fim de gene também é sinal para a poliadenilação na extremidade 3' do mRNA, enquanto a sequência de início de transcrição é sinal para a metilação do mRNA nascente e adição da estrutura quepe na extremidade 5' do mesmo (ABRAHAM et al., 1975).

Após a poliadenilação do mRNA, o complexo polimerase deve atravessar uma região intergênica e recomeçar a transcrição do próximo gene. Contudo entre 20 e 30% das vezes o complexo polimerase se dissocia da fita de RNA molde e então a transcrição do próximo gene não ocorre. Como resultado desse evento existe um gradiente de mRNA, de forma que, quanto mais próximo for o gene da extremidade 3' do genoma, maior a concentração de mRNAs e conseqüentemente maior será a produção de proteínas. O gradiente se dá na seguinte ordem $N > P > M$

> G > L (BALL et al., 1999). A ordem dos genes no genoma e o consequente gradiente de proteínas produzidas é crucial para a replicação e patogênese do vírus (WERTZ et al., 1998).

A sequência líder também é transcrita, contudo o RNA formado é diferente dos demais genes. O transcrito da sequência líder não possui cauda poli A nem quepe. A junção entre a sequência líder e o gene N não possui a sequência poli U (U₇ na terminação dos genes P, M e L, e U₈ no gene G) (WHELAN e WERTZ, 1999).

A tradução dos mRNAs ocorre nos ribossomos. Todas as proteínas são codificadas pelos ribossomos livres no citoplasma, exceto a proteína G que é codificada pelos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso (RER) (ROSE e WHITT, 2001; WAGNER e ROSE, 1996).

A proteína G sofre glicosilações durante a passagem pelo RER e pelo aparato de Golgi. As glicosilações não são essenciais para a adsorção, penetração e desnudamento do vírus, contudo são necessárias para a sinalização de endereçamento intracelular (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

3.5.3.3. Replicação do genoma

O vírus possui uma única enzima polimerase que atua de formas diferentes nos processos de transcrição e replicação do genoma viral. Durante o processo de transcrição o complexo polimerase é capaz de identificar os sinais de início e final dos genes e assim produzir os mRNAs separadamente. Já na etapa de replicação do genoma, a polimerase inicia a polimerização da fita complementar ao genoma, mas não reconhece os sinais de início e parada do gene, consequentemente é produzida uma fita única de RNA complementar ao genoma, a essa fita dá-se o nome de antígenoma. O antígenoma é utilizado como molde pela polimerase para a produção de RNA da progênie viral (EMERSON et al., 1977; LEPPERT et al., 1979).

A replicação do genoma é dependente da produção de proteínas virais. Quando, no início da formação da sequência líder, a nova fita de RNA se associa às proteínas virais, o complexo polimerase não reconhece os sinais de início e parada dos genes e então ocorre a formação do antígenoma. Por outro lado, quando o complexo polimerase inicia a formação da fita complementar ao genoma e essa

nova fita não se associa às proteínas virais, ocorrerá a formação dos mRNAs. (HUANG e MANDERS, 1972; WERTZ e LEVINE, 1973).

O complexo polimerase sofre mudança de conformação dependendo da função que exerce (transcriptase ou replicase). Determinadas regiões da proteína P do VSV são fosforiladas quando o complexo polimerase funciona como transcriptase e outras regiões da mesma proteína são fosforiladas quando funciona como replicase (PATTNAIK et al., 1997).

Howard e Wertz (1989) afirmam que as proteínas N e P são essenciais para a replicação do genoma do vírus da estomatite vesicular (VSV). Essas proteínas promovem a encapsidação do genoma e antígenoma. Por outro lado, FINKE et al. (2003) afirma que, para o vírus da raiva, a proteína M funciona como uma chave que alterna as funções transcriptase e replicase da RNA polimerase. Em altas concentrações a proteína M estimula a replicação do genoma e reduz a transcrição.

Na posição 3' do RNA, tanto do genoma (sequência líder), quanto do antígenoma (sequência trailer) está localizado o sinal que governa a replicação. As regiões complementares a essas sequências são sinais para a encapsidação do RNA. Portanto, logo que se inicia a polimerização do RNA complementar à região 3' do genoma ou antígenoma, ocorre a ligação da proteína N ao RNA nascente (MOYER et al., 1991).

As regiões líder, no genoma, e trailer, no antígenoma do vírus da raiva (cepa PV), compartilham 26 nucleotídeos dos 47 que possuem. Na sequência do promotor genômico existe, além dos sinais de replicação e encapsidação, o sinal para a formação de mRNA, este último está ausente no promotor do antígenoma. Além disso, o promotor de replicação do antígenoma é mais forte que o promotor genômico. Por isso existe uma assimetria na produção de RNA genômico em relação ao antígenômico, ou seja, muito mais cópias do genoma são produzidas quando comparadas à quantidade de antígenoma (FINKE et al., 1997).

3.5.4. Montagem e brotamento

A montagem do vírus da raiva ocorre de forma semelhante ao que acontece com outros vírus, as subunidades são produzidas separadamente e no final do estágio de replicação as mesmas se juntam para formar a partícula viral.

A produção das proteínas que se associam ao genoma é realizada pelos ribossomos livres no citoplasma. O nucleocapsídeo do vírus (composto pelas proteínas N, P, L e o RNA genômico) é montado à medida que o RNA é polimerizado durante o processo de replicação, essa é uma característica comum aos vírus RNA de simetria helicoidal (LYLES e RUPPRECHT, 2007).

A glicoproteína é produzida pelos mRNAs do retículo endoplasmático rugoso, neste compartimento celular e no Golgi a proteína G sofre modificações pós-traducionais como a glicosilação. Finalmente a proteína é enviada à membrana plasmática onde fica ancorada por uma região transmembrana de 22 aminoácidos, um domínio citoplasmático de 44 aminoácidos e um domínio externo de 439 aminoácidos.

A proteína M é produzida pelos ribossomos livres no citoplasma. Essa proteína é encontrada solúvel no citosol e associada à membrana plasmática. A montagem do complexo "nucleocapsídeo-proteína M" parece ocorrer espontaneamente depois que a proteína M alcança uma alta concentração no citoplasma da célula infectada (BARGE et al., 1993; LYLES e McKENZIE, 1998; NEWCOMB e BROWN, 1981).

As proteínas M e G ainda estão envolvidas com o brotamento que culmina com a liberação do vírus na célula. A proteína M sozinha é capaz de promover o brotamento de vesículas na membrana da célula infectada. Isso pode ser observado em células transfectadas que expressam a proteína M como única proteína viral.

A proteína G não é essencial para o brotamento, pois vírus geneticamente modificados, que não codificam essa proteína são capazes de brotar pela membrana plasmática da célula, contudo a quantidade de vírus liberado da célula hospedeira é drasticamente reduzida (MEBATION et al., 1996).

Com o processo de brotamento a partícula viral fica completa: o nucleocapsídeo montado com a proteína M se junta ao envelope viral onde está ancorada a glicoproteína do vírus.

3.5.4.1. Incorporação de Nucleotídeos com Pareamento de Bases Incorreto

O complexo polimerase dos rhabdovírus confere aos genomas replicados muitas mutações. Isso ocorre porque a polimerase possui uma alta taxa de

incorporação de nucleotídeos errados, além de não possuir um mecanismo de correção. Conseqüentemente, o complexo polimerase, adiciona um nucleotídeo errado a cada 10^4 nucleotídeos. Levando-se em consideração que o genoma completo do vírus possui um pouco mais do que 10 mil bases, teoricamente, será incorporado uma mutação a cada genoma replicado (DRAKE e HOLLAND, 1999).

A diversidade de mutantes semelhantes numa mesma amostra (conhecida com quasispecies) é uma característica que torna os rhabdovírus capazes de se adaptarem rapidamente quando expostos a uma pressão de seleção genética. Essa pressão pode ser as diferentes espécies que o vírus infecta, ou os diferentes tecidos que o vírus infecta dentro de um mesmo hospedeiro. Dentro da população viral no hospedeiro, há um genoma predominante e os mutantes em relação a esse genoma, que estão em menor número de cópias. Quando uma pressão de seleção é estabelecida, rapidamente a replicação viral pode selecionar um mutante que adapte melhor à nova situação e dessa forma o mutante terá o novo genoma predominante (READING et al., 1978).

3.6. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da raiva são variados e inespecíficos (LANGOHR et al, 2003). O lapso entre a inoculação viral em camundongos e a sua morte pode variar quanto à cepa viral utilizada e à idade do animal. Animais mais jovens são mais susceptíveis ao vírus (GERMANO et al., 1988)

O período de incubação (PI) nos cães varia entre 15 e 90 dias, com extremos de oito dias e 13 meses. Nos equinos, o PI varia entre 21 e 90 dias, podendo prolongar-se até quatro meses. Nos ovinos, caprinos e suínos, o PI varia entre 21 e 60 dias. Nos bovinos, o PI varia entre 20 e 80 dias. Nos felinos, o PI varia entre 14 e 60 dias (FERREIRA, 1976).

Há três formas de apresentação da raiva, a excitativa ou “furiosa”, a paralítica ou “muda” e a atípica (FERREIRA, 1976).

Na “raiva furiosa”, o curso total da doença é de aproximadamente quatro a sete dias em cães, dois a seis dias em gatos, seis dias em equinos e; em ruminantes e suínos, cinco a nove dias. Nessa apresentação clínica da raiva, são observados três períodos básicos: o melancólico, o de excitação e o de depressão. No primeiro,

com duração de um a três dias, o animal mostra-se triste, exaltado, com hipersensibilidade à luz e ao som, isola-se em lugares tranquilos e semi-escuros, e responde ao chamado do dono com menor vivacidade que o habitual (FERREIRA, 1976).

No período de excitação que, em geral, dura de três a quatro dias, a inquietação inicial se transforma em acessos de fúria, que alternam com períodos de calma. Pode haver prurido intenso. O animal raivoso tenta atacar tudo o que está a sua volta e, às vezes, deglute parte de objetos dilacerados por ele. A voz torna-se rouca, devido à paralisia da faringe, o que leva a uma deficiência e dor na deglutição. Com o avançar desta fase, os acessos de fúria são cada vez mais espaçados, dando início ao período de depressão (FERREIRA, 1976).

O período de depressão vem com o aumento das fases de abatimento entre cada acesso de fúria. Com o progresso degenerativo da medula, a marcha torna-se cambaleante, segue-se a paresia, a paraplegia ou paralisia, micção e defecação involuntárias. A cauda torna-se pendente e posicionada entre as pernas. A paralisia progride de forma ascendente e acentuada, o que torna a fonação e a deglutição cada vez mais difíceis. A língua mostra-se pendente, o maxilar descaído e a saliva escorre “em fios”. Ocorre estrabismo convergente, aprofundamento dos globos oculares nas órbitas e as córneas turvam-se. Ao final da doença, os animais caem em decúbito lateral, há hipotermia, entram em coma e morrem ao final de poucas horas (FERREIRA, 1976).

Na “raiva muda”, o período melancólico e de excitação são reduzidos ou não ocorrem, antecipando assim a fase parálitica (FERREIRA, 1976). Esta forma de apresentação clínica da raiva é a predominante em bovinos. Nesses casos, os sinais mais frequentemente observados são a incoordenação dos membros pélvicos, seguida de paresia e paralisia flácida. Outros sinais nervosos incluem a paralisia da cauda e do esfíncter anal, hipoestesia na região pélvica, sialorréia, cegueira, bruxismo, tremores musculares na região da cabeça e opistótono. No final do curso clínico médio de 5 dias, que pode variar entre dois e 10 dias, o animal posiciona-se em decúbito esternal, seguido por decúbito lateral e morte após realizar movimentos de pedalagem. Em raros casos, pode ocorrer a “raiva furiosa” em bovinos, que então apresentam agressividade e mugidos frequentes (LANGOHR et al, 2003).

Desmodus rotundus inoculados experimentalmente com o vírus da raiva morrem em média 12 dias após a inoculação, com extremos de sete e 30 dias. Os

sinais clínicos são anorexia, alteração do reflexo, tremor, paralisia, ansiedade (AGUILAR-SÉTIEN et al., 1998), irritabilidade à luz e a sons, prostração, conjuntivite purulenta, incontinência urinária, desidratação, perda de peso (ALMEIDA et al., 2005) e isolamento do restante da colônia (AGUILAR-SÉTIEN, 2005). O surgimento dos sinais clínicos se dá 24 a 72 horas antes da morte (AGUILAR-SÉTIEN et al., 2002). Mas alguns morcegos também morrem sem apresentar qualquer sinal clínico aparente (ALMEIDA et al., 2005).

A raiva também pode apresentar cursos atípicos, nos quais podem ocorrer prolongamento do PI, paralisia limitada a certos músculos, manifestações de gastroenterite hemorrágica, da qual o animal se cura, mas morre poucos dias depois (FERREIRA, 1976).

3.7. Métodos de Diagnósticos

O diagnóstico laboratorial deve ser realizado para confirmar uma suspeita clínica de raiva (LIEBERMANN, 1988). Os métodos diagnósticos para a raiva são: imunofluorescência direta (IFD), exame histopatológico, isolamento viral em camundongos, neutralização viral, microscopia eletrônica (DE MATTOS et al., 2001; LIEBERMANN, 1988), isolamento viral em cultivo celular, imunistoquímica, reconhecimento de epitopos específicos com anticorpos monoclonais (MAbs) e transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (DE MATTOS et al., 2001).

O diagnóstico por IFD de impressão da córnea, o exame histopatológico da pele da região occipital da cabeça (folículo piloso) e a inoculação de amostra salivar, por via intracerebral em camundongos, podem fornecer o diagnóstico *ante-mortem*. Hoje a técnica mais utilizada para exame *ante-mortem* é a RT-PCR. O isolamento viral, a partir de amostra encefálica ou salivar, pode ser tentado por inoculação intracerebral em camundongos ou pela inoculação em culturas de células de neuroblastoma. As técnicas de RT-PCR e MAbs não só fornecem diagnóstico, mas também permitem identificar a variante viral envolvida na infecção (DE MATTOS et al., 2001).

O exame histopatológico pode ser realizado através de cortes histológicos, impressões teciduais e distensão (esfregaço) de tecido macerado. As colorações

utilizadas podem ser a hematoxilina & eosina, Sellers e Giemsa. Na técnica de Faraco, é utilizada a coloração de Mann (SANTOS, 1975). Nestes métodos, a estrutura que indica resultado positivo para a raiva são os corpúsculos de Negri, porém os mesmos não estão presentes em 10 a 25% das amostras positivas. Os corpúsculos de Negri são encontrados, principalmente, no corno de Ammon (hipocampo cerebral), mas também são encontrados no córtex cerebral, no tronco encefálico, na medula oblonga e em outras partes do SNC. Esses corpúsculos são encontrados com frequência nas células de Purkinje (no cerebelo) e nas células piramidais (corno de Ammon) (SANTOS, 1975). Os corpúsculos de Negri podem ser encontrados, fora do SNC, nas glândulas salivares (LIEBERMANN, 1988), nas células ganglionares da retina, nos gânglios simpáticos satélites do nervo óptico e nos neurônios da retina (RAVISSE, 1981).

A IFD é hoje o método mais utilizado para realizar diagnóstico de raiva, pois é um teste rápido e tão seguro quanto o isolamento viral, e possibilita o diagnóstico mesmo nos casos em que na histopatologia não se encontra corpúsculo de Negri (LIEBERMANN, 1988). Permite a utilização de amostra fresca, congelada ou fixada em formol, desde que seja respeitado o período de conservação (WHITFIELD, 2001).

3.8. Epidemiologia

O vírus da raiva é mantido na natureza pela transmissão de um animal doente para um sadio. A principal forma de transmissão é através da saliva de um animal infectado, mas também há relatos que em cavernas habitadas por milhares de morcegos o vírus pode ser transmitido por viral respiratória (CONSTANTINE, 1962).

O vírus clássico da raiva está presente em quase todos os continentes, com exceção da Oceania. Em alguns países, em especial os países desenvolvidos, estão livres do ciclo urbano da doença, mas não do ciclo silvestre (FUNASA, 1998).

O vírus da raiva é mantido em diferentes ciclos epidemiológicos, normalmente uma variante viral é mantida por uma única espécie hospedeira. Eventualmente o vírus é transmitido para outra espécie hospedeira, mas na maioria

das vezes não se estabelece um novo ciclo epidemiológico nesta espécie (KIENZLE, 2006).

As variantes virais foram detectadas, primeiramente, com a utilização de anticorpos monoclonais específicos para as proteínas G e N. Diversos padrões antigênicos foram estabelecidos para isolados dos diferentes continentes e para os diferentes animais reservatório (FAVORETO et al., 2002; SMITH et al., 1986; WIKTOR e KOPROWSKI, 1980). O desenvolvimento das técnicas de genética molecular veio ratificar a formação dos grupos antigênicos e ainda incrementar maiores informações entre as diferenças genéticas das variantes virais (ITO et al 2001).

Quanto maior o tempo que as amostras estiverem isoladas, maiores serão as divergências na sequência do genoma do vírus. Esse isolamento pode ser geográfico ou pode ocorrer pela falta de relacionamento entre os animais hospedeiros. Foi demonstrado que existem dois grupos filogenéticos principais, um formado por vírus proveniente do ciclo epidemiológico em animais terrestres e outro por vírus do ciclo aéreo (NADIN-DAVIS et al., 2001).

Análises filogenéticas do vírus da raiva isolados de diferentes hospedeiros no Brasil demonstram uma grande separação entre as amostras isoladas de cães e morcegos (ITO et al., 2001). Dentro dos grupos filogenéticos principais também são observadas subdivisões relacionadas à espécie. Por exemplo, vírus isolados de cães domésticos e canídeos silvestres (*Cerdocyon thous*) no Brasil estão no mesmo grupo filogenético principal, no entanto formam subgrupos separados (CARNIELI et al., 2009). Da mesma forma morcegos insetívoros e hematófagos formam subgrupos diferentes na árvore filogenética (KOBAYASHI et al., 2005). Entre os morcegos foram descritas linhagens para as espécies de insetívoros *Lasiurus spp.*, *Histiotus spp.*, *Eptesicus furinalis*, *Molossus spp* e *Nyctinomops laticaudatus*, *Tadarida brasiliensis*, *Myotis spp.* (OLIVEIRA et al., 2010).

As linhagens de vírus da raiva isoladas de *D. rotundus* e *Artibeus lituratus* (linhagens compatíveis com a variante antigênica 3) são muito semelhantes geneticamente, agrupando-se nos mesmos clusters, quando analisados filogeneticamente (KOBAYASHI et al., 2007).

O principal transmissor da raiva aos bovinos no Brasil é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, responsável pela morte de 40 mil cabeças de gado anualmente (KOTAIT et al., 1998). A raiva transmitida pelo *D. rotundus* também é

conhecida como “raiva desmodina”, e o ciclo epidemiológico da raiva entre morcegos e bovinos é conhecido como raiva dos herbívoros ou “raiva rural”. Os herbívoros são hospedeiros acidentais na epidemiologia da raiva rural, muito raramente transmitem a raiva para outro animal, mas contribuem servindo de sentinelas da presença do vírus (BRASIL, 2009).

Os dados a respeito da velocidade de deslocamento do surto de raiva em herbívoros é controverso, segundo Lord (2000) a velocidade de deslocamento dos surtos de raiva em herbívoros pode variar de 10 a 40 km por ano, já Tadei et al (1991) afirma que o deslocamento é de 20 km por mês. Os morcegos hematófagos infectados estão sempre à frente do foco no gado (TADEI et al., 1991). A raiva se difunde rapidamente entre os *D. rotundus*, o que causa a mortalidade de cerca de 50% da população desse quiróptero. Posteriormente, o número de indivíduos na colônia demora a se restabelecer devido à baixa taxa de natalidade entre os *D. rotundus*. Isto explica o comportamento cíclico do surto de raiva em bovinos, que leva à morte um grande número de animais em um curto espaço de tempo, seguido por período com poucas ocorrências (DELPIETRO e RUSSO, 1996).

Casos de raiva transmitidos ao gado por morcegos hematófagos ocorrem ao longo de todo o ano, sem a presença de sazonalidade em relação à estação do ano ou ao regime de chuvas. Isto se deve ao fato de este morcego se manter ativo o ano inteiro, visto que os *D. rotundus* não hibernam (DELPIETRO e RUSSO, 1996).

Em áreas urbanas e rurais, os morcegos frugívoros e insetívoros também podem transmitir acidentalmente a raiva aos humanos. Há relatos de morcegos infectados com o vírus da raiva em algumas cidades do estado de São Paulo (ALMEIDA, 1994; MARTORELLI, 1995 e 1996; SILVA, 1999).

A raiva humana é endêmica no Brasil, com concentração dos casos nas regiões Norte e Nordeste. Entre 2002 e 2009 foram registrados 115 casos de raiva humana no Brasil, 40% no Norte, 53% no Nordeste, 6% no Sudeste, 1% no Centro-Oeste e nenhum caso no Sul do país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2009).

Considerando os casos de raiva em humanos de acordo com a espécie agressora entre os anos de 1986 e 2011, o cão é o principal transmissor da raiva aos humanos, com 519 casos no total de 767. O morcego é o segundo com 137 casos. Entre 2004 e 2005 foi registrado o maior surto de raiva em humanos

transmitido por morcegos hematófagos, com 22 casos em 2004 e 42 em 2005 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2010).

3.9. Atuação em Focos de Raiva

Quando há a comunicação de um caso suspeito de raiva, procede-se da seguinte forma: anamnese detalhada sobre o caso, exame clínico, necropsia, colheita de material do SNC para diagnóstico e envio ao laboratório. Deve-se realizar a coleta de dados epidemiológicos, os quais consistem em: data de início do foco; número total de indivíduos (mamíferos) susceptíveis ao vírus; quantidade de indivíduos expostos por espécie; quantidade de animais doentes por espécie; quantidade de mortos por espécie; data da última vacinação, tipo de vacina (atenuada ou inativada), laboratório produtor da vacina, data de validade e número da partida; data de ingresso e egresso dos animais, por espécie, na fazenda; condições clínicas dos animais; e caracterização da espécie transmissora (KOTAIT, 1998).

Se o resultado para a raiva for negativo nos exames laboratoriais, deve-se realizar o diagnóstico diferencial para outras doenças. Quando o resultado for positivo, e o transmissor for um cão ou um gato, deve-se rastrear seu trajeto, a fim de identificar as fazendas por onde passou e os animais com quem teve contato, para que sejam vacinados. O animal agressor deve ser sacrificado e os agredidos devem ficar isolados e sob observação por 60 dias (KOTAIT, 1998).

Quando o agressor for um animal selvagem, deve-se comunicar o fato à Vigilância Epidemiológica, à Direção Regional de Saúde (DIR) e/ou à Prefeitura, e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (KOTAIT, 1998).

Os humanos que entrarem em contato com o animal agressor devem ser encaminhados ao posto de Saúde mais próximo, levando consigo uma carta do Médico Veterinário que atendeu o caso, e o fato deve ser comunicado à Vigilância Epidemiológica, à DIR e/ ou à Prefeitura, e ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da região (KOTAIT, 1998).

3.9.1. Ações Permanentes em Áreas Epidêmicas

Em regiões epizooticas/epidêmicas, a vacinação dos herbívoros domésticos deve ser realizada de seis em seis meses. Os primovacinados devem receber um reforço 30 dias após a primeira dose, os recém-nascidos devem ser vacinados aos três meses e revacinados aos quatro meses. Recomenda-se a utilização de vacina inativada e de boa procedência (KOTAIT, 1998).

Área epizootica/epidêmica é normalmente de topografia acidentada, com muitos abrigos naturais para os morcegos hematófagos, o que ajuda na manutenção do número elevado de quirópteros na região. Nestas áreas, o controle da população de *D. rotundus* deve ser constante, a fim de reduzir a circulação do vírus da raiva nessa espécie. Para se conduzir com eficácia o controle dos morcegos, deve-se proceder a um levantamento dos abrigos naturais e artificiais destes quirópteros, a situação dos ataques por morcegos hematófagos, a quantidade de animais agredidos, e o número de lesões por animal. Nas fazendas onde mais que 5% do gado apresentam mordedura pelo morcego hematófago, é recomendável realizar a captura do *D. rotundus* e se fazer o uso da “pasta vampiricida” (Warfarina) nestes morcegos. Quando menos que 5% do rebanho for acometido, o controle dos hematófagos deve ser feito apenas com o uso tópico da “pasta vampiricida” nas mordeduras. O trabalho educacional deve ser realizado de forma a conscientizar os proprietários e tratadores de animais sobre a importância de se inviabilizar os abrigos artificiais, identificar e comunicar a existência de novos abrigos, a importância da vacinação, e a revacinação dos primovacinados 30 dias após a primeira dose (KOTAIT, 1998).

Complementarmente ao controle dos morcegos hematófagos, deve-se proceder às ações de vigilância epidemiológica que são: o levantamento do índice de mordedura por *D. rotundus* de dois em dois meses, a verificação do repovoamento oito dias após a captura, a inspeção de abrigos, o atendimento de casos suspeitos, a realização de exames laboratoriais, o levantamento epidemiológico da doença, além de ações permanentes de educação que mantenham a população, a prefeitura e os CCZs (Centros de Controle de Zoonoses) alertas para as questões relativas à raiva. (KOTAIT, 1998).

3.9.2. Ações Permanentes em Áreas Endêmicas

A vacinação em áreas endêmicas deve ser realizada uma vez por ano, com vacina inativada. Os primovacinados devem receber duas doses da vacina, com intervalo de 30 dias entre as aplicações e, os animais recém-nascidos devem ser vacinados aos três meses e receber a segunda dose 30 dias após a primeira. Os métodos utilizados para o controle da população de morcegos hematófagos são os mesmos das áreas epizoóticas/epidêmicas (KOTAIT, 1998).

Além do controle dos morcegos, deve-se proceder às ações de vigilância epidemiológica, que serão conduzidas da mesma forma que em regiões epidêmicas, exceto pelo levantamento do índice de mordedura por *Desmodus rotundus*, que será realizado de quatro em quatro meses ao invés de dois em dois meses (KOTAIT, 1998).

3.9.3. Atendimento a Focos em Áreas Esporádicas

Nestas regiões, a maior ênfase deve ser ao atendimento do caso suspeito e todos os esforços deverão ser despendidos para o controle de cada episódio, de forma a impedir a disseminação dos mesmos para outras propriedades da área de influência do foco. A área de influência do foco compreende toda a área até 5 km de raio de distância do mesmo. As medidas de controle do foco são as mesmas adotadas nas regiões endêmicas e epidêmicas (KOTAIT, 1998).

Em áreas esporádicas, depois de controlado o foco (“silêncio sintomatológico”), as ações de vigilância devem perdurar por 12 meses. Deve-se fazer o levantamento do índice de mordedura de morcego nos rebanhos, por amostragem, com intervalos de quatro meses. É importante verificar as condições de re-povoamento das colônias dos hematófagos, e inspecionar os novos abrigos naturais e artificiais encontrados, a fim de verificar a presença do *Desmodus rotundus* (KOTAIT, 1998).

3.10. Biologia dos morcegos

Morcegos pertencem à ordem Chiroptera, o termo origina-se dos radicais *chiro* que significa mão e *ptera* que significa asa. Ou seja, animais com as mãos transformadas em asas. É a segunda ordem em número de espécies, com cerca de 987 formas descritas, cujo número só é superado pela ordem Rodentia (ESBÉRARD, 2004). São os únicos mamíferos com capacidade de voo verdadeiro, a maioria das espécies é de tamanho pequeno (STORER et al., 2002), não ultrapassando 100g de peso (ESBÉRARD, 2004). Os membros anteriores e os 2º a 5º dedos são longos e sustentam uma fina membrana do tegumento que forma a asa, que em algumas espécies inclui os membros posteriores e a cauda. Nos membros anteriores apenas o 1º dedo (e o 2º em algumas espécies de frugívoros) possui garra. Os pés são pequenos e todos os dedos possuem garras afiadas e curvas (STORER et al., 2002).

Exceto as regiões polares, os quirópteros são encontrados em todos os continentes (ESBÉRARD, 2004). São divididos em 16 famílias distribuídas em duas subordens, a Megachiroptera e a Microchiroptera. A primeira compreende morcegos frugívoros de grande porte que habitam a Ásia e a África, a maior espécie chega a 30cm de cabeça e corpo, e 1,5m de envergadura. A subordem Microchiroptera contém 15 famílias com cerca de 135 gêneros e diversas espécies de morcegos de pequeno porte. Dentre as espécies, vários são os hábitos alimentares dos quirópteros, insetívoros, frugívoros, hematófagos, etc. (STORER et al., 2002).

São animais de hábito crepuscular e noturno, grande parte das espécies orienta-se por ecolocalização, emitindo sons, inaudíveis aos humanos e, quando se chocam com objetos, retornam para o animal sob forma de eco (ESBÉRARD, 2004).

A espécie *Nyctinomops laticaudatus* tem hábito alimentar insetívoro, pertence à subordem Microchiroptera e família Molossidae. É um morcego de pequeno porte, comprimento total de 102 mm e peso de 10,6 g. Este morcego é encontrado desde o centro do México, passando por toda América Central, noroeste do Peru, Colômbia, Venezuela, Guianas, Suriname, Brasil, Paraguai, Bolívia e noroeste da Argentina (AVILA-FLORES et al., 2002). Está distribuído em quase todo o Brasil (FABIAN e GREGORIN, 2007). As fêmeas apresentam estro sazonal no período chuvoso e a gestação resulta em apenas uma cria (AVILA-FLORES et al., 2002).

O *N. laticaudatus* ocupa diversos tipos de habitats, como florestas tropicais e sub-tropicais, vegetação de cerrado, vegetação pantanosa, manguezais e áreas urbanas. São encontrados em grandes cavernas, em fendas nas rochas e de construções humanas. As colônias podem ter de 150 a 1000 indivíduos. Em algumas situações as colônias são residentes em determinado abrigo e em outras situações um abrigo apresenta intensa mudança dos indivíduos da população, apesar do total de indivíduos ser constante (AVILA-FLORES et al., 2002).

O *Artibeus lituratus* é um morcego frugívoro, mas pode complementar sua alimentação com folhas, flores e insetos. Pertencem à família Phyllostomidae e subfamília Stenodermatinae. Está distribuído desde o México até o Norte da Argentina. No Brasil é encontrado em abundância em quase todas as regiões, em especial em áreas urbanas. É um morcego de grande porte, ultrapassando os 75 g de peso e tem como característica marcante listas brancas faciais. A reprodução apresenta dois períodos de pico, no Brasil, fevereiro a março e outubro a novembro (ZORTÉA, 2007).

O *A. lituratus* tem o hábito de abrigar-se na copa das árvores, sob folhas de palmeiras e outras árvores (ZORTÉA, 2007), mas também é descrito abrigando cavernas, inclusive em abrigos ocupados por *D. rotundus* (TRAJANO, 1984). As colônias de *A. lituratus* são formadas por poucos animais, 2 a 14, compostas por um macho dominante, várias fêmeas e morcegos jovens. Os machos residem em um abrigo, e não é comum alterar o seu local, já as fêmeas não são exclusivas de um único macho, elas frequentemente movem-se para abrigos adjacentes, ocupados por diferentes machos (MUÑOZ-RAMOS et al., 2008).

Há três espécies de morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*. As três espécies fazem parte da família Phyllostomidae e subfamília Desmodontinae. A espécie *D. rotundus* é mais comum e mais amplamente distribuída, as duas outras são menos distribuídas e não constituem um grande problema na epidemiologia da raiva. Essas espécies alimentam-se exclusivamente de sangue, sendo que a preferência do *D. rotundus* é pelo sangue de mamíferos, mas também pode alimentar-se de sangue de aves. Os *Diaemus youngi* e *D. ecaudata* alimentam-se basicamente de sangue de aves, mas podem alimentar-se também de sangue de mamíferos (TADEI et al., 1991).

O *D. rotundus* habita regiões desde o norte do México até a região norte da Argentina. É um animal basicamente cavernícola, mas pode colonizar outros abrigos

como oco de árvores e abrigos artificiais. Em áreas de cavernas, onde o alimento não é fator de restrição para o *D. rotundus*, pode ocorrer desequilíbrio na população de morcegos, quando o número de indivíduos de *D. rotundus* cresce exageradamente e essas populações desalojam outras espécies de morcegos do abrigo. Até a década de 80, quando se iniciou o combate ao *D. rotundus*, os abrigos em região cárstica eram dominados por essa espécie. Após esse período, a população de *D. rotundus* não voltou ao seu tamanho original e, em algumas cavernas, são observadas espécies de quirópteros que antes não ocorriam naquele abrigo (TRAJANO, 1995).

Os *D. rotundus* adultos pesam entre 39,5 e 56,7g, os antebraços variam de 61,7 e 71mm de comprimento, com as fêmeas ligeiramente maiores e mais pesadas que os machos. A maior parte dos nascimentos entre os *D. rotundus* ocorre na primavera e no verão, com o nascimento de apenas um filhote, e o tempo de gestação é de aproximadamente 165 a 180 dias (DELPIETRO e RUSSO, 2002).

A estrutura social dos *D. rotundus* é organizada em dois tipos de colônias, a colônia principal ou harém, composta de várias fêmeas com seus filhotes e poucos machos adultos; e outra colônia composta apenas de machos, esses últimos podem ser aceitos na colônia principal quando a temperatura ambiente é reduzida (DELPIETRO e RUSSO, 2002). Quirópteros dessa espécie são considerados agressivos e constantemente são encontrados morcegos com cicatrizes provocadas por briga entre eles (ROCHA, 2005).

Em regiões de criação de gado, os *D. rotundus* vivem como um animal sinantrópico, suas populações são grandes, a alimentação depende quase que exclusivamente do gado e os ataques aos humanos são esporádicos. No ecossistema com escassa produção de gado, as populações de *D. rotundus* são muito menores, a alimentação depende de diferentes espécies animais e os ataques a humanos são mais frequentes (DELPIETRO e RUSSO, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram escritos dois artigos a partir das análises deste trabalho. O artigo 1, intitulado " Filogeografia do vírus da raiva isolado de herbívoros e morcegos no Estado do Espírito Santo, Brasil", apresenta os aspectos da dispersão do vírus da raiva em herbívoros domésticos e morcegos no Estado do Espírito entre os anos de 2006 e 2010, demonstrando a influência do relevo deste Estado no deslocamento do vírus transmitido pelos *D. rotundus*.

O artigo 2 intitulado "Caracterização molecular do vírus da raiva em morcegos não-hematófagos no Estado do Espírito Santo, Brasil" aborda a caracterização molecular de amostras de linhagens de vírus da raiva isoladas a partir de morcegos insetívoros (*Nyctinomops laticaudatus*) e frugívoros (*Artibeus lituratus*). Foi demonstrada que há linhagens específicas de vírus da raiva para cada uma destas espécies de morcegos.

4.1. Amostras da análise filogeográfica

Foi analisado um conjunto de 41 isolados do vírus da raiva de material encefálico de herbívoros e morcegos. Quarenta amostras, de diversas regiões do Espírito Santo, foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) e a sequência JQ071971 é proveniente de morcego hematófago capturado no norte do estado do Rio de Janeiro por Vieira et al. 2010 (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras de vírus da raiva (31 de bovinos, 7 de equinos, 2 de *Artibeus lituratus* e 1 de *Demosdus rotundus*) isoladas no estado do Espírito Santo, Brasil, entre 2006 e 2010

Amostra	Município de Isolamento	Nº na Árvore	Espécie	Ano	Nº de Acesso
392/10	Cariacica	01	Bovino	2010	JQ071970
182/10	Viana	02	Bovino	2010	JQ071956
261/06	Guarapari	03	Bovino	2006	JQ071960
190/10	Vitória	04	<i>Artibeus lituratus</i>	2010	JQ071957
034/10	Vitória	04	<i>Artibeus lituratus</i>	2010	JQ071944
178/07	Boa Esperança	05	Bovino	2007	JQ071955
307/09	Conceição da Barra	06	Bovino	2009	JQ071965
399/08	Dores do Rio Preto	07	Bovino	2008	JQ071972
160/08	Nova Venécia	08	Equino	2008	JQ071954
369/10	Pancas	09	Bovino	2010	JQ071968
352/08	Ecoporanga	10	Bovino	2008	JQ071967
205/10	Água do Norte	11	Bovino	2010	JQ071959
075/09	Vila Pavão	12	Bovino	2009	JQ071947
270/10	Governador Lindemberg	13	Bovino	2010	JQ071962
030/07	São Gabriel da Palha	14	Bovino	2007	JQ071943
194/08	Linhares	15	Bovino	2008	JQ071958
133/10	Baixo Guandu	16	Bovino	2010	JQ071951
151/08	Afonso Cláudio	17	Equino	2008	JQ071952
084/09	Ibatiba	18	Bovino	2009	JQ071948
048/09	Laranja da Terra	19	Bovino	2009	JQ071945
329/10	Itarana	20	Bovino	2010	JQ071966
777/09	Santa Teresa	21	Bovino	2009	JQ071979
305/10	Muqui	22	Bovino	2010	JQ071964
614/09	Alegre	23	Bovino	2009	JQ071977
580/09	Iconha	24	Bovino	2009	JQ071975
265/10	Rio Novo do Sul	25	Bovino	2010	JQ071961
760/08	Itapemirim	26	Bovino	2008	JQ071978
371/09	Apiacá	27	Bovino	2009	JQ071969
993/08	Mimoso do Sul	28	Equino	2008	JQ071982
304/08	Alegre	23	Equino	2008	JQ071963
590/07	Guaçuí	29	Bovino	2007	JQ071976
792/07	Ibitirama	30	Bovino	2007	JQ071980
127/06	Conceição do Castelo	31	Bovino	2006	JQ071950
542/08	Castelo	32	Bovino	2008	JQ071974

Tabela 1. Cont.

Amostra	Município de Isolamento	Nº na Árvore	Espécie	Ano	Nº de Acesso
989/07	Rio Novo do Sul	25	Bovino	2007	JQ071981
1240/07	Ibiraçú	33	Equino	2007	JQ071983
413/08	Aracruz	34	Bovino	2008	JQ071973
154/09	Serra	35	Equino	2009	JQ071953
003/08	Fundão	37	Equino	2008	JQ071942
116/06	João Neiva	36	Bovino	2006	JQ071949
0399/06	Quissamã - RJ	38	<i>Desmodus rotundus</i>	2006	JQ071971

4.2. Imunofluorescência direta

As amostras foram estocadas a -20°C até a análise, e o diagnóstico foi realizado pela técnica de imunofluorescência direta descrita por Dean et al. (1996). A técnica foi realizada no órgão que cedeu as amostras, IDAF.

4.3. RT-PCR e sequenciamento

A RT-PCR foi realizada como descrito por Carnieli et al. (2008), utilizando os iniciadores (*primers*) descritos por Sato et al. (2004), Ga3222-40 (senso, 5'CGCTGCATTTTTRTCARAGT3', posição 3221-3239 do genoma viral) e Gb4119-39 (antissenso, 5'GGAGGGCACCATTTGGTNTC3', posição 4116-4135 do genoma viral). O sequenciamento foi realizado como descrito por Oliveira et al. (2010), com os mesmos iniciadores utilizados na RT-PCR. As técnicas estão descritas abaixo.

4.3.1. Extração do RNA total

Para a extração do RNA era utilizado aproximadamente 100 mg de tecido, que era picotado com bisturi estéril antes de ser colocado em tubo livre de RNase e DNase. Adicionava-se às amostras 1 mL de *Trizol Reagent* (Invitrogen®) e homogeneizava-se em vortéx.

As amostras eram incubadas à TA por 5 min. Em seguida, adicionava-se 200 µL de clorofórmio, era feita a homogeneização e incubava-se por 3 min. à TA. Em seguida, realizava-se a centrifugação por 15 min. Retirava-se então a fase aquosa (sobrenadante) e a transferia para outro tubo. Adicionava-se a esse tubo 500 µL de álcool isopropílico e novamente homogeneizava-se a amostra. Após uma incubação por 10 min. à TA, centrifugava-se por 10 min.

Ao final da centrifugação, formava-se um precipitado no fundo do tubo. Vertia-se o tubo para desprezar o sobrenadante permanecendo apenas o precipitado. Feito isso, adicionava-se 1 mL de etanol a 75%, homogeneizava-se em *vórtex* e centrifugava-se por 5 min. Novamente, vertia-se o tubo para desprezar o etanol e secava-se o tubo.

Adicionava-se 25 µL de água livre de RNase e DNase ao tubo, pipetava-se 50 vezes para ressuspender o precipitado, levava-se ao *vórtex* por 15 seg., fazia-se uma centrifugação rápida e colocava-se o tubo em banho 56°C por 10 min. Em seguida guardava-se as amostras a -20°C até o momento do uso.

4.3.2. Transcrição reversa

Na transcrição reversa (RT) preparava-se para cada amostra uma solução (MIX) com 12 µL de água ultra-pura, 8 µL de tampão (5x *First-Strand Buffer*, Invitrogen®; 250 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM de KCl; 15 mM de MgCl₂), 6 µL de dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato - dATP, dTTP, dCTP e dGTP – 10 mM), 4 µL de DTT (Dithiothreitol 0,1 M, Invitrogen®), 5 µL (10 mM) do *primer* Ga3222-40 (senso, 5'CGCTGCATTTTTRTCARAGT3', posição 3221-3239 do genoma viral) e o , 5 µL (10 mM) do *primer* Gb4119-39 (antissenso, 5'GGAGGGCACCATTTGGTNTC3', posição 4116-4135 do genoma viral).

Após a adição destes componentes homogeneizava-se em *vórtex* rapidamente e levava-se a uma rápida centrifugação (*spin*). Em seguida adicionava-se 1 µL (40 unidades/µL) de RNaseOUT™ (Invitrogen®) e 1 µL (200 unidades/µL) de SuperScript™ II RT (Invitrogen®). Homogeneizava-se gentilmente, pipetando-se para cima e para baixo, levava-se novamente a uma centrifugação rápida e então se colocava 42 µL do MIX para cada tubo, a esse tubo foi adicionava-se 5 µL de RNA total obtido na etapa de extração.

Para evitar contaminação, o MIX foi preparado em capela destinada apenas ao trabalho com material não contaminado. Depois de preparado, levava-se à outra capela para que pudesse ser adicionado o RNA total. Todas as etapas de preparação do MIX e adição do RNA eram feitas com os tubos mantidos em gelo.

Os tubos eram levados ao termociclador (*Mastercycler Gradient* – Eppendorf) à temperatura de 42°C por uma hora para que transcriptase reversa pudesse formar o c-DNA.

4.3.3. PCR (Reação em cadeia pela polimerase)

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), era preparado outro MIX. Para cada amostra, eram utilizados 50,5µL de água ultra-pura, 10µL de tampão (10x PCR *Buffer* – Invitrogen™; 200mM de Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl, 16µL de dNTPs (1,25mM), 5µL de *primer* senso (10mM), 5µL de *primer* anti-senso (10mM) e 5µL de MgCl₂ (50mM).

Os reagentes eram homogeneizados em *vórtex* e centrifugados rapidamente. Em seguida, eram adicionados 0,5µL (5 unidades/µL) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™) e homogeneizava-se levemente. Dessa solução, resultavam 92µL de MIX para cada amostra, a ele adicionavam-se 10µL do c-DNA obtidos na reação de RT. O mesmo cuidado foi observado em relação à contaminação das amostras e quanto ao resfriamento do MIX em gelo.

Os tubos eram levados ao termociclador (*Mastercycler Gradient* – Eppendorf). A amplificação do DNA era realizada com os seguintes ciclos: 1º ciclo, de desnaturação, 95°C por 5min; 2º ciclo, de desnaturação, 94°C por 30s; 3º ciclo, de anelamento, 55°C por 45s; 4º ciclo, de extensão, 72°C por 2min. Repetia-se do 2º ao 4º ciclo 35 vezes e, em seguida, terminava-se com o ciclo de extensão final a 72°C por 10min. Ao final dos ciclos, as amostras estavam prontas para serem visualizadas em gel ou armazenadas a -20°C até o momento do uso.

4.3.4. Purificação do DNA

A purificação do DNA das amostras foi feita de duas maneiras: as amostras que não apresentaram bandas inespecíficas na eletroforese foram purificadas direto do produto da PCR. As amostras que apresentaram uma banda inespecífica foram purificadas a partir do gel. As duas técnicas foram realizadas com o *Kit GFX* (Amersham Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante.

Para a purificação, direto do produto da PCR, adicionava-se 90 μL do produto da PCR em um tubo de 1,5 mL, adicionava-se 500 μL de *Capture Buffer* (“tampão de captura”) e pipetava-se para homogeneizar. O homogeneizado era adicionado a uma coluna dentro do tubo coletor e então eram levados à centrífuga por 30 seg. a 14.000 *g*.

Para as amostras purificadas a partir do gel era realizada uma eletroforese com 90 μL do produto da PCR em dois poços do gel de agarose a 1% para separar as bandas. Com transluminador UV era possível visualizar e então cortar, com estilete estéril, o gel com a banda específica, da qual foi purificado o DNA. O gel cortado foi pesado, colocado em um microtubo de 1,5 mL e, em seguida, adicionava-se 100 μL de “tampão de captura” para cada 100 mg de gel, homogeneizava-se em *vórtex* e levava-se os tubos ao bloco aquecido a 60°C por 5 a 10 min. para liquefazer o gel.

Depois, transferia-se o material do tubo para a coluna dentro do tubo coletor e centrifugava-se a 14.000 *g* por 30 seg. Desta etapa em diante o procedimento era o mesmo para os dois tipos de purificação.

Descartava-se o material no fundo do tubo coletor, voltava-se a coluna para o tubo e acrescentava-se a ela 500 μL de *Wash Buffer* (“tampão de lavagem”). Centrifugava-se por 30 seg. a 14.000*g* e, em seguida, descartava-se o tubo coletor e a coluna era colocada em novo tubo de 1,5 mL.

Para eluir o DNA da coluna, adicionava-se 30 μL de tampão EB (*Eluitor Buffer*), incubava-se por 1 min. a TA e centrifugava-se por 1 min. a 14.000 *g*. Depois da centrifugação, a coluna foi descartada e a amostra permaneceu no tubo.

Para quantificar o DNA, 4 μL da amostra era adicionado a 1 μL de corante (10x *BlueJuice* – Invitrogen®) e, em seguida, era aplicado em gel de agarose a 2% e submetido a eletroforese.

A quantificação do DNA da amostra em ng/ μ L foi dada pela comparação com o padrão de quantificação de massa (*Mass Ladder* – Invitrogen®), corrido na mesma eletroforese.

4.3.5. Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com ddNTPs (didesoxinucleotídeos) marcados com fluorocromos específicos e o resultado lido em sequenciador automático. Seguiu-se o protocolo do *Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)*. O *Kit* apresenta um Mix pronto para uso, ao qual é adicionado apenas a amostra e o *primer*. Como controle utilizou-se uma amostra de DNA de fita dupla, *pGEM®-3Zf(+)*, com seu respectivo *primer* senso, -21 M13.

Para cada amostra realizava-se duas reações, uma com o *primer* senso Ga3222-40 e outra com o anti-senso Gb4119-39. Era preparada uma solução com o produto da purificação do DNA (de 12,5 a 60ng de DNA, dependendo da quantificação na amostra), 4 μ L de Mix, 1 μ L de *primer* (senso ou anti-senso a 3,2 mM) e água ultra-pura q.s.p. 10 μ L.

Os reagentes eram levados ao termociclador e submetidos aos seguintes ciclos de temperatura: 1º ciclo, de desnaturação, 96°C por 1 min.; 2º ciclo, de desnaturação, 96°C por 10 seg.; 3º ciclo, de anelamento, 50°C por 5 seg., 4º ciclo, de extensão a 60°C por 4 min. Repetia-se do 2º ao 4º ciclo 35 vezes. E por fim o 5º ciclo de manutenção de 4°C até a retirada dos tubos do termociclador. Em todas as mudanças de ciclos é necessário que haja uma rampa rápida de temperatura de 1°C por segundo.

Em seguida, o produto do sequenciamento era purificado por *Sephadex* com o *Kit* da Amersham Biosciences, seguindo as recomendações do fabricante. Adicionava-se *Sephadex™ G-50* à placa *Multiscreen HV*, com auxílio de medidor próprio do *Kit*. Adicionava-se 300 μ L de água ultra-pura por poço e incubava-se por três horas.

Colocava-se uma placa coletora debaixo da placa *Multiscreen HV* e centrifugava-se a 710 g por 10 min. Descartava-se a água da placa coletora e colocava-se mais 140 μ L de água ultra-pura em cada poço e, em seguida,

centrifugava-se por 10 min. a 710 g. Descartava-se a água da placa coletora e fazia-se uma nova centrifugação por 10 min. a 710 g. Trocava-se a placa coletora por uma outra placa de PCR, coloca-se o produto do sequenciamento em cima do *Sephadex* e centrifugava-se por 10 min. a 710 g. Transferia-se o produto resultante da centrifugação em tubos de 0,2 mL e levava-se os tubos para o termociclador a 95°C por 15 min. para evaporar todo o líquido.

As amostras eram ressuspensas em 10 µL de formamida *Hi-Di*, homogeneizadas em *vórtex*, transferidas para a placa de sequenciamento e centrifugadas rapidamente (*spin*). A placa era levada ao termociclador a 95°C por 5 min. e, em seguida, colocada em gelo por mais 5 min. Depois, era feita nova centrifugação rápida. Então, a placa era colocada no sequenciador automático ABI-3100 da Applied Biosystems.

4.4. Análise Filogeográfica

Foi utilizado o Critério de Informação Akaike corrigido (AICc), disponibilizado no software *jModelTest* (POSADA, 2008), para determinar o modelo de substituição apropriado para analisar o conjunto de amostras. O modelo transicional, com frequência de bases iguais e taxa de distribuição gama em quatro categorias (TIMef+G+Γ4) foi escolhido.

As sequências de nucleotídeos foram analisadas com o software *BEAST* v1.6.1 (DRUMMOND e RAMBAUT, 2007) utilizando a estatística Bayesiana com o método de Monte Carlo via cadeia de Markov (MCMC).

O software *BEAUTI* v1.6.1 foi utilizado para criar um arquivo no formato XML, o qual permite a entrada de dados no *BEAST* v.1.6.1. As sequências e os anos de isolamento foram inseridos nesse arquivo XML com o modelo de substituição GTR+G+Γ4, posteriormente, o arquivo foi alterado manualmente para modelo de substituição TIMef+G+Γ4, como descrito no tutorial do *BEAST* (http://beast.bio.ed.ac.uk/Substitution_model_code).

A escolha do relógio molecular e do modelo demográfico foi realizada pela análise da melhor combinação entre esses parâmetros. Foram produzidos nove arquivos XML com a combinação entre os relógios moleculares (estrito; relaxado: não correlacionado exponencial; e relaxado: não correlacionado lognormal) e os

modelos demográficos para árvore coalescente (tamanho de população constante; crescimento exponencial; e crescimento logarítmico). A escolha pelo relógio molecular estrito e modelo demográfico de crescimento exponencial da população foi feita com base no maior valor de ESS (effective sample size) do parâmetro posterior, visualizado no *software Tracer v1.5* (RAMBAUT e DRUMMOND, 2003). As análises foram baseadas em 20 milhões de passos, amostrados a cada 2 mil, os quais foram eliminados os primeiros 10%.

O arquivo XML que apresentou o maior valor de ESS foi configurado manualmente para promover uma análise filogeográfica contínua usando *relaxed random walks* (RRW), como descrito no tutorial do *BEAST* (<http://beast.bio.ed.ac.uk/RRWs>). Foi considerado como o local do foco de raiva a sede do município. Foi incluída na análise, a formação de uma árvore filogenética de distância por substituição de nucleotídeos.

Foram realizadas duas corridas de 100 milhões de passos, amostrados a cada 10 mil. Os primeiros 10% dos resultados foram descartados. O resultado das duas corridas foi comparado no *Tracer v1.5* (RAMBAUT e DRUMMOND, 2003) para conferir se as mesmas convergiam para o mesmo resultado. As duas corridas foram unidas com o *software LogCombiner v1.6.1* e o arquivo resultante foi utilizado para anotar a árvore filogenética com o *software TreeAnnotator v1.6.1*, pela credibilidade máxima do clado (MMC), com descarte de 10% das primeiras árvores; limite da probabilidade posterior igual a zero; e usando os valores médios de tamanho dos nós. A árvore filogenética resultante foi visualizada no *software FigTree v1.3.1* (RAMBAUT, 2009).

O mesmo arquivo utilizado para visualizar a árvore de tempo foi analisado pelo *software Spread* (BIELEJEC et al., 2011) a fim de traduzir a árvore filogenética para o formato *keyhole markup language* (kml), para visualização no *software Google Earth* (<http://earth.google.com>), sobre o mapa do relevo do estado do Espírito Santo (MIRANDA, 2005).

4.5. Análise filogenética dos isolados de morcegos não-hematófagos

Foram utilizados os três isolados do vírus da raiva provenientes de morcegos não-hematófagos encontrados da região urbana do município de Vitória,

estado do Espírito Santo (Tabela 2). As sequências de glicoproteína dos vírus da raiva isolados foram alinhadas pelo método ClustalW com sequências recuperadas no *GenBank*.

Tabela 2. Isolados de vírus da raiva de morcegos não hematófagos no município de Vitória, estado do Espírito Santo, Brasil

Isolado	Espécie	Ano	Nº de acesso
065-10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	2010	JQ071946
034-10	<i>Artibeus lituratus</i>	2010	JQ071944
190-10	<i>Artibeus lituratus</i>	2010	JQ071957

Foram construídas duas árvores filogenéticas utilizando o método de distância com o algoritmo *neighbor-joining* e modelo evolutivo *kimura-2*-parâmetros, com 1.000 repetições de *bootstrap*, utilizando o *software* Mega2 (KUMAR et al., 2001). Trinta e três fragmentos do gene da glicoproteína (669 bases), que alinham com o genoma completo da cepa de referência PV (Pasteur virus - M13215) do nucleotídeo 3318 ao 3986, compuseram a árvore filogenética 1. Nesta árvore foram selecionadas sequências isoladas dos principais reservatórios da raiva no Brasil, além da sequência de referência PV, para serem comparadas com as três sequências isoladas no presente trabalho.

A sequências de nucleotídeos e suas respectivas sequências de aminoácidos foram analisadas com o auxílio do *software* BioEdit v7.0.9.0 (HALL, 1999) a fim de verificar as posições com polimorfismo genético ou estrutural.

A árvore filogenética 2 foi construída a partir de 36 sequências da glicoproteína, com 764 bases, que alinham com a cepa de referência PV do nucleotídeo 3318 ao 4081. Nesta árvore foram selecionadas 20 sequências isoladas de *A. lituratus*, 13 isoladas de *D. rotundus*, a sequência de referência PV, além das sequências JQ071944 e JQ071957, isoladas no presente trabalho.

5. RESULTADOS

5.1. Análise filogeográfica

Todas as 41 amostras mostraram alto grau de identidade com amostras relacionadas ao ciclo da raiva em morcegos hematófagos quando submetidas ao *Blastn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), estes isolados são compatíveis com a variante antigênica 3.

A inferência Bayesiana retornou uma taxa de evolução média de $4,14 \pm 0,0573 \times 10^{-4}$ substituições/posição/ano. O valor de ESS para a distribuição posterior foi de 1006,52 e todos os outros parâmetros tiveram valor de ESS maior que 500.

Foram atribuídos dois pontos de corte arbitrariamente, o ano de 1970 para a formação dos clusters principais e o ano de 1990 para os sub-clusters. As árvores filogenéticas de tempo (Figura 3) e de substituição apresentaram a mesma topologia, com a formação de três clusters principais e a formação dos mesmos sub-clusters. Na árvore de tempo, o mais recente ancestral comum (MRCA) remonta ao ano de 1954, ou seja, há 56 anos. Na árvore de substituição a maior distância foi de 5% de nucleotídeos divergentes.

A análise da árvore filogenética de tempo sobre uma perspectiva geográfica, visualizada no Google Earth, demonstrou que as amostras do cluster 1 se concentraram na Região Metropolitana; as amostras do cluster 2 se subdividem em dois sub-clusters, no sub-cluster 2.1 foram encontradas amostras das microrregiões Noroeste 1 e 2, Polo Colatina, Litoral Norte e Caparaó; no sub-cluster 2.2 foram encontradas amostras do Polo Linhares, Polo Colatina, Noroeste 2, Central Serrana, Sudoeste Serrana e Caparaó; e no cluster 3 foram observadas amostras das microrregiões Metropolitana, Polo Linhares, Sudoeste Serrana, Polo Cachoeiro, Metrópole Expandida Sul e da Região Norte do Estado do Rio de Janeiro (Figura 4).

Foi observado que amostras isoladas em regiões próximas tendem a formar sub-clusters na  rvore. Exce o a esta regra foi a amostra 399-08, de Dores do Rio Preto (região do Caparaó), que apresentou alto grau de identidade com amostras isoladas nas Microrregiões Noroeste 1 e 2 e do Polo Colatina.

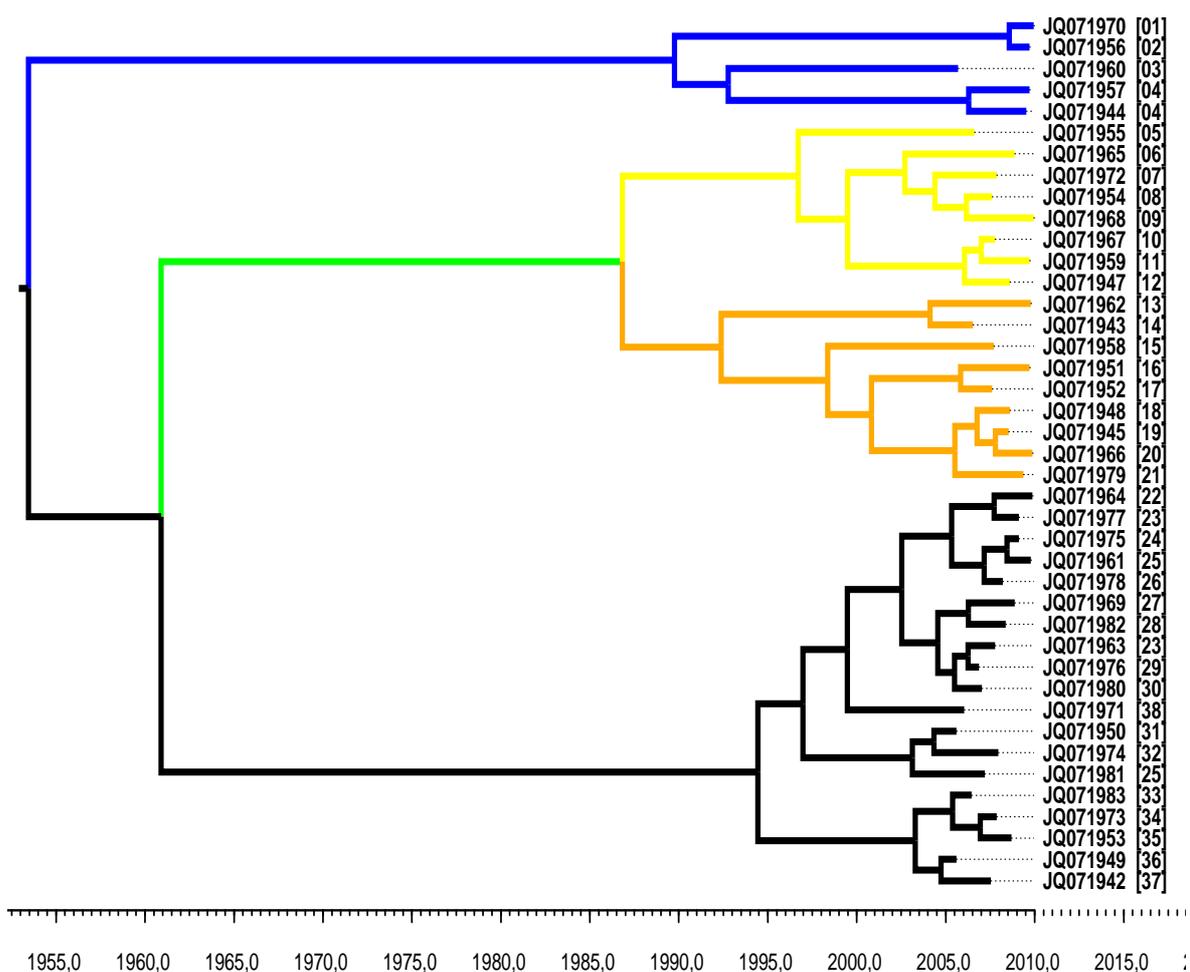


Figura 3. Árvore filogenética de tempo pela máxima credibilidade do clado (MMC) para sequências de 807 nucleotídeos do gene G do vírus da raiva. Cluster 1 (azul); Cluster 2 (verde), sub-cluster 2.1 (amarelo) e sub-cluster 2.2 (laranja); Cluster 3 (preto). O número em frente de cada braço terminal representa a sequência, e o número entre colchetes o município onde foi isolada.

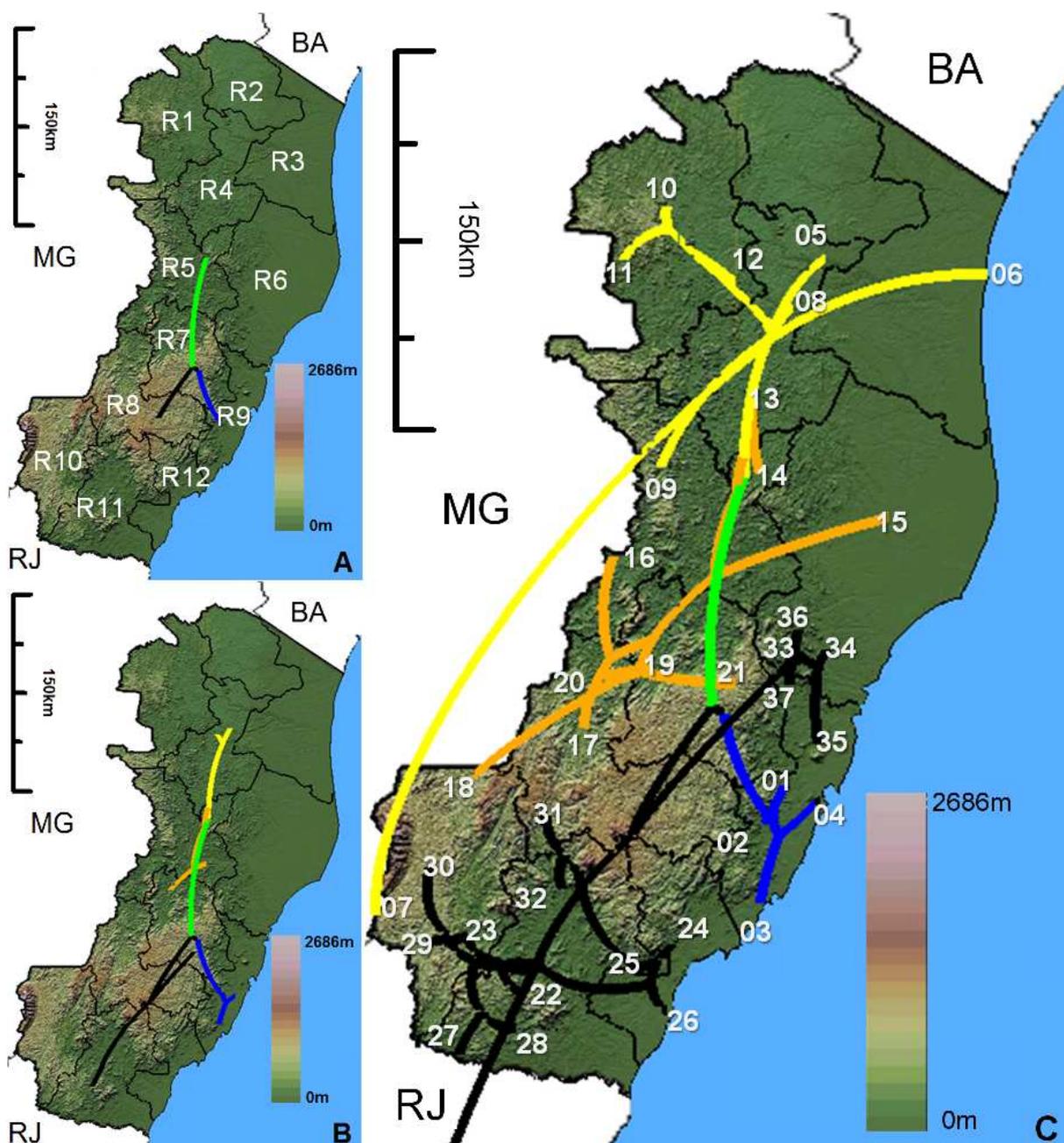


Figura 4. Dispersão do surto de raiva entre 1955 e 2010 no Espírito Santo, Brasil. (A) Dispersão do vírus no ano de 1985. As microrregiões do Estado estão representadas por R1 - Noroeste 1, R2 - Extremo Norte, R3 - Litoral Norte, R4 - Noroeste 2, R5 - Pólo Colatina, R6 - Pólo Linhares, R7 - Central Serrana, R8 - Sudoeste Serrana, R9 - Metropolitana, R10 - Caparaó, R11 - Pólo Cachoeiro, R12 - Metrópole Expandida Sul. (B) Dispersão do vírus no ano 2000. (C) Dispersão do vírus no ano 2010. Os números representam os municípios com casos de raiva representados na Tabela 1. O Espírito Santo faz divisa com os Estados, Bahia (BA), do Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais e com o oceano Atlântico.

5.2. Análise filogenética dos isolados de morcegos não-hematófagos

A árvore filogenética 1 (Figura 5), formada a partir das sequências isoladas no presente trabalho e as sequências recuperadas no *GenBank*, formou oito clusters, os quais agruparam segundo a espécie de morcego do isolamento viral. Os clusters formados, segundo o gênero ou espécie, foram os seguintes: *Nyctinomops laticudatus*, *Histiotus spp.*, *Molossus spp.*, *Eptesicus furinalis*, *Myotis spp.*, *Lasiurus spp.*, *Desmodus rotundus* + *Artibeus lituratus*, e Cão.

A sequência JQ071946 isolada de *N. laticaudatus* formou um cluster com as sequências, recuperadas no *GenBank*, isoladas a partir dessa mesma espécie de morcego insetívoro. A identidade de nucleotídeos entre as sequências deste cluster foi maior que 99%.

Na árvore filogenética 1, os isolados JQ071944 e JQ071957 agruparam-se no cluster *D. rotundus* + *A. lituratus*. Este cluster apresenta a formação de dois sub-clusters, o sub-cluster *D. rotundus* agrupa sequências de morcegos hematófagos e o sub-cluster *A. lituratus* agrupa sequências de Bovinos e *A. lituratus*.

A árvore filogenética 2 (Figura 6) apresenta a formação de dois clusters principais, no cluster 1 agrupam-se isolados de *D. rotundus* e *A. lituratus*, e no cluster 2 agrupam-se somente isolados de *A. lituratus*. O cluster 1 apresenta a formação de três sub-clusters, nos sub-clusters 1.1 e 1.2 agrupam-se apenas isolados de *D. rotundus*, já o sub-cluster 1.3 é formado por quatro isolados de *A. lituratus* e um de *D. rotundus*. Há mais dois ramos na árvore, cada um com apenas uma sequência isolada de *A. lituratus*, os quais não se agruparam com nenhum outro sub-cluster. O cluster 2 não foi dividido em sub-clusters devido ao alto grau de identidade entre as sequências.

A média de identidade de nucleotídeos entre as sequências do cluster 1 foi de 97,6% (extremos de 100 a 95,9%), e entre os isolados do cluster 2 foi de 99,3% (extremos de 100 e 98,5%). Já a média de identidade entre os clusters 1 e 2 foi de 96,6% (extremos de 97,9 a 95,5%). Entre os isolados do sub-cluster 1.1, a média de identidade foi de 99,4% (extremos de 100 a 98,9%), sub-cluster 1.2, média de 99,1% (extremos de 100 a 98,6%), sub-cluster 1.3, média de 98,9% (extremos de 100 a 98%). A média de identidade da relação entre os sub-clusters 1.1 e 1.2 é de 96,7% (extremos de 97,2 e 95,9); sub-clusters 1.1 e 1.3, 96,8% (extremos de 97,3 e 95,9%); e entre os sub-clusters 1.2 e 1.3 é de 97,0% (extremos de 97,3 e 96%).

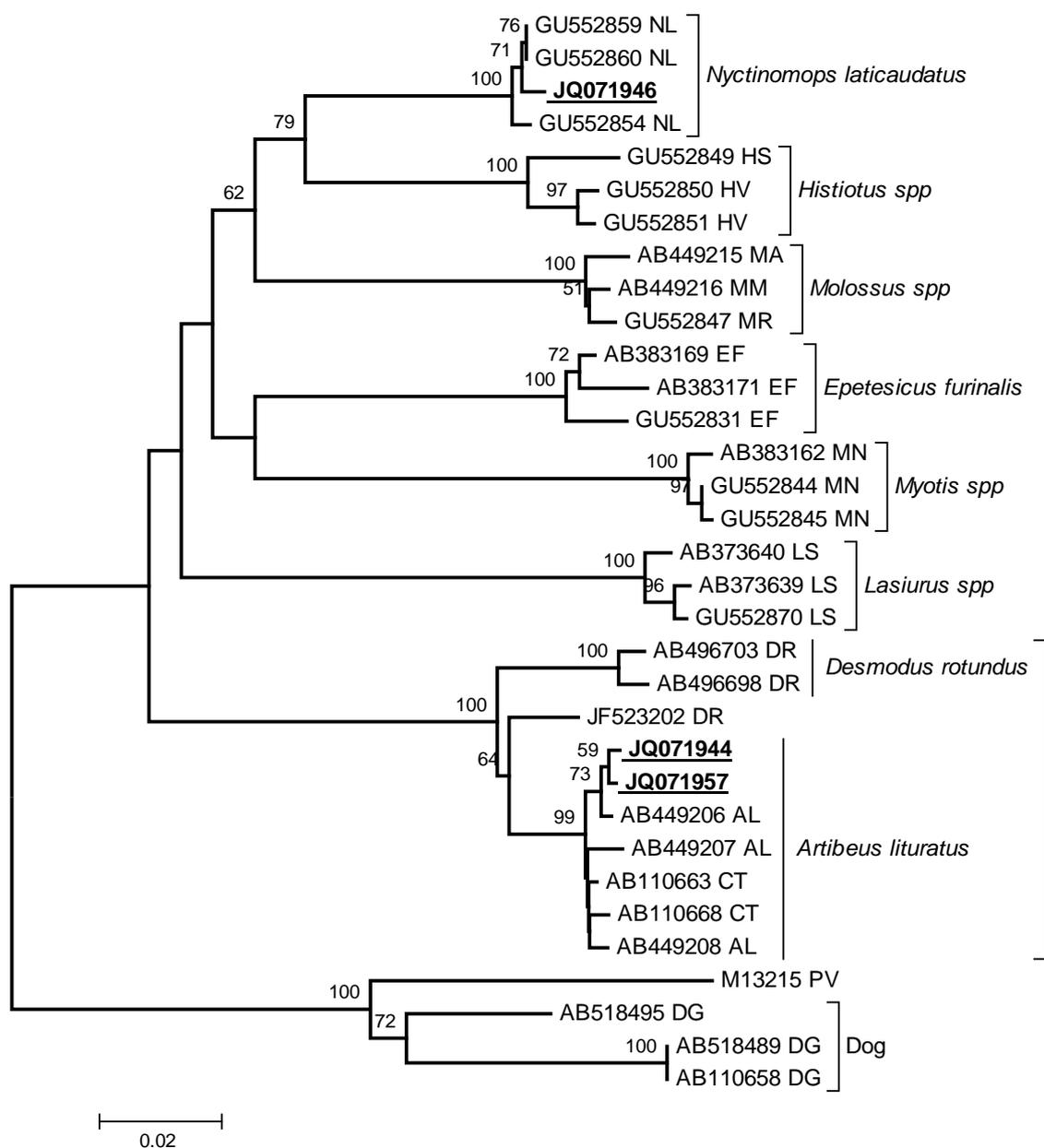


Figura 5. Árvore filogenética morcegos não-hematófagos 1. Construída pelo método de distância com o algoritmo *neighbor-joining* e modelo evolutivo *kimura-2*-parâmetros, com 1.000 repetições de *bootstrap*, a partir de sequências parciais do gene G do vírus da raiva. As sequências do presente trabalho estão enfatizadas em negrito e sublinhadas e as sequências recuperadas do *GenBank* são representadas pelos números de acesso, seguido da espécie de isolamento (NL- *N. laticaudatus*, HS – *Histiotus sp*, HV- *H. velatus*, MA – *M. abrasus*, MM – *M. molossus*, MR – *M. rufus*, EF – *E. furinalis*, MN- *M. nigricans*, LS – *Lasiurus spp.*, DR – *D. rotundus*, AL – *A. lituratus*, CT – Bovino, PV- Pasteur Virus, DG- Dog).

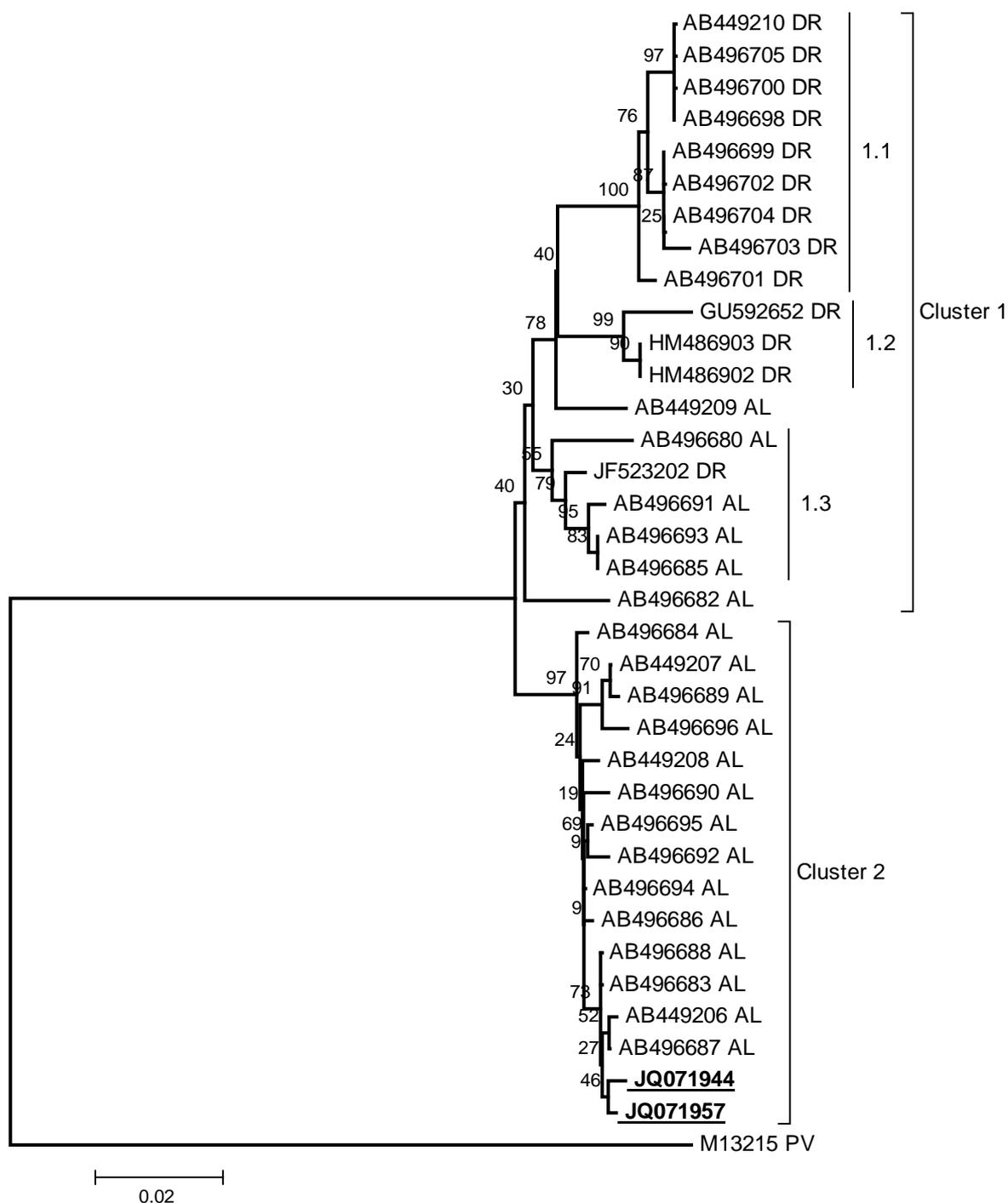


Figura 6. Árvore filogenética morcegos não-hematófagos 2. Construída pelo método de distância com o algoritmo *neighbor-joining* e modelo evolutivo *kimura-2*-parâmetros, com 1.000 repetições de *bootstrap*, a partir de sequências parciais do gene G do vírus da raiva. As sequências do presente trabalho estão enfatizadas em negrito e sublinhadas e as sequências recuperadas do *GenBank* são representadas pelos números de acesso, seguido da espécie de isolamento (DR – *D. rotundus*, AL – *A. lituratus* PV- Pasteur Virus).

Os isolados provenientes de *N. laticaudatus*, incluindo a amostra deste trabalho, apresentaram os seguintes marcadores moleculares específicos para as sequências de nucleotídeos, 21-A, 348-C, 486-T, 504-G e 525-A; e os seguintes marcadores para as sequências de aminoácidos, valina nas posições 12 e 121 e o aminoácido serina na posição 110.

Os isolados de *A. lituratus* apresentaram seis marcadores moleculares específicos na sequência de nucleotídeos, 6-T, 45-A, 249-G, 372-C, 504-C e 651-G. Nenhuma destas mutações resultou em alteração de aminoácidos.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise filogeográfica

Kobayashi et al. (2006) descrevem que amostras de vírus da raiva em regiões de mesma altitude tendem a ser geneticamente mais próximas, no entanto, esses mesmos autores em 2008, observaram que as amostras podem se movimentar das regiões de altas altitudes para as regiões de baixa altitude (Kobayashi, 2008). No presente trabalho foi observado que amostras de altas altitudes relacionam-se com amostras de baixa altitude. No cluster 3 são encontradas amostras intimamente relacionadas na região Metrópole Expandida Sul, que é uma região litorânea de baixa altitude e amostras da região do Caparaó, que é uma região montanhosa

A maioria dos isolados (65%) foi de regiões de baixa altitude (0 a 300 m), contudo as distâncias entre as regiões baixas e de média altitude (300 a 600 m), na maioria dos casos, não ultrapassou 20 km, distância que pode ser percorrida pelo *D. rotundus* para se alimentar (Grennhall et al., 1983). Nas regiões de média altitude predominam as formações rochosas, que formam muitos abrigos naturais para o morcego hematófago.

Nas regiões de alta altitude (>600 m), Central Serrana e Sudoeste Serrana, as amostras foram obtidas em municípios limítrofes entre as regiões altas e baixas. No entanto, foram isoladas amostras no centro da região do Caparaó, que também é uma região de alta altitude. As montanhas exercem uma influência no deslocamento do *D. rotundus* e conseqüentemente nos surtos de raiva de forma a manter linhagens de vírus geneticamente mais próximas entre as regiões cercadas por montanhas (Kobayashi et al., 2006 e Velasco-Villa et al. 2006). Contudo, este isolamento não é absoluto, como pode ser observado entre amostras do cluster 3 e sub-cluster 2.2. Neste último, o surto se deslocou das regiões de baixa a média altitude, mais ao norte do estado, para as regiões de alta altitude, mais ao sul do estado, município de Ibatiba (região do Caparaó). A sequência JQ071948, isolada neste município, está em uma região de mesma altitude que amostras do cluster 3 e a menor distância entre amostras desses clusters é de 30 km. Portanto é muito

provável que estes dois clusters venham ocupar regiões sobrepostas em um curto intervalo de tempo.

Em uma pesquisa realizada no estado do Rio de Janeiro, foi proposto que amostras de uma bacia hidrográfica tendem a ser geneticamente mais próximas (Romijn et al., 2003). No presente trabalho, a epidemiologia não seguiu este padrão, em todos os clusters analisados havia amostras em pelo menos duas bacias hidrográficas diferentes.

A dinâmica de dispersão do vírus da raiva, visualizada neste trabalho, na maioria das vezes seguiu o padrão de dispersão centrífuga, com o surto partindo de uma região central em direção a uma região periférica vizinha. Esse modelo segue o padrão de comportamento do *D. rotundus*, que apesar de ser uma espécie não migratória, possui o hábito de visitar abrigos vizinhos regularmente, dessa forma, todos os morcegos de uma região estão conectados direta ou indiretamente pelas regiões de sobreposição do alcance dos mesmos (McColl et al., 2000).

A velocidade média de dispersão do vírus foi de 8 km/ano (intervalo de HPD 95%: 2,9 a 13,7 km/ano). Uma exceção à velocidade de deslocamento foi a amostra JQ071972, do município de Dores do Rio Preto. Esta amostra relaciona-se intimamente com amostras da região Noroeste 2, a cerca de 250 km de distância. O tempo desde a bifurcação do ramo da árvore filogenética até o isolamento dessa amostra foi de 3,47 anos, isso resulta em um deslocamento de aproximadamente 72 km/ano, velocidade muito superior a todas as outras observadas. O proprietário do animal relatou que o mesmo havia sido comprado de uma propriedade vizinha e o animal nunca havia se deslocado para outra região do estado. A velocidade de deslocamento desse surto é superior aos relatos de outros autores, segundo Lord (2000) a velocidade de deslocamento dos surtos de raiva em herbívoros é muito variável, com velocidade de 10 a 40 km por ano.

A formação dos três clusters principais ocorreu em dois momentos, a primeira divisão há 56 anos, quando foi formado o cluster 1 e a segunda divisão há 49 anos quando foram formados os clusters 2 e 3. Isso demonstra que não foi possível controlar a raiva nos quirópteros no estado durante esses anos. Dados do órgão oficial de defesa sanitária animal do estado, desde 1980 até 2010, demonstram que os surtos de raiva acontecem de forma cíclica, alternando-se em períodos de alta e baixa prevalência da doença (IDAF, 2010).

A erradicação da raiva dos herbívoros é muito difícil, tendo em vista que o principal transmissor/hospedeiro da doença é o *D. rotundus*, que é um animal silvestre e não existe nenhum tipo de estratégia de imunização para os quirópteros como ocorre para os canídeos silvestres em países desenvolvidos (WHO, 2004). A melhor maneira de evitar a doença nos herbívoros é a vacinação sistemática do rebanho, mas essa estratégia sozinha não é capaz de controlar completamente os surtos, sendo necessário realizar medidas complementares, tais como o controle da população dos quirópteros em áreas endêmicas e a educação da população em relação à raiva dos quirópteros (IDAF, 2010).

Dentre as 41 amostras de vírus analisadas, 31 foram isoladas de bovinos, sete de equinos e três de morcegos (um morcego hematófago do município de Quissamã, Estado do Rio de Janeiro e dois de morcegos frugívoros do município de Vitória, capital do Espírito Santo). Não existe particularidade genética que diferencie amostras isoladas de *D. rotundus* e herbívoros domésticos, pois são esses quirópteros os vetores da doença aos rebanhos. Contudo também não foram encontradas grandes diferenças na identidade de nucleotídeo entre as amostras de morcegos hematófagos e frugívoros, como descrito por outros autores (Fahl, 2009; Kobayashi et al., 2007). Shoji et al. (2004) realizaram análises filogenéticas da nucleoproteína do vírus da raiva isolado de *D. rotundus* e *A. lituratus*, no estado de São Paulo, e verificaram que as amostras são intimamente relacionadas. Não se sabe ao certo qual o papel do *A. lituratus* no ciclo epidemiológico da raiva dos herbívoros. Estudos a respeito da habitação de cavernas por morcegos, no sudeste do Brasil, revelam que o *D. rotundus* e o *A. lituratus* têm preferência pelo mesmo tipo de abrigo, e sempre que a população de *D. rotundus* aumenta em um abrigo, conseqüentemente, diminui a população do *A. lituratus*, que leva a crer que eles disputam a ocupação desses abrigos (Trajano, 1984).

Não foi possível definir a região da raiz da árvore de onde seria encontrado o MRCA. O intervalo HPD 95% para a posição geográfica da raiz da árvore foi muito grande, de forma que ela poderia se localizar em qualquer região do estado. Atribui-se a essa falta de precisão o curto intervalo de tempo de isolamento das amostras, que foi de apenas quatro anos e quatro meses. Análises similares para o vírus da raiva em raccon têm utilizado amostras com intervalo de tempo do isolamento de 20 a 30 anos (Biek et al., 2007; Lemey et al., 2010). Apesar da imprecisão, o resultado é compatível com o esperado na epidemiologia da raiva transmitida por quirópteros.

Deve ser ressaltada a eficácia do modelo de difusão filogeográfica contínua usando o método RRW. Esse método, comparado ao modelo de difusão filogeográfica discreta usando o continuous-time Markov chain (CTMC) (dados não mostrados) (Lemey et al., 2009), apresentou maior consistência nas análises. Foram realizadas exaustivas corridas no *BEAST v1.6.1* com o método CTMC, mantendo-se o mesmo modelo evolutivo, relógio molecular e modelo demográfico utilizados na análise com RRW. A análise das corridas com o CTMC visualizadas no *Tracer v1.5*, mostraram valores de ESS de prior e posterior menores que 200, para a maioria das corridas. Em algumas corridas todos os parâmetros foram superiores a 200, no entanto quando essas corridas foram combinadas com o *LogCombiner v1.6.1*, os valores de ESS caíram drasticamente para quase todos os parâmetros analisados no *Tracer v1.5*. A construção de árvores filogenéticas, a partir das corridas individuais com o método CTMC, que apresentaram valores de ESS satisfatórios, resultou na formação de árvores com topologias semelhantes entre si e semelhante à árvore formada pelo método RRW. Contudo, quando as árvores formadas pelo método CTMC foram analisadas sob o ponto de vista geográfico, a dispersão do vírus ao longo do tempo foi completamente diferente entre elas e também diferente da árvore construída com o método RRW. Outra questão relevante, que advoga em favor do modelo RRW é a velocidade computacional das análises. Nesse método, a velocidade foi cerca de 20 vezes mais rápida que as análises com o modelo CTMC.

Infelizmente não foi possível realizar comparação entre as amostras do Espírito Santo e dos estados vizinhos, Minas Gerais e Bahia, pois não foram encontradas sequências de nucleotídeos da glicoproteína do vírus da raiva de herbívoros ou morcegos nos bancos de dados genéticos disponibilizados na internet. Somente foi possível comparar com uma amostra de *D. rotundus*, do norte do Rio de Janeiro, município de Quissamã a 100 km de distância do Espírito Santo (não mostrado no mapa). A partir do conjunto de amostras analisados, foi possível observar que o vírus da raiva se deslocou do polo Cachoeiro, no Espírito Santo, em direção ao estado do Rio de Janeiro próximo ao ano 2000. A análise da nucleoproteína deste isolado revelou que o mesmo tem 100% de identidade com amostras de bovinos do norte do estado do Rio de Janeiro (Chicarino, 2009) e alto grau de identidade com amostras de bovinos do noroeste do estado do Rio de Janeiro, isoladas por Kimura (2006). O polo Cachoeiro do Espírito Santo e o norte do estado do Rio de Janeiro são regiões contíguas. No relevo do polo Cachoeiro

predomina as altitudes médias, com muitas formações rochosas que servem de abrigo para o *D. rotundus*; já no norte do estado do Rio de Janeiro predomina as baixas altitudes, com poucas formações rochosas. O deslocamento do *D. rotundus* nessas regiões é facilitado, pois não há montanhas de grandes dimensões que interponham o seu caminho. Apesar da região norte do estado do Rio de Janeiro não possuir muitas formações rochosas que servem de abrigo natural para o *D. rotundus*, é relatada nesta região a utilização de abrigos artificiais pelo morcego hematófago, em especial as galerias fluviais presentes sob as grandes rodovias. Em alguns desses abrigos habitam colônias com centenas de morcegos hematófagos e não-hematófagos (Vieira et al, 2010).

Os resultados demonstram que raiva em herbívoros está presente em todas as regiões do estado do Espírito Santo. Foram encontradas três linhagens principais, que se dispersam independentemente umas das outras, nas diferentes regiões do estado. As microrregiões de montanhas, Central Serrana e Sudoeste Serrana, exercem influência na separação dos clusters principais, contudo em algumas regiões essa barreira foi transposta, havendo a sobreposição de clusters. Os vírus isolados de bovinos e *D. rotundus* foram filogeneticamente semelhantes aos isolados em *A. lituratus*. São necessárias análises com maior intervalo de tempo entre os isolamentos virais para refinar os resultados, mas, apesar disso, os achados encontrados auxiliam no entendimento da epidemiologia da raiva no estado e podem ser usados pelos órgãos de vigilância epidemiológica nas ações de controle da doença.

6.2. Análise filogenética dos isolados de morcegos não-hematófagos

Recentemente, Oliveira et al. (2010), em um estudo detalhado da raiva em morcegos insetívoros no Brasil, identificou sete linhagens de vírus gênero-específico relacionadas com os gêneros morcegos *Myotis*, *Eptesicus*, *Nyctinomys*, *Molossus*, *Tadarida* e *Lasiurus*. As sequências do presente trabalho foram alinhadas com pelo menos três sequências de cada uma das linhagens descrita por Oliveira et al. (2010), além das sequências de *D. rotundus*, *A. lituratus*, bovinos, cão e a sequência da cepa padrão PV (Pasteur virus), recuperadas no *GenBank*.

A sequência JQ071946, isolada de *N. laticaudatus* da área urbana do Espírito Santo, agrupou-se na árvore filogenética 1 com sequências isoladas de *N. laticaudatus* do estado de São Paulo, apresentando alto grau de identidade (maior que 99%), apesar das mesmas terem sido isoladas a cerca de 800 km de distância, com intervalo de tempo entre os isolamentos variando de três a cinco anos.

As sequências isoladas de *N. laticaudatus*, incluindo o isolado JQ071946, apresentaram alguns marcadores moleculares exclusivos. São eles o aminoácido valina nas posições 12 e 121 e o aminoácido serina na posição 110, estes marcadores também foram observados por Oliveira et al (2010). Além das mutações de aminoácidos, existem mais seis marcadores específicos na sequência de nucleotídeos, contudo são mutações sinônimas. Os marcadores são os seguintes segundo a posição e nucleotídeo, respectivamente, 21-A, 348-C, 486-T, 504-G e 525-A.

As sequências JQ071944 e JQ071957, isoladas a partir de morcegos frugívoros *A. lituratus*, agruparam-se na árvore filogenética 1 no cluster *D. rotundus* + *A. lituratus*. Esta formação de cluster concorda com os achados de Shoji et al. (2004), que afirmam que as sequências isoladas de *Artibeus spp.* e *D. rotundus* são intimamente relacionadas, com identidades de nucleotídeos que variam de 97,6 a 99,4%.

Depois da implantação no Brasil, na década de 70, do Programa Nacional de Controle da Raiva Urbana com a vacinação maciça de cães e gatos, a região Sudeste quase não registra casos de raiva em animais domésticos OPAS/OMS (2011), no entanto, é isolado regularmente o vírus da raiva em morcegos insetívoros em regiões urbanas do Brasil (UIEDA, 1998; QUEIROZ-DA-SILVA, 1999), além de casos de *spillover*, nos quais variantes características de morcegos são isoladas em cães e gatos (BATISTA et al., 2009; FAVORETTO et al., 2002). Desta forma deve ser dada atenção à raiva dos morcegos não-hematófagos a fim de se evitar casos de raiva humana transmitida por esses quirópteros (FAVI et al., 2002; HUMPHREY et al., 1960). O morcego do qual foi isolada a sequência JQ071957 apresentava sinais de agressão provavelmente ocasionada por gato doméstico, muito comum na região urbana onde foi encontrado.

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/OMS, 2011), entre 1970 e 2011 no Brasil, foi registrado um caso de raiva humana transmitida por morcego não-hematófago e para este mesmo período foram registrados mais 18

casos de raiva transmitidos por morcegos não identificados. Além disso, é possível que casos de raiva em humanos não sejam notificados por falta de diagnóstico correto, tendo em vista que em muitos casos a raiva transmitida por morcegos tem um quadro clínico de apatia e paralisia, diferente da clínica clássica de raiva furiosa observada normalmente quando a doença é transmitida pelo cão (OLIVEIRA et al., 2006).

Dentro do cluster de *D. rotundus* + *A. lituratus*, as sequências JQ071944 e JQ071957 foram mais intimamente relacionadas com sequências do sub-cluster de *A. lituratus*. O fato das sequências isoladas de *A. lituratus* no Estado do Espírito Santo ter sido muito parecidas com as sequências de *A. lituratus* do Estado de São Paulo levantou o questionamento de que as sequências de *A. lituratus* apresentem características que a diferenciam da linhagem de *D. rotundus*. A fim de confirmar esta hipótese, as sequências JQ071944 e JQ071957 foram alinhadas com todas as sequências de glicoproteína (maiores que 750 bases) do vírus da raiva isolados de *D. rotundus* e *A. lituratus* no Brasil, disponibilizadas no *GenBank*. Com estas sequências foi construída a árvore filogenética 2, a qual formou dois clusters principais. As sequências JQ071944 e JQ071957 agruparam-se no cluster 2, no qual estão presentes apenas sequências isoladas de *A. lituratus*. Foram encontrados marcadores moleculares que diferenciam o cluster exclusivo de *A. lituratus*, são eles pela posição e nucleotídeo, respectivamente, 6-T, 45-A, 249-G, 372-C, 504-C e 651-G. Nenhuma destas mutações de nucleotídeos resultou em alteração de aminoácido, de forma que é possível inferir que, apesar da diferença entre as sequências, as funcionalidades das partículas virais isoladas em *D. rotundus* e *A. lituratus* são as mesmas.

Os resultados sugerem que há um ciclo epidemiológico da raiva específico para a espécie *A. lituratus*. Este resultado foi proposto por Fahl (2009) em análises com isolados do vírus da raiva provenientes de *D. rotundus* e *A. lituratus* do estado de São Paulo, e também corrobora com o achado de Mochizuki et al. (2011), no qual uma sequência isolada de *D. rotundus* (no Estado de São Paulo, Brasil) foi mais semelhante a uma sequência isolada de *D. rotundus* na Guiana Francesa, do que a uma sequência isolada de *A. lituratus*, no estado de São Paulo.

Por outro lado, a transmissão do vírus entre as duas espécies de quirópteros ainda ocorre, como pode ser observado no sub-cluster 1.3, onde são encontradas isolados de ambas as espécies. Este fato faz com que a área de influência da

variante do vírus do *D. rotundus* aumente, tendo em vista que esta espécie de quiróptero normalmente não habita regiões urbanas, mas os *A. lituratus* são encontrados em abundância neste habitat, e desta forma o vírus poderia ser carregado pelo morcego frugívoro.

A epidemiologia da raiva no estado do Espírito Santo é complexa, sendo relatada a doença em herbívoros domésticos (IDAF, 2010), que são casos típicos de transmissão pelo *D. rotundus*. Além disso, foi relatado neste trabalho o isolamento de duas linhagens de vírus diferentes que se relacionam com as espécies de morcegos não-hematófagos, *N. laticaudatus* e *A. lituratus*, encontrados em áreas urbanas. A linhagem isolada de *A. lituratus* foi bastante semelhante à sequência encontrada em morcegos da mesma espécie no estado de São Paulo, indicando que há um ciclo epidemiológico distinto em relação aos *D. rotundus*. O risco de casos de raiva em humanos transmitidos por quirópteros em áreas urbanas é constante, tendo em vista a proximidade destes animais com as habitações humanas e o difícil controle da doença nestas espécies.

7. CONCLUSÕES

O vírus da raiva está presente em todas as macrorregiões do estado do Espírito Santo. Neste trabalho houve o isolamento do vírus a partir de bovinos, equinos, morcegos insetívoros e morcegos frugívoros.

Todas as sequências isoladas em bovinos ou equinos compartilham alto grau de identidade com sequências, recuperadas do *GenBank*, provenientes de *Desmodus rotundus* de outras regiões do país.

A raiva rural apresenta três linhagens principais que se dispersam independentemente umas das outras, nas diferentes regiões do Espírito Santo. As regiões montanhosas do interior do estado exercem influência na separação das linhagens principais, contudo em algumas regiões essa barreira foi transposta, havendo a sobreposição de clusters.

Sequências dos isolados de *A. lituratus* foram semelhantes às amostras isoladas em herbívoros domésticos, no entanto, as sequências de nucleotídeos destes isolados apresentaram mutações específicas para esta espécie de morcego. As mesmas mutações foram observadas em sequências isoladas no Espírito Santo e em outros estados do país, indicando um ciclo epidemiológico distinto entre os *A. lituratus*.

A sequência do vírus isolada do morcego insetívoro *N. laticaudatus* pertence a uma linhagem diferente das amostras isoladas de *D. rotundus* e *A. lituratus*. Esta linhagem apresentou alto grau de identidade com sequências isoladas deste mesmo hospedeiro encontrado no estado de São Paulo.

8. RECOMENDAÇÕES

A análise filogeográfica apresentou imprecisão quanto ao local da raiz da árvore filogenética, e em alguns casos na própria inferência a respeito da dispersão do vírus da raiva nos herbívoros. Esta imprecisão está relacionada com o pequeno espaço de tempo entre os isolamentos do vírus, que foi de quatro anos e quatro meses. Portanto, novas análises devem ser realizadas utilizando amostras mais antigas do estoque do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF), ou realizar um estudo prospectivo com novos isolamentos do vírus da raiva por pelo menos mais 10 anos.

Maiores estudos devem ser realizados a respeito da raiva nos morcegos *Artibeus lituratus*, para estabelecer qual o seu real papel no ciclo da raiva dos herbívoros.

A raiva em morcegos insetívoros deve ser monitorada, levando-se em consideração seu potencial na transmissão da raiva. As ações de educação sanitária devem enfatizar o papel destes morcegos como risco em potencial na transmissão da raiva diretamente aos humanos ou indiretamente, infectando cães e gatos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, G.; RHODES, D.P.; BANERJEE, A.K. The 5' terminal structure of the methylated mRNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus. **Cell**, v. 5, p. 51-58, 1975.

AGUILAR-SÉTIEN, A.; BROCHIERJ, B.; TORDO, N.; PAZ, O.; DESMETTREYI, P.; PKHARPRK, D.; PASTORET, P.P. Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). **Vaccine**, v. 16, p. 1122-1126, 1998.

AGUILAR-SÉTIEN, A.; CAMPOS, Y.L.; CRUZ, T.E.; KRETSCHMER, R.; BROCHIER, B.; PASTORET, P.P. Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies virus. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 3, p. 539-544, 2002.

AGUILAR-SÉTIEN, A.; LOZA-RUBIO, E.; SALAS-ROJAS, M.; BRISSEAU, N.; CLIQUET, F.; PASTORET, P.P.; ROJAS-DOTOR, S.; TESORO, E.; KRETSCHMER, R. Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 517-522, 2005.

ALMEIDA, M. F.; AGUIAR, E. A. C; MARTORELLI, L. F. A.; SILVA, M. M. S. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 28, p. 341-344, 1994.

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

AVILA-FLORES R, FLORES-MARTÍNEZ JJ, ORTEGA J. *Nyctinomops laticaudatus*. **Mammalian Species**, v. 697, p. 1-6, 2002.

BALL, L.A.; PRINGLE, C.R.; FLANAGAN, B.; PEREPELITSA, V.P.; WERTZ, G.W. Phenotypic consequences of rearranging the P, M, and G genes of vesicular stomatitis virus. **Journal of Virology**, v. 73, p. 470-4712, 1999.

BANERJEE, A. K. Transcription and replication of rhabdoviruses. **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 66-87, 1987.

BARGE A, GAUDIN Y, COULON P, RUIGROK, R.W. Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil. **Journal of Virology**, v. 67, p. 7246-7253, 1993.

BATISTA H.B.C.R., CALDAS E., JUNQUEIRA D.M., TEIXEIRA T.F., FERREIRA J.C., SILVA J.R., ROSA J.C.A., ROEHE P.M. Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 371-374, 2009.

BIEK, R., HENDERSON, J.C., WALLER, L.A., RUPPRECHT, C.E., REAL, L.E. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 104, p. 7993-7998, 2007.

BIELEJEC, F., RAMBAUT, A., SUCHARD, M.A., LEMEY, P. SPREAD: Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics. **Bioinformatics**, V. 27, p. 2910-2912, 2011.

BISHOP, D.H., ROY P. Kinetics of RNA synthesis by vesicular stomatitis virus particles. **Journal of Molecular Biology**, v. 57, p. 513-527, 1971.

BOURHY, H., REYNES, J.M., DUNHAM, E.J., DACHEUX, L., LARROUS, F., HUONG, V.T., XU, G., YAN, J., MIRANDA, M.E., HOLMES, E.C. The origin and phylogeography of dog rabies virus. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2673-2681, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros**. Manual Técnico, Brasília, D.F. 2009.

BRZÓZKA, K.; FINKE, S.; CONZELMANN, K.K. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. **Journal of Virology**, v. 79, p. 7673-7681, 2005.

CARNIELI-JR, P.; CASTILHO, J.G.; FAHL, W.D.O.; VERAS, N.M.C.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Molecular characterization of Rabies Virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 141, p. 81-89, 2009.

CARNIELI-JR, P.; FAHL, W.O.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.; MACEDO, C.I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R.S.O.; MORATO, R.G.; SPÍNDOLA, R.O.; MACHADO, L.M.; ÚNGAR-DE-SÁ, J.E.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 131, p. 33-46, 2008.

CHENIK, M.; SCHNELL, M.; CONZELMANN, K.K.; BLONDEL, D. Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein. **Journal of Virology**, v.72, p. 1925–1930, 1998.

CHICARINO, C.N. **Caracterização molecular e filogenética de isolados do vírus rábico (*Lyssavirus – Rhabdoviridae*) em espécimes clínicos de herbívoros no estado do Rio de Janeiro**. 2009. 218f. (Tese Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos do Goytacazes, Rio de Janeiro, 2009.

CONSTANTINE D.G. Rabies transmission by non bite route. **Public Health Reports**. v. 77, p. 287-289, 1962.

DE MATTOS, C.A.; DE MATTOS, C.C.; RUPPRECHT, C.E. *Rhabdoviruses*. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E. et al. **Fields Virology**, 4a. ed., Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, Cap. 39, p. 1364-1408.

DEAN, D.J., ABELSETH, M.K., ATANASIU, P. The fluorescent antibody test, in: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.) **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed., World Health Organization, Geneva, 1996, p. 88-95.

DELPIETRO, H.A.; RUSSO, R.G. Aspectos ecológicos y epidemiológicos de la agresión del vampiro y de la rabia paralítica em la Argentina y análisis de las propuestas efectuadas para su control. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 15, n. 3, p. 971-984, 1996.

DELPIETRO, V.H.A.; RUSSO, R.G. Observations of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) and the hairy-legged vampire bat (*Diphylla ecaudata*) in captivity. **Mammalian Biology**, v. 67, p. 65-78, 2002.

DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, Protocolo para Tratamento de Raiva Humana no Brasil. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, Brasília, v. 18, n. 4, p. 385-394, out-dez 2009.

DRAKE, J.W., HOLLAND, J.J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 96, p. 13910-13913, 1999.

DRUMMOND, A.J., RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**. V. 7, p. 214, doi:10.1186/1471-2148-7-214, 2007.

DURRER, P.; GAUDIN, Y.; RUIGROK, R.W.; GRAF, R.; BRUNNER, J. Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 17575-17581, 1995.

EMERSON, S.U.; DIERKS, P.M.; PARSONS, J.T. In vitro synthesis of a unique RNA species by a T particle of vesicular stomatitis virus. **Journal of Virology**, v. 23, p. 708-716, 1977.

EMERSON, S.U.; WAGNER, R.R. Dissociation and reconstitution of the transcriptase and template activities of vesicular stomatitis B and T virions. **Journal of Virology**, v. 10, p. 297-309, 1972.

EMERSON, S.U.; YU, Y. Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus. **Journal of Virology**, v. 15, p. 1348-1356, 1975.

ESBÉRARD, C.E.L., 2004 **Morcegos – Ordem Chiroptera**. Disponível em: <<http://www.rio.rj.gov.br/riozoo/morcego/quiropeteos.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2004.

FABIAN, M.E.; GREGORIN, R. Família Molossidae. In: REIS, N.R.; PERACHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nélio, R. dos Reis, 2007, p.149-165.

FAHL, W.O. **Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G**. 2009. 92f. (Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses). Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2009.

FAVI M.; MATTOS C.A.; YUNG V.; CHALA E.; LÓPEZ L.R.; MATTOS C.C. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 79-81, 2002.

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

FERREIRA, A.J. Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos, 3ª. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1976, p. 779.

FINKE, S.; CONZELMANN, K.K. Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions. **Journal of Virology**, v. 71, p. 7281-7288, 1997.

FINKE, S.; MUELLER-WALDECK, R.; CONZELMANN, K.K. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. **Journal of Gene Virology**, v. 84, p.1613-1621, 2003.

FUNASA. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, DF, cap. 5.26, 1998.

GASTKA, M.; HORVATH, J.; LENTZ, T.L. Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 2437-2440, 1996.

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M.M.; SILVA, E.V. Avaliação de três cepas de vírus da raiva antigenicamente distintas, em camundongos: I — Estudo dos períodos de observação clínica. **Revista Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 375-383, 1988.

GREENHALL, A.M.; JOERMANN, G.; SCHMIDT, U. *Desmodus rotundus*. **Mammalian Species**. v. 202, p. 1-6, 1983.

GRUENBERG, J.; STENMARK, H. The biogenesis of multivesicular endosomes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 317-323, 2004.

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

HOWARD, M.; WERTZ, G. Vesicular stomatitis virus RNA replication: a role for the NS protein. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 2683-269, 1989.

HUANG, A.S.; MANDERS, E.K. Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. IV. Transcription by standard virus in the presence of defective interfering particles. **Journal of Virology**, v. 9, p. 909-916, 1972.

HUMPHREY, G.L.; KEMP, G.E.; WOOD, E.G. A fatal case of rabies in a woman bitten by an insectivorous bat. **Public Health Reports**, v. 75, p.317-326, 1960.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, 2006. **Rhabdoviridae**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>> Acesso em: 20 dez. 2006.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011. **Virus Taxonomy, 2011**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 20 out. 2011.

IDAF, 2010. **Raiva dos herbívoros**. Boletim eletrônico epidemiológico. nº. 1/2010. Disponível em: <http://www.idaf.es.gov.br/Download/Boletim_DDSIA_1.pdf>. Acesso em: 28 set. 2011.

ITO, M.; ARAI, Y.T.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F.H.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Genetic Characterization and Geographic Distribution of Rabies Virus Isolates in Brazil: Identification of Two Reservoirs, Dogs and Vampire Bats. **Virology**, v. 284, p. 214-222, 2001.

JEETENDRA, E.; ROBISON, C.S.; ALBRITTON, L.M.; WHITT, M.A. The membrane-proximal domain of vesicular stomatitis virus G protein functions as a membrane fusion potentiator and can induce hemifusion. **Journal of Virology**, v. 76, p. 12300-12311, 2002.

KIENZLE, T.E. **Rabies: Deadly diseases and epidemics**. New York: Chelsea House, 2006, p. 123.

KIMURA, L.M.S. **Epidemiologia molecular do vírus da raiva detectados em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil**. 2006. 94f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária). Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; KATO, M.; ITOU, T.; CUNHA, E.M.S.; SILVA, M.V.; MOTA, C.S.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 152, p.1995-2004, 2007.

KOBAYASHI, Y.; OGAWA, A.; SATO, G.; SATO, T.; ITOU, T. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 68, p. 1097-1100, 2006.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; MOCHIZUKI, N.; HIRANO, S.; ITOU, T.; CARVALHO, A.A.B.; ALBAS, A.; SANTOS, A.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC Veterinary Research**. V. 4, n. 44, p. doi:10.1186/1746-6148-4-44, 2008.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; Sato, T.; Itou, T.; Cunha, E.M.; Samara, S.I.; Carvalho, A.A.; Nociti, D.P.; Ito, F.H.; Sakai, T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**., v. 66, p. 647-652, 2005.

KOPROWSKI, H. Lecture on rabies on the occasion of "The year of Louis Pasteur". **Research in Virology**, v. 146, p. 381-387, 1996.

KOTAIT, I.; GONÇALVES, C.A.; PERES, N.F. **Controle da raiva dos herbívoros**. Manual Técnico do Instituto Pasteur nº1. Instituto Pasteur: São Paulo. 1998, p. 15.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. Mega2: molecular evolutionary analysis software. **Bioinformatics**, v.17, p. 1244:1245, 2001.

LANGOHR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 125-131, 2003.

LE BLANC, I.; LUYET, P.P.; PONS, V.; FERGUSON, C.; EMANS, N.; PETIOT, A.; MAYRAN, N.; DEMAUREX, N.; FAURÉ, J.; SADOUL, R.; PARTON, R.G.; GRUENBERG, J. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. **Nature Cell Biology**, v. 7, p. 653-664, 2005.

LEMEY, P.; RAMBAUT, A.; WELCH, J.J.; SUCHARD, M.A. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, p. 1877–1885, 2010.

LEMEY, P.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. **PLoS Computational Biology**, v. 5, p. 1000520, 2009.

LENTZ, T.L.; BURRAGE, T.G.; SMITH, A.L.; CRICK, J.; TIGNOR, G.H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?. **Science**, v. 215, p. 182-184, 1982.

LEPPERT, M.; RITTENHOUSE, L.; PERRAULT, J.; SUMMERS, D.F.; KOLAKOFSKY, D. Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells. **Cell**, v. 18, p. 735-747, 1979.

LIEBERMANN, H. Infecções por rhabdovírus. IN: BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988, p.167-182.

LORD, R.D. 2000. **Dynamics of transmission of rabies from vampire bats to bovines. International seminar on rabies**. Instituto Pasteur: São Paulo. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/anais/seminario_internacional/resumo_5_4.htm>. Acesso em: 21 out. 2011.

LYLES, D.S.; RUPRECHT, C.E. *Rhabdoviridae*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.) **Fields Virology**. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Section II, Cap. 39, p. 1364-1408.

LYLES, D.S.; MCKENZIE, M.O. Reversible and irreversible steps in assembly and disassembly of vesicular stomatitis virus: equilibria and kinetics of dissociation of nucleocapsid-M protein complexes assembled in vivo. **Biochemistry**, v. 37, p. 439-450, 1998.

MAIR, A.; GUERREIRO, M.G. **Virologia Veterinária**. Porto Alegre: Livraria Sulina, 1972, p. 436.

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

MARTORELLI, L.F.A.; AGUIAR, E.A.C; ALMEIDA, M.F.; SILVA, M.M.S; NOVAES, E.C.R. Isolamento do vírus da raiva de morcego insetívoro *Myotis Nigricans*. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 141-142, 1995.

MATLIN, K.S.; REGGIO. H.; HELENIUS, A.; SIMONS, K. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. **Journal of Molecular Biology**, v. 156, p. 609-631, 1982.

McCOLL, K.A.; TORDO, N.; AGUILAR-SETIÉN, A. 2000. Bat *Lyssavirus* infection. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 19, p. 177-196, 2000.

MEBATSION, T.; KONIG, M.; CONZELMANN, K.K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. **Cell**, v. 84, p. 941-951, 1996.

MIRANDA, E. E. de; (Coord.). **Brasil em Relevô**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2005. Disponível em: <<http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br>>. Acesso em: 01 janeiro 2012.

MOCHIZUKI, N.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; HIRANO, S.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a hematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, p. 759–766, 2001.

MOYER, S.A.; BANERJEE, A.K. Messenger RNA species synthesized in vitro by the virion-associated RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. **Cell**, v. 4, p. 37-43, 1975.

MOYER, S.A.; SMALLWOOD-KENTRO, S.; HADDAD, A.; et al. Assembly and transcription of synthetic vesicular stomatitis virus nucleocapsids. **Journal of Virology**, v. 65, p. 2170-2178, 1991.

MUÑOZ-RAMOS, M.; HERRERA, E.A.; KUNZ, T.H. Roosting behavior and group stability of the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Mammalian Biology**, v. 73, p. 214–221, 2008.

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

NEWCOMB, W.W.; BROWN, J.C. Role of the vesicular stomatitis virus matrix protein in maintaining the viral nucleocapsid in the condensed form found in native virions. **Journal of Virology**, v. 39, p. 295-299, 1981.

OLIVEIRA, R.N., SOUZA, S.P., LOBO, R.S.V., CASTILHO, J.G., MACEDO, C.I., CARNIELI, P.JR., FAHL, W.O., ACHKAR, S.M., SCHEFFER, K.C., KOTAIT, I., CARRIERI, M.L., BRANDÃO, P.E. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**, v. 405, p. 352-360, 2010.

OPAS/OMS, 2011. **Epidemiological Information System. Pan American Health Organization**. Disponível em: <<http://siepi2.panaftosa.org.br/Panel.aspx?Idioma=i>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

PATTNAIK, A.K.; HWANG, L.; LI, T.; ENGLUND, N.; MATHUR, M.; DAS, T.; BANERJEE, A.K. Phosphorylation within the amino-terminal acidic domain I of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is required for transcription but not for replication. **Journal of Virology**, v. 71, p. 8167-8175, 1997.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1253–1256, 2008.

QUEIROZ-DA-SILVA, L.H.; CUNHA, E.M.S.; PEDRO, W.A.; CARDOSO, T.C.; SOUZA, M.C.C.; FERRARI, C.I.L. Isolamento do vírus rábico em *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae) no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, p. 26-628, 1999.

RAMBAUT, A., 2009. **FigTree: Tree Figure Drawing Tool version 1.3.1**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree>>. Acesso em: 10 set. 2011.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. 2003. **Tracer [computer program]**. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>>. Acesso em: 10 set. 2011.

RAUX, H.; FLAMAND, A.; BLONDEL, D. Interaction of the Rabies Virus P Protein with the LC8 Dynein Light Chain. **Journal of Virology**, v. 74, p. 10212–10216, 2000.

RAVISSE, P.; BLANCOU, J. Etude histopathologique de lesions oculares chez le renard enrage . **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.4, p. 101-105, 1981.

READING, C.L.; PENHOET, E.E.; BALLOU, C.E. Carbohydrate structure of vesicular stomatitis virus glycoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 5600-5612, 1978.

RIGAUT, K.D.; BIRK, D.E.; LENARD, J. Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. **Journal of Virology**, v. 65, p. 2622-2628, 1991.

ROCHA, F.A. **Abrigos diurnos, agrupamentos e lesões corporais no morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Chiroptera – Phyllostomidae) do estado de São Paulo**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2005.

ROMIJN, P.C.; VAN DER HEID, R.; CATTANEO, C.A.M.; SILVA, R.C.; VAN DER POEL, W.H.M. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 81-86, 2003.

ROSE, J.K.; WHITT, M.A. Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication In: Knipe, D.M.; Howley, P.M.; Griffin, D.E. (Eds.) **Fields Virology**, 4. ed., CD-ROM Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, Section Two: Specific Virus Families, Cap. 38.

SANTOS, J.A. **Patologia Especial dos Animais Domésticos: Mamíferos e Aves**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interamericana. 1975, p. 576.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, p. 747-753, 2004.

SCHNELL, M.J.; CONZELMANN, K.K.. Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. **Virology**, v. 214, p. 522-530, 1995.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Protocolo para Tratamento de Raiva Humana no Brasil. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v. 18, p. 385-394, 2009.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2010. **Casos de raiva humana por espécie agressora, Brasil, 1986-2010**, Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/canideos_felinos/Dados_de_raiva_humana_1986_2010.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2011.

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

SHOKRALLA, S.; HE, Y.; WANAS, E.; GHOSH, H.P. Mutations in a carboxy-terminal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G that affect membrane fusion activity. **Virology**, v. 242, p. 39-50, 1998.

SILVA, L.H.Q.; CUNHA, E.M.S.; PEDRO, W.A. Isolamento do vírus da raiva em *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae) no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 6, p. 626-628, 1999.

SMITH, J.S.; REID-SANDEN, F.L.; ROUMILLAT, L.F.; TRIMARCHI, C.; CLARK, K.; BAER, G.M.; WINKLER, W.G. Demonstration of Antigenic Variation among Rabies Virus Isolates by Using Monoclonal Antibodies to Nucleocapsid Proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 573-580, 1986.

STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. **Zoologia Geral**. 6 ed. Tradução de Ekita Schlenz. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002, p. 816.

TADEI, V.A.; GONÇALVES, C.A.; PEDRO, W.A.; TADEI, W.A.; KOTAIT, I.; ARIETA, C. **Distribuição do morcego vampiro *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae) no estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos**. Campinas: Impresso especial Cati, 1991, p. 107.

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

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; et al. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. **Virology**, v. 165, p. 565-576, 1988.

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 of the United States of America**, v. 83, p. 3974-3918, 1986.

TORIUMI, H. e KAWAI, A. Association of rabies virus nominal phosphoprotein (P) with viral nucleocapsid (NC) is enhanced by phosphorylation of the viral nucleoprotein (N). **Microbiology and Immunology**, v. 48, p. 399-409, 2004.

TRAJANO, E. Protecting Caves for the Bats or Bats for the Caves? **Chiroptera Neotropical**, v. 1, n. 2, p. 19-22, 1995.

TRAJANO, E. Ecologia de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 2, p. 255-320, 1984.

TUFFEREAU, C.; BENEJEAN, J.; ALFONSO, A.M.; FLAMAND, A.; FISHMAN, M.C. Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surfaces of lepidopteran cells. **Journal of Virology**, v. 72, p. 1085-1091, 1998a.

TUFFEREAU, C.; BENEJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. **Embo Journal**, v. 17, p. 7250-7259, 1998b.

TUFFEREAU, C.; DESMEZIERES, E.; BENEJEAN, J.; JALLET, C.; FLAMAND, A.; TORDO, N.; PERRIN, P. Interaction of lyssaviruses with the low-affinity nerve-growth factor receptor p75NTR. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2861-2867, 2001.

UIEDA, W. Rabies in insectivorous bat *Tadarida brasiliensis* in Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, p. 484-485, 1998.

VELASCO-VILA, A.; ORCIARI, L.A.; JUÁREZ-ISLAS, V.; GOMES-SIERRA, M.; PADILLA-MEDINA, I.; FLISSER, A.; SOUZA, V.; CASTILLO, A.; FRANKA, R.; ESCALANTE-MAÑE, M.; SAURI-GONZÁLEZ, I.; RUPPRECHT, C.E. Molecular Diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1697-1710, 2006.

VIEIRA, L.F.P.; PEREIRA, S.R.F.G.; BRANDÃO, P.E.; OLIVEIRA, R.N.; CARNIELI-JUNIOR, P.; GALANTE, A.C.; CHICARINO, C.N.; KOTAIT, I. Molecular characterization of rabies virus isolated from *Desmodus rotundus* captured in Rio de Janeiro State. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 343-349, 2010.

WAGNER, R.R.; ROSE, J.K. Rabdoviridae: The virus and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fundamental Virology**, 3.^a ed. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1996, p. 561-575.

WERTZ, G.W.; LEVINE, M. RNA synthesis by vesicular stomatitis virus and a small plaque mutant: effects of cycloheximide. **Journal of Virology**, v. 12, p. 253-264, 1973.

WERTZ, G.W.; PEREPELITSA, V.P.; BALL, L.A. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3501-3506, 1998.

WHELAN, S.P.; WERTZ, G.W. Regulation of RNA synthesis by the genomic termini of vesicular stomatitis virus: identification of distinct sequences essential for transcription but not replication. **Journal of Virology**, v. 73, p. 297-306, 1999.

WHITFIELD, S.G.; FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H. A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 95, p. 145-151, 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. **Rabies - Bulletin – Europe: Classification**. Disponível em: <http://www.who-rabies-bulletin.org/about_rabies/classification.aspx>. Acesso em: 28 nov. 2011.

WHO – World Health Organization. Expert consultation on rabies: first report (WHO Technical report series). World Health Organization, Geneva, 2004.

WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Antigenic variants of rabies virus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 99-112, 1980.

WILLOUGHBY, R.E. JR.; TIEVES, K.S.; HOFFMAN, G.M.; GHANAYEM, N.S.; AMLIE-LEFOND, C.M.; SCHWABE, M.J.; et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 24, p. 2508-2514, 2005.

WU, X.; GONG, X.; FOLEY, H.D.; SCHNELL, M.J. et al. Both Viral Transcription and Replication Are Reduced when the Rabies Virus Nucleoprotein Is Not Phosphorylated. **Journal of Virology**, v. 76, p. 4153–4161, 2002.

WUNNER, W.H.; REAGAN, K.J.; KOPROWSKI, H. Characterization of Saturable Binding Sites for Rabies Virus. **Journal of Virology**, v. 50, p. 691-697, 1984.

YANG, J.; HOOPER, D.C.; WUNNER, W.H.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B.; ZHEN FANG FU, Z.F. The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. **Virology**, v. 242, p. 107–117, 1998.

YANG, J.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B.; FU, Z.F. Phosphorylation of Rabies Virus Nucleoprotein Regulates Viral RNA Transcription and Replication by Modulating Leader RNA Encapsidation. **Journal of Virology**, v. 73, p. 1661–1664, 1999.

ZORTÉA, M. Subfamília Stenodermatinae. In: REIS, N.R.; PERACHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nélío R. dos Reis, 2007. p.149-165.

ANEXO A – Paper 1

Phylogeography of rabies virus isolated from herbivores and bats in Espírito Santo State, Brazil

Luiz Fernando Pereira Vieira^{a,*}, Silvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira^a, Pedro Carnieli Jr^b, Luiz Carlos Barbosa Tavares^c, Ivanete Kotait^b

^aSetor de Virologia e Viroses, Laboratório de Sanidade Animal, Hospital Veterinário, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes/RJ, 28013-600, Brazil.

^bInstituto Pasteur. Av. Paulista, 393, Cerqueira César, São Paulo/SP, Brazil. 01311-000

^cInstituto Biológico do Espírito Santo, Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal. Vila Oásis, Santana, Cariacica/ES, Brazil 29153-520

*Corresponding author:

Tel.: +55 22 2739-1545; fax: +55 22 2739-7194.

E-mail address: luizuenf@yahoo.com.br (L.F.P. Vieira)

Abstract

Rabies is enzootic in the State of Espírito Santo (ES), Brazil. Every year cattle and horses die from rabies transmitted by vampire bat *Desmodus rotundus*. This paper describes the spread of the rabies virus using the continuous diffusion model, relaxed random walks (RRW), with BEAST software. Forty-one (41) sequences of gene G of the rabies virus, isolated from bats and domestic herbivores from several areas of the State, between 2006 and 2010, were analyzed. The phylogenetic tree showed three main clusters, as well as two sub-clusters under cluster 2. An spatial analysis showed that three strains of the rabies virus spread independently of each other. In general,

mountainous central Espírito Santo is the area where the virus strains separate. This physical barrier, however, has been overcome at some point in time, as samples of different lineages were found in the same micro-area.

Keywords: rabies, cattle, *Desmodus rotundus*, epidemiology, phylogenetic

1. Introduction

Rabies is an enzootic disease throughout the Brazilian territory (Brazil, 2009). Its etiological agent, the rabies virus, belongs to the *Rhabdoviridae* family and *Lyssavirus* genus. Its morphology is characterized by a rod-shaped core covered by a lipoprotein envelope. Its genome consists of a single strand of ribonucleic acid (RNA) of negative polarity, with five genes encoding proteins N, P, M, G and L (ICTV, 2011).

In the State of Espírito Santo, in southeastern Brazil, many cases of rabies transmitted by vampire bats to domestic herbivores have been reported. The annual average number of herbivores that have been affected by rabies and with laboratorial diagnostic was 76 in the period between 1996 and 2011 (DSA/SSA/MAPA, 2011). However, one should note that this figure is actually much higher as most of the rabies cases are not reported to animal health protection agencies.

Geomorphologically, the relief of Espírito Santo is characterized by plains along the coastal areas, representing 40% of the land, and a central plateau, with elevations exceeding 1,000 meters. In several parts of the State, there exists a linear displacement of only 20 km from an altitude of 20 m for altitudes greater than 400 m (Espírito Santo, 2011). Many rock formations are found in several areas of the state with the formation of caves providing shelter for the *D. rotundus*.

Agricultural economy has a major stake in the State's income, where 40% of the economically-active population work in the agribusiness industry. Coffee is Espírito Santo's main crop, followed by livestock, which accounts for 20% of that industry's income. The land structure shows 83% of farms having less than 50 ha, most of which are family run. The herd of cattle amounts to over 2 million heads, but most cattle raisers lack technical qualification, which adversely affects their

productivity. Such a low productivity results in low-income families (Cani et al., 2007) and, as a result, little prophylactic care to the herd.

Vaccination of production herbivores is the best strategy to prevent cases of rabies in animals. However, this practice alone is not enough to prevent all cases of the disease (Brazil, 2009). A more thorough understanding of the dynamics of the rabies virus spread plays a key role in the disease control strategies. In order to achieve that, a virus molecular characterization is required to clarify the epidemiology of rabies in all regions of Brazil.

The main genes used in this research were genes N and G, respectively, as shown in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Molecular epidemiology studies are based on the polymorphism of nucleotide sequences. The high genetic polymorphism occurs because the RNA polymerase of the rabies virus does not have a mechanism of nucleotide insertion proofreading in the viral replication process (Drake and Holland, 1999).

Two models reconstructing the spatio-temporal move of a pathogen based on information from gene sequences, location and sample isolation date have been described. This phylogeographic analysis can provide information that will aid animal health protection agencies to make decisions in order to control the disease (Lemey et al, 2009, 2010).

The rabies virus phylogeography is currently studied using the Bayesian Markov chain Monte Carlo method (Streicker et al. 2010; Bourhy et al. 2008; Carnieli et al., 2010) and the method available in BEAST software (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>) (Drummond and Rambaut, 2007) allows evolutionary models to be tested using a set of gene sequences obtained over time and space (Davis, 2005).

Despite the great amount of rabies cases that are often reported in Espírito Santo, few epidemiological studies have been conducted in the State and so far no molecular characterization of the virus has been achieved. Thus the aim of this study is to characterize the phylogeographic aspects of the rabies virus isolated from bats and herbivores in different parts of the State of Espírito Santo, Brazil.

2. Material and Methods

2.1. Samples

We analyzed a set of 41 isolates of rabies virus from samples of brain material of herbivores and bats. Forty samples from different regions of Espírito Santo were kindly provided by the Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) and sample 0399/06 (from upstate Rio de Janeiro) was part of the work of Vieira et al. 2010 (Table 1).

2.2. Direct immunofluorescence

The samples were stored at -20°C until analysis and the diagnosis was performed by direct immunofluorescence technique described by Dean et al. (1996).

2.3. RT-PCR and sequencing

RT-PCR was performed as described by Carnieli et al. (2008), using primers described by Sato et al. (2004), Ga3222-40 (sense, 5'CGCTGCATTTTRTCARAGT3', position 3221-3239 of the viral genome) and Gb4119-39 (antissenso, 5'GGAGGGCACCATTTGGTNTC3', position 4116-4135 of the viral genome). Sequencing was performed as described by Oliveira et al. (2010), with the same primers used in RT-PCR.

2.5. Choice of the evolutionary model

We utilized the corrected Akaike Information Criterion (AICc), available in jModelTest software (Posada 2008), to determine the appropriate substitution model for sample dataset analysis. The transitional model, equal base frequency, gamma distribution of rate variation among sites and four rate categories (TIMef+G+Γ4) were chosen.

2.6. Phylogeographic analysis

The nucleotide sequences were analyzed with BEAST v1.6.1 software (Drummond and Rambaut, 2007) using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method.

Beauti v1.6.1 software was used to create a file in XML format, which allows entering data in BEAST software v1.6.1. The sequences and the year of isolation were typed into the XML file with substitution model GTR+G+ Γ 4. This file was later changed manually to substitution model TIMef+G+ Γ 4, as described in the BEAST tutorial (http://BEAST.bio.ed.ac.uk/Substitution_model_code).

The choice of the molecular clock and the demographic model was performed by analyzing their best combination. Nine XML files were produced with a combination of molecular clocks (strict, relaxed: uncorrelated exponential, and relaxed: uncorrelated lognormal) and demographic models for coalescent tree (constant population size, exponential growth and logistic growth). The choice on the strict molecular clock and the demographic model of exponential population growth was based on the largest value for ESS (effective sample size) for the posterior parameter displayed on Tracer v1.5 software (Rambaut and Drummond, 2003). These analyses were based on 20 million steps, sampled every 2000 steps, the first 10% of which were eliminated.

The XML file showing the highest value for ESS was manually configured to promote a continuous phylogeographic analysis using relaxed random walks (RRW), as described in BEAST's tutorial (<http://BEAST.bio.ed.ac.uk/RRWs>). The city seat was regarded as the location of rabies outbreak. The analysis included the formation of a distance phylogenetic tree by nucleotide substitution.

Two runs of 100 million steps, sampled every 10,000, were performed. The first 10% of the results were discarded. The results of the two runs were compared in Tracer v1.5 (Rambaut and Drummond, 2003) to check if they converged to the same figure. The two runs were joined with the LogCombiner v1.6.1 software. The resulting file was used to annotate the phylogenetic tree based on maximum clade credibility (MMC) using the TreeAnnotator v1.6.1 software. The following parameters were used: burn-in, 10%; posterior probability limit, zero; and node heights, mean heights. The resulting phylogenetic tree was displayed in Figtree v1.3.1 software (Rambaut, 2009).

The same file used to view the time tree was analyzed by the Spread software (Bielejec et al., 2011). The purpose was to translate the phylogenetic tree into the keyhole markup language (KML) format to be viewed on Google Earth software (<http://earth.google.com>), which indicated the likely spread of the rabies virus, given the set of analyzed samples.

3. Results

All 41 samples showed a high degree of identity with the samples related to the cycle of rabies in vampire bats when subjected to blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The Bayesian analysis returned a mean rate of evolution of $4.14 \pm 0.0573 \times 10^{-4}$ substitutions/position/year. The value for ESS for the posterior distribution was 1006.52 and all other parameters had a ESS value greater than 500.

Cut-off points were assigned arbitrarily: year 1970 for cluster formation and year 1990 for sub-clusters. The phylogenetic trees of time (Fig. 1) and substitution had the same topology, with the formation of three main clusters and the formation of two sub-clusters under cluster 2. In the time tree, the most recent common ancestor (MRCA) dates back to 1954, i.e., 56 years ago. In the substitution tree the greater distance was 5% divergent nucleotide.

The phylogenetic tree analysis of time on a geographic perspective, viewed in Google Earth, showed that the samples of cluster 1 are concentrated in the metropolitan area; cluster 2 is subdivided into two sub-clusters. In sub-cluster 2.1 samples from micro-regions Northwestern 1 and Northwestern 2, Colatina, Northern Coast and Caparaó were found; in sub-cluster 2.2 samples from Linhares, Colatina, Northwestern 2, Central Mountainous, Southwest Mountainous and Caparaó were found; and in cluster 3 samples of micro-regions Metropolitan, Linhares, Southwest Mountainous, Cachoeiro, Expanded Metropolitan South and upstate Rio de Janeiro (Fig. 2) were observed.

It was observed that samples isolated in nearby areas tend to form sub-clusters in the tree. Exception to this rule was sample 399-08 from Dores do Rio Preto (Caparaó area) which showed a high degree of identity with strains isolated in micro-regions Northwestern 1 and 2, and Colatina.

4. Discussion

Kobayashi et al. (2006) report that samples of rabies virus from regions of the same altitude tend to be genetically closer. However, the same authors observed in 2008 that samples can shift from high-altitude areas to low-altitude ones (Kobayashi, 2008). The present study also showed that samples from high altitudes are related to samples of low altitude. Cluster 3 has samples that are closely related to the Expanded Metropolitan South area, a low-lying coastal region, and to mountainous Caparaó area.

Most samples (65%) were from region in low altitude (0 to 300 m). In most cases, however, the distances between these low-altitude and medium-altitude regions (300 to 600 m) did not exceed 20 km – the distance the *D. rotundus* can travel to feed (Grennhall et al., 1983). In mid-altitude regions there is a predominance of rock formations which form a number of natural shelters for the bats.

In areas of high altitude (> 600 m), Central Mountainous and South-West Mountainous ES, samples were obtained in the neighboring towns lying between the high and low areas. However, samples from the center of the Caparaó, which is also an area of high altitude, were isolated. Mountains have an influence on the displacement of *D. rotundus* and on the outbreaks of rabies. Strains of genetically closer viruses are kept between the areas surrounded by mountains (Kobayashi et al., 2006; Velasco-Villa et al. 2006). This isolation, however, is not absolute, as one can see in samples from cluster 3 and sub-cluster 2.2. In sub-cluster 2.2, the outbreak has shifted from areas of low-to-medium altitude, further north of the state, to areas of high altitude, southernmost of state, in the town of Ibatiba (Caparaó region). Isolate JQ071948, isolated from this town, is in an area the altitude of which is the same as that of samples from cluster 3, and the shortest distance between samples from these clusters is 30 km. Therefore, these two clusters are very likely to occupy overlapping regions in a short period of time.

A survey, conducted in the State of Rio de Janeiro, suggested that samples from the same watershed tend to be the most genetically alike (Romijn et al., 2003). In the present work the epidemiology has not followed this pattern. In all analyzed clusters, samples from at least two different watersheds were found.

The dynamics of the rabies virus spread, viewed in this work, followed the centrifugal dispersion pattern, with the outbreak starting from a central area towards

the peripheral neighboring area. This model follows the pattern of behavior of *D. rotundus* which, despite being a non-migratory species, has the habit to visit neighboring shelters on a regular basis. So, all the bats in a particular region are directly or indirectly linked to each other by their overlapping reach (McColl et al., 2000).

The average virus spread speed was 8 km/year (95% HPD interval: 2.9 to 13.7 km/year). An exception to the movement speed was sample 399-08, from the county Dores do Rio Preto. This sample is closely linked to two samples from Northwest 2 region, nearly 250 km away. The time from the bifurcation of the branch of the phylogenetic tree to the isolation of this sample was 3.47 years. This results in a displacement speed of about 72 km / year, which is much higher than all the others that have been observed. The animal's owner said it had been bought from a neighboring property and that the animal had never moved to another area of Espírito Santo. The displacement speed of this outbreak is higher than that reported by other authors. According to Lord (2000), the travel speed of rabies outbreaks in herbivores is highly variable, varying from 10 to 40 km per year.

The formation of three main clusters occurred in two stages. The first division happened 56 years ago, when cluster 1 was formed. The second division was 49 years ago, when clusters 2 and 3 were formed. This demonstrates that it was not possible to control bat rabies in ES along these years. Data of the official animal health protection agency for 1980 to 2010 show that rabies outbreaks follow a cycle, with alternating periods of high and low prevalence of the disease (IDAF, 2010).

The eradication of rabies in herbivores is a difficult task. The main carrier/host of the disease is *D. rotundus*, a wild animal, and there is no kind of immunization strategy in place for bats such as that in place for wild canids in developed countries (WHO, 2004). The best way to prevent rabies in herbivores is to perform a systematic vaccination of the herd. However, this strategy alone cannot fully control the outbreaks. To achieve that, it is necessary to put in place additional measures such as control of bat population in endemic areas and carry out public awareness campaigns on bat rabies (IDAF, 2010).

Out of the 41 analyzed virus samples 30 were isolated from cattle, eight from horses and three from bats (one from a vampire bat from the town of Quissamã (RJ) and two from frugivorous bats from Vitoria county, capital of Espírito Santo). No genetic characteristic differentiates isolates of *D. rotundus* and domestic herbivores,

as these bats are the vectors of the rabies disease to livestock. However, few differences between samples of haematophagous bats and frugivorous bats were found, as determined by Fahl (2009). One of the bats (034-10) was identified to be an *Artibeus lituratus*. The other one (190-10) was not identified because its face was injured and disfigured, but the other features indicated it was also an *A. lituratus*. Shoji et al. (2004) conducted a phylogenetic analysis of the nucleoprotein of the rabies virus isolated from *D. rotundus* and *A. lituratus* in the State of São Paulo. They found these samples to be closely related. It is not known for sure what the role of *A. lituratus* in the epidemiological cycle of rabies in herbivores is. Studies on bats living in caves in Southeastern Brazil showed that *D. rotundus* and *A. lituratus* have a preference for the same kind of shelter (Trajano, 1984). These studies evidenced that in those shelters where the population of *D. rotundus* increased, the population of *A. Lituratus* decreased, which suggests that they fight over the same shelter (Trajano, 1984).

It was unable to set the region of the tree root where the MRCA would be found. The 95% HPD interval for the geographical position of the tree root was too large, so that it could be located anywhere in ES. This lack of precision is due to the short time of isolation of the samples which was only 4 years and 4 months. In a similar analysis for the rabies virus in Raccoon, the samples were isolated with a time interval of 20 to 30 years (Biek et al. 2007; Lemey et al., 2010). Despite the low accuracy, the result is consistent with that expected in the epidemiology of rabies transmitted by bats.

The effectiveness of phylogeographic continuous diffusion model using RRW shall be emphasized. This method proved to be more consistent in the analysis, compared to the diffusion model using the discrete phylogeographic continuous-time Markov chain (CTMC) (data not shown) (Lemey et al., 2009). Exhaustive runs were carried out using the BEAST V1.6.1 software with the CTMC method, keeping the same evolution model, molecular clock and demographic model used in the RRW analysis. The CTMC analysis viewed in Tracer v1.5 showed ESS values for prior and posterior below 200 for most of the runs. In few runs all parameters surpassed 200. However, when these runs were combined in LogCombiner v1.6.1, the ESS values fell dramatically to almost all parameters analyzed in Tracer v1.5. The construction of phylogenetic trees from the individual runs of the CTMC method showing satisfactory values for ESS resulted in the formation of trees with similar topologies and similar to

the tree formed by the RRW method. However, when the trees formed using the CTMC method were analyzed from the geographical perspective, the virus spread over time was completely different from each other and from the tree built using the RRW method. Another relevant question that advocates in favor of the RRW model is the computational speed of the analysis. In this method, the speed was about 20 times higher than the model analysis with CTMC.

Unfortunately it was not possible to compare samples from Espírito Santo to samples from the neighboring States of Minas Gerais and Bahia, since there were no nucleotide sequences of the glycoprotein of rabies virus from herbivores or bats in the genetic databases available on the Internet. Nevertheless, we succeeded in comparing ES samples to samples of *D. rotundus* from upstate Rio de Janeiro, from the town of Quissamã (not shown on map), sited 100 km away. From the set of analyzed samples, we observed that the rabies virus moved from Cachoeiro Site, in Espírito Santo, to the State of Rio de Janeiro near year 2000. The analysis of the nucleoprotein of this isolate revealed that it shared 100% of identity with samples of cattle in upstate Rio de Janeiro (Chicarino, 2009) and a high degree of identity with samples of cattle in Northwestern Rio de Janeiro, isolated by Kimura (2006). Sites Cachoeiro (ES) and upstate Rio de Janeiro are contiguous areas. The relief in the Cachoeiro Site shows a predominance of medium altitudes with many rock formations sheltering *D. rotundus*, whereas in upstate Rio de Janeiro low altitudes and few rock formations prevail. The displacement of the *D. rotundus* in these areas is easier because there are no high mountains blocking their way. Although in upstate Rio de Janeiro one does not find many rock formations serving as a natural shelter for the *D. rotundus*, this area is reported to be used as artificial shelters by vampire bats, especially river galleries under major highways. These shelters are inhabited by colonies with hundreds of hematophagous and non-hematophagous bats (Vieira et al, 2010).

The results of this study show that rabies in herbivores is present in all areas of the State of Espírito Santo. Three main strains, which spread independently of each other, in the different regions of the State, have been identified. The micro-regions of Mountainous, Central and Southwestern ES have influenced the separation of the main clusters. However, this barrier was overcome in a few regions, with overlapping clusters. The viruses isolated from bovine and *D. rotundus* were phylogenetically similar to those isolated in *A. lituratus*. An analysis with a longer time

interval between the viral isolates is required to fine tune the obtained results. Nevertheless, these results do contribute to the understanding of the epidemiology of rabies in ES and can be used by surveillance and control agencies in activities of disease control.

Acknowledgments

The authors would like to thank Instituto Pasteur de São Paulo and Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo, as well as research assistant Felipe de Paula Nogueira and Ms. Keila Iamamoto Nogi, Ph.D., for their valuable contributions. This research was financed by CNPq (Brazilian Counsel for Technological and Scientific Development) and by the Brazilian Ministry of Agriculture, project 578545/2008-0.

References

- Biek, R., Henderson, J.C., Waller, L.A., Rupprecht, C.E., Real, L.E. 2007. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104, 7993-7998.
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M.A., Lemey, P. 2011. SPREAD: Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics. *Bioinformatics*. 27, 2910-2912.
- Bourhy, H., Reynes, J.M., Dunham, E.J., Dacheux, L., Larrous, F., Huong, V.T., Xu, G., Yan, J., Miranda, M.E., Holmes, E.C. 2008. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J Gen Virol*. 89, 2673-2681.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Controle da raiva dos herbívoros: Manual Técnico 2009. MAPA, Brasília.
- Cani, P.C., Molino, J.A., Possati, A.F, 2007. Plano estratégico de desenvolvimento da agricultura capixaba: Estudo Setorial, Pecuária de Leite. SEAG, Vitória. www.seag.es.gov.br/pedeag/setores/leite.pdf. Accessed 20 Oct 2011.
- Carnieli, P.Jr, Fahl, W.O., Castilho, J.G., Oliveira, R.N., Macedo, C.I., Durymanova, E., Jorge, R.S.O., Morato, R.G., Spíndola, R.O., Machado, L.M., Úngar-de-Sá, J.E., Carrieri, M.L., Kotait, I. 2008. Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in northeastern Brazil. *Virus Res*. 131,33-46.

- Carnieli, P. Jr., Oliveira, R.N., Macedo, C.I., Castilho, J.G. 2011. Phylogeography of rabies virus isolated from dogs in Brazil between 1985 and 2006. *Arch Virol.* 156, 1007-1012.
- Chicarino, C.N. 2009. Caracterização molecular e filogenética de isolados do vírus rábico (*Lyssavirus – Rhabdoviridae*) em espécimes clínicos de herbívoros no estado do Rio de Janeiro. PhD thesis, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- Davis, P.L., Holmes, E.C., Larrous, F., Van der Poel, W.H., Tjørnehøj, K., Alonso, W.J., Bourhy, H. 2005. Phylogeography, population dynamics, and molecular evolution of European bat lyssaviruses. *J Virol* 79, 10487-10497.
- Dean, D.J., Abelseth, M.K., Atanasiu, P. 1996. The fluorescent antibody test, in: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.) *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed. World Health Organization, Geneva, pp. 88-95.
- Drake, J.W., Holland, J.J. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 13910-13913.
- Drummond, A.J., Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7:214. doi:10.1186/1471-2148-7-214
- DSA/SSA/MAPA. 2011. Boletim de Defesa Sanitária Animal. <http://www.agricultura.gov.br>. Accessed 25 Nov 2011.
- Espírito Santo (Estado). 2011. Informações Gerais: relevo. <http://www.es.gov.br/site/home/index.aspx>. Accessed 19 Oct 2011.
- Fahl, W.O. 2009. Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G. MS thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Greenhall, A. M., Joermann, G., Schmidt, U. 1983. *Desmodus rotunuds*. *Mammalian Species*. 202, 1-6.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 41, 95-98.
- ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. 2011. *Virus Taxonomy*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>. Accessed 20 Oct 2011.

- IDAF. 2010. Raiva dos herbívoros. Boletim eletrônico epidemiológico. Nº. 1/2010. http://www.idaf.es.gov.br/Download/Boletim_DDSIA_1.pdf. Accessed 28 Sep 2011.
- Kimura, L.M.S. 2006. Epidemiologia molecular do vírus da raiva detectados em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil. PhD thesis. Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Kobayashi, Y., Ogawa, A., Sato, G., SatO, T., Itou, T. 2006. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 1097-1100.
- Kobayashi, Y., Sato, G., Mochizuki, N., Hirano, S., Itou, T., Carvalho, A.A.B., Albas, A., Santos, A.P., Ito, F.H., Sakai, T. 2008. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Veterinary Research.* 4:44. doi:10.1186/1746-6148-4-44.
- Lemey, P, Rambaut, A., Welch, J.J., Suchard, M.A. 2010. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol Biol Evol* 27, 1877–1885.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A.J., Suchard, M.A. 2009. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. *PLoS Comput Biol.* 5, e1000520.
- Lord, R.D. 2000. Dynamics of transmission of rabies from vampire bats to bovines. International Seminar on Rabies. Instituto Pasteur, São Paulo. http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/anais/seminario_internacional/resumo_5_4.htm. Accessed 21 Oct 2011.
- McColl, K.A., Tordo, N., Aguilar-Setién, A. 2000. Bat *Lyssavirus* infection. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19, 177-196.
- Oliveira, R.N., Souza, S.P., Lobo, R.S.V., Castilho, J.G., Macedo, C.I., Carnieli, P.Jr., Fahl, W.O., Achkar, S.M., Scheffer, K.C., Kotait, I., Carrieri, M.L., Brandão, P.E. 2010. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology.* 405, 352-360.
- Orciari, L.A., Niezgoda, M., Hanlon, C.A., Shaddock, J.H., Sanderlin, J.H., Yager, P.A., Rupprecht, C.E. 2001. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. *Vaccine.* 19, 4511-4518.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253–1256.

- Rambaut, A. 2009. FigTree: Tree Figure Drawing Tool version 1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://BEAST.bio.ed.ac.uk/FigTree>. Accessed 10 Sep 2011.
- Rambaut, A., Drummond, A.J. 2003. Tracer [computer program]. <http://BEAST.bio.ed.ac.uk/tracer>. Accessed 10 Sep 2011.
- Romijn, P.C., Van der Heid, R., Cattaneo, C.A.M., Silva, R.C., Van der Poel, W.H.M. 2003. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 81-86.
- Sato, G., Itou, T., Shoji, Y., Miura, Y., Mikami, T., Ito, M., Kurane, I., Samara, S.I., Carvalho, A.A.B., Nociti, D.P., Ito, F.H., Sakai, T. 2004. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 747-753.
- Shoji, Y., Kobayashi, Y., Sato, G., Itou, T., Miura, Y., Mikami, T., Cunha, E.M., Samara, S.I., Carvalho, A.A., Nocitti, D.P., Ito, F.H., Kurane, I., Sakai, T. 2004. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus spp.*) in Brazil. *J Vet Med Sci* 66, 1271-1273.
- Streicker, D.G., Turmelle, A.S., Vonhof, M.J., Kuzmin, I.V., McCracken, G.F., Rupprecht, C.E. 2010. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. *Science.* 329, 676-689.
- Trajano, E. 1984. Ecologia de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do sudeste do Brasil. *Rev Bras. Zool.* 2, 255-320.
- Velasco-Vila, A., Orciari, L.A., Juárez-Islas, V., Gomes-Sierra, M., Padilla-Medina, I., Flisser, A., Souza, V., Castillo, A., Franka, R., Escalante-Mañe, M., Sauri-González, I., Rupprecht, C.E. 2006. Molecular Diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J. Clin. Microbiol.* 44,1697-1710.
- Vieira, L.F.P., Pereira, S.R.F.G., Brandão, P.E., Oliveira, R.N., Carnieli-Junior, P., Galante, A.C., Chicarino, C.N., Kotait, I. 2010. Molecular characterization of rabies virus isolated from *Desmodus rotundus* captured in Rio de Janeiro State. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 343-349.
- WHO – World Health Organization. 2004. Expert consultation on rabies: first report (WHO Technical report series). World Health Organization, Geneva.

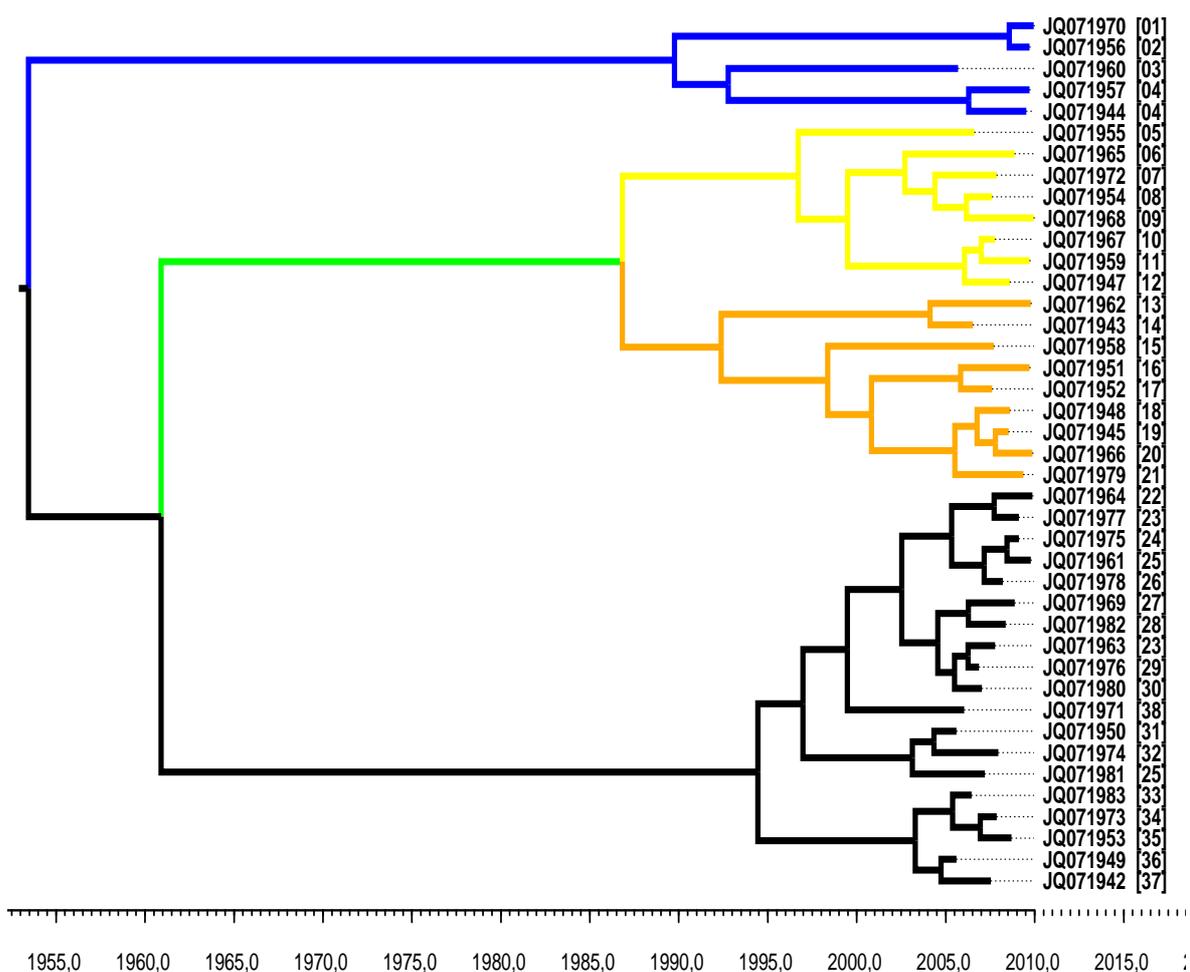


Figure 1. Maximum clade credibility (MMC) time tree, based on 807-bp G gene nucleotide sequences. Cluster 1 (blue), Cluster 2 (green), sub-cluster 2.1 (yellow) and sub-cluster 2.2 (orange), Cluster 3 (black). The figures right after each terminal branch represent the related sample. The figure in brackets represents the city/town where the sample was isolated.

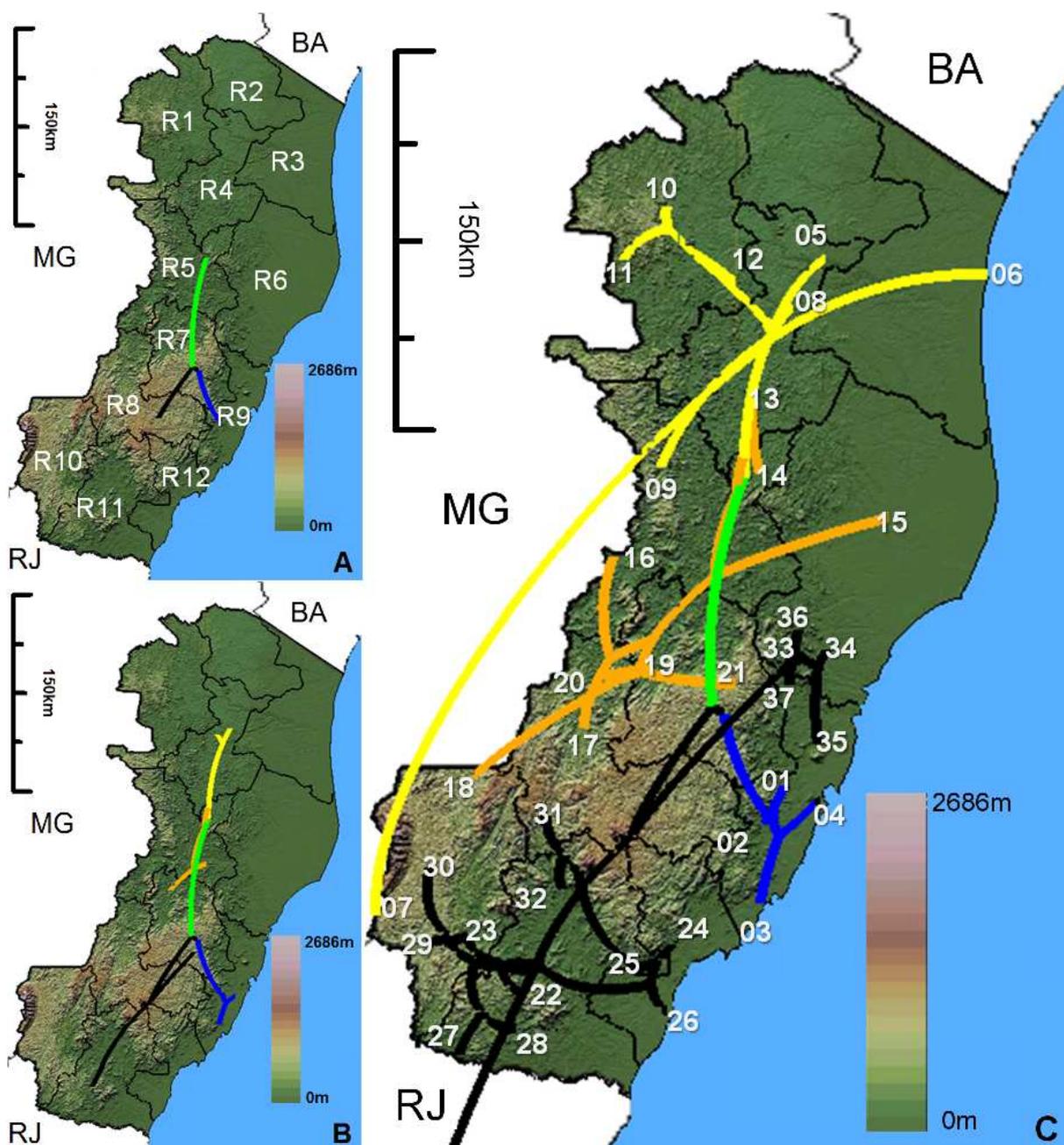


Figure 2. Spread of the rabies outbreak between 1955 and 2010 in Espírito Santo, Brazil. (A) Spread of the virus in 1985. The areas of the State are represented by R1 - Northwest 1, R2 - Northernmost, R3 - North Coast, R4 - Northwest 2, R5 – Colatina Site, R6 – Linhares Site, R7 - Central Mountainous, R8 - Southwest Mountainous, R9 – Metropolitan, R10 – Caparaó, R11 – Cachoeiro Site, R12 - Expanded Metropolitan South. (B) Dispersion of the virus in 2000. (C) Spread of the virus in 2010. The figures represent the cities and towns with rabies cases shown in Table 1. The State of Espírito Santo is bordered by the States of Bahia (BA), Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais and the Atlantic Ocean.

Table 1. Rabies virus samples isolated in the State of Espírito Santo, Brazil, between 2006 and 2010, used in this work

Isolate	City	Nº on Map	Species	Year	Accession number
392/10	Cariacica	01	Cattle	2010	JQ071970
182/10	Viana	02	Cattle	2010	JQ071956
261/06	Guarapari	03	Cattle	2006	JQ071960
190/10	Vitória	04	<i>Artibeus lituratus</i>	2010	JQ071957
034/10	Vitória	04	<i>Artibeus lituratus</i>	2010	JQ071944
178/07	Boa Esperança	05	Cattle	2007	JQ071955
307/09	Conceição da Barra	06	Cattle	2009	JQ071965
399/08	Dores do Rio Preto	07	Cattle	2008	JQ071972
160/08	Nova Venécia	08	Horse	2008	JQ071954
369/10	Pancas	09	Cattle	2010	JQ071968
352/08	Ecoporanga	10	Cattle	2008	JQ071967
205/10	Água do Norte	11	Cattle	2010	JQ071959
075/09	Vila Pavão	12	Cattle	2009	JQ071947
270/10	Governador Lindemberg	13	Cattle	2010	JQ071962
030/07	São Gabriel da Palha	14	Cattle	2007	JQ071943
194/08	Linhares	15	Cattle	2008	JQ071958
133/10	Baixo Guandu	16	Cattle	2010	JQ071951
151/08	Afonso Cláudio	17	Horse	2008	JQ071952
084/09	Ibatiba	18	Cattle	2009	JQ071948
048/09	Laranja da Terra	19	Cattle	2009	JQ071945
329/10	Itarana	20	Cattle	2010	JQ071966
777/09	Santa Teresa	21	Cattle	2009	JQ071979
305/10	Muqui	22	Cattle	2010	JQ071964
614/09	Alegre	23	Cattle	2009	JQ071977
580/09	Iconha	24	Cattle	2009	JQ071975
265/10	Rio Novo do Sul	25	Cattle	2010	JQ071961
760/08	Itapemirim	26	Cattle	2008	JQ071978
371/09	Apiacá	27	Cattle	2009	JQ071969
993/08	Mimoso do Sul	28	Horse	2008	JQ071982
304/08	Alegre	23	Horse	2008	JQ071963
590/07	Guaçuí	29	Cattle	2007	JQ071976

792/07	Ibitirama	30	Cattle	2007	JQ071980
0399/06	Quissamã	-	<i>Desmodus rotundus</i>	2006	JQ071971
127/06	Conceição do Castelo	31	Cattle	2006	JQ071950
542/08	Castelo	32	Cattle	2008	JQ071974
989/07	Rio Novo do Sul	25	Cattle	2007	JQ071981
1240/07	Ibiraçú	33	Horse	2007	JQ071983
413/08	Aracruz	34	Cattle	2008	JQ071973
154/09	Serra	35	Horse	2009	JQ071953
116/06	João Neiva	36	Cattle	2006	JQ071949
003/08	Fundão	37	Horse	2008	JQ071942

ANEXO B – Paper 2

Molecular Characterization of the Rabies Virus in Non-hematophagous Bats in the State of Espírito Santo, Brazil

Luiz Fernando Pereira Vieira^{a,*}, Silvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira^a, Rafael de Novaes Oliveira^b, Luiz Carlos Barbosa Tavares^c, Pedro Carnieli Junior^b, Ivanete Kotait^b

^aSetor de Virologia e Viroses, Laboratório de Sanidade Animal, Hospital Veterinário, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes/RJ, 28013-602, Brazil.

^bInstituto Pasteur. Av. Paulista, 393, Cerqueira César, São Paulo/SP, 01311-000, Brazil.

^cInstituto Biológico do Espírito Santo, Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal. Vila Oásis, Santana, Cariacica/ES, 29153-520, Brazil.

* Corresponding author:

Tel.: +55 22 2739-7362; fax: +55 22 2739-7194.

E-mail address: luizuenf@yahoo.com.br (L.F.P. Vieira)

Abstract

Rabies is a neurological disease caused by a virus of the *Rhabdoviridae* family, *Lyssavirus* genus. The main hosts of the rabies virus are from the Carnivora and Chiroptera orders. In this study a molecular characterization of the rabies virus isolated from frugivorous and insectivorous bat species from ES, Brazil, was performed. This molecular characterization was based on the partial sequencing of the virus' G gene. The virus, isolated from the *Nyctinomops laticaudatus* bat, grouped with isolates of the same host from another area of Brazil. The isolates from frugivorous bat *Artibeus lituratus* grouped with samples of the same species and

strains isolated from *Desmodus rotundus* from other areas of Brazil. Despite the similarity between the samples of *A. lituratus* and *D. rotundus*, a sub-cluster containing only *A. lituratus* was formed, which indicates the diverse epidemiological cycle in this species.

Keywords: rabies virus; *Artibeus lituratus*; *Nyctinomops laticaudatus*; frugivorous bat, insectivorous bat, molecular characterization

1. Introduction

Rabies is an infectious disease caused by a virus of the *Lyssavirus* genus, *Rhabdoviridae* family. According to WHO, thousands of people and millions of animals die every year of this disease [23]. In Brazil, urban rabies is controlled in several States, but every year many cases of rabies in bats and livestock are reported. In the State of Espírito Santo (ES), Southeastern Brazil, 76 cases of rabies in domestic herbivores [4] are reported on average every year.

The major transmitter of rabies to livestock is the *Desmodus rotundus* [10] vampire bat. Several other bats, however, are involved in the epidemiological cycle of the rabies disease. The rabies virus has been isolated in 42 different species of bats in Brazil [Instituto Pasteur – personal information].

Several authors have described rabies virus strains that are specific to a particular host such as dogs, *D. rotundus* [10], *Lasiurus spp.* *Histiotus montanus* [22], *Eptesicus furinalis*, *Molossus spp* and *Nyctinomops laticaudatus* [12]. Oliveira et al. (2010) [15] describes the presence of seven strains of rabies virus circulating between different genera of insectivorous bats in Brazil. The strains of rabies virus isolated from *D. rotundus* and *A. lituratus* are genetically very alike, and grouped into the same clusters when analyzed phylogenetically [11].

The fact that the virus remains in a particular host species probably promotes the isolation of a given viral sample that mutates over time. This makes the viral strain specific for every host species. The great diversity of host species and their interrelationship cause the epidemiology of rabies to be a very complex issue, which calls for in-depth studies of the molecular characterization of virus samples in different areas of Brazil.

In ES, samples of rabies in bats in urban and rural areas were isolated, but so far no molecular characterization of the virus has been performed. In this study, a molecular characterization of rabies virus samples isolated from insectivorous (*Nyctinomops laticaudatus*) and frugivorous (*Artibeus lituratus*) bats in the urban areas of ES, Brazil, has been performed, aiming to show its connection to several other virus reservoirs in the country.

2. Material and methods

2.1. Samples

There were performed three isolations of the rabies virus from samples of non-hematophagous bats found in the urban area of the city of Vitória, ES, Brazil (Table 1). These samples were kindly provided by the Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF). The rabies diagnosis was performed using the direct immunofluorescence technique as described by Dean et al. (1996) [3].

2.2. RT-PCR and sequencing

The RT-PCR was performed as described by Carnieli et al. (2008) [2], using the primers described by Sato et al. (2004) [19], Ga3222-40 (sense, 5'CGCTGCATTTTRTCARAGT3', position 3221-3239 of the viral genome) and Gb4119-39 (antisense, 5'GGAGGGCACCATTTGGTNTC3', position 4116-4135 of the viral genome). Sequencing was performed as described by Oliveira et al. (2010) [15], using the same primers used in the RT-PCR.

2.3. Phylogenetic analysis

The sequences of the rabies virus' glycoprotein isolated in this study were aligned using the ClustalW method. These sequences were retrieved from GenBank.

Two phylogenetic trees using the distance method with the neighbor-joining algorithm and Kimura-2-parameter evolutionary model were constructed, with 1,000 bootstrap replicates using Mega2 [13] software. Thirty-three fragments of the glycoprotein's gene (669 bases) which align with the complete genome of the PV virus (M13215), from nucleotide 3318 to 3986, formed phylogenetic tree 1. In this tree isolated sequences from the main reservoirs of rabies in Brazil, other than the strain PV reference sequence, were selected to be matched against the three sequences isolated in this study.

Phylogenetic tree 2 was constructed from 36 sequences of the glycoprotein, using 764 bases, which align with the strain PV of the nucleotide sequence from 3318 to 4081. In this tree, we selected 20 sequences isolated from *A. lituratus*, 13 sequences from *D. rotundus*, the strain PV reference sequence, besides the 034-10 and 190-10 sequences isolated in this study.

3. Results

The Phylogenetic tree 1 (Fig. 1), formed from the sequences isolated in this study and the sequences retrieved from GenBank, formed eight clusters, which were grouped according to the type of specie of viral isolation. These were the clusters formed according to genus or species: *Nyctinomops laticaudatus*, *Histiotus spp.*, *Molossus spp.*, *Eptesicus furinalis*, *Myotis spp.*, *Lasiurus spp.*, *Desmodus rotundus* + *Artibeus lituratus* and Dog.

The sequence JQ071946 isolated from *N. laticaudatus* formed a cluster with the sequences retrieved from the GenBank, isolated from the same species of insectivorous bats. The nucleotide identity between the sequences of this cluster was over 99%.

In phylogenetic tree 1, isolates JQ071944 and JQ071957 were grouped into the *D. rotundus* + *A. lituratus* cluster. This cluster shows the formation of two sub-clusters: sub-cluster *D. rotundus* groups isolates of hematophagous bats and sub-cluster *A. lituratus* groups samples of cattle and *A. lituratus*.

Phylogenetic tree 2 (Fig. 2) shows the formation of two major clusters: in cluster 1 isolates of *D. rotundus* and *A. lituratus* are grouped, and in cluster 2 only isolates of *A. lituratus* are grouped. Cluster 1 shows the formation of three sub-clusters: in sub-clusters 1.1 and 1.2 only isolates of *D. rotundus* are grouped. Sub-

cluster 1.3, however, is comprised of 4 isolates of *A. lituratus* and 1 isolate of *D. rotundus*. There are two other branches in the tree, each one having only one isolate of *A. lituratus*. These branches were not grouped with any other sub-cluster. Cluster 2 was not divided into sub-clusters because of the high degree of identity between sequences.

The average nucleotide identity between the sequences in cluster 1 was 97.6% (extremes of 100 to 95.9%), and between the isolates in cluster 2 was 99.3% (extremes of 100 and 98.5 %). Finally, the average of identity between clusters 1 and 2 was 96.6% (extremes of 97.9% to 95.5). Between isolates in sub-cluster 1.1, the average identity was 99.4% (extremes from 100 to 98.9%), in sub-cluster 1.2, the average was 99.1% (extremes from 100 to 98.6%), and in sub-cluster 1.3 the average was 98.9% (extremes from 100 to 98%). The average identity of the relation between sub-clusters 1.1 and 1.2 is 96.7% (extremes of 97.2 and 95.9); between sub-clusters 1.1 and 1.3, 96.8% (extremes of 97.3 and 95, 9%) and between sub-clusters 1.2 and 1.3 is 97.0% (extremes of 97.3 and 96%).

4. Discussion

Recently, Oliveira et al. (2010) [15], in a detailed study of rabies in insectivorous bats in Brazil, identified seven genus-specific virus strains related to *Myotis*, *Eptesicus*, *Nyctinomps*, *Molossus*, *Tadarida* and *Lasiurus* genus bats. Sequences of this study were aligned with at least three sequences of each of the strains described by Oliveira et al. (2010) [15] and sequences of *D. rotundus*, *A. lituratus*, cattle, dog and the standard strain PV (Pasteur virus), retrieved from GenBank.

Isolate JQ071946 from a *N. laticaudatus* from the urban region of Vitória city, was grouped in phylogenetic tree 1. The sequences isolated from *N. laticaudatus* from the State of São Paulo and isolate 065-10 showed a high level of identity (greater than 99%), despite their having been isolated about 800 km away, with a time interval between isolations varying from 3 to 5 years.

In the group of sequences that were analyzed, the isolated sequences of *N. laticaudatus*, including isolate JQ071946, showed a few particular molecular markers. They were amino acid valine, in positions 12 and 121, and amino acid serine in position 110. These markers were also observed by Oliveira et al (2010) [15]. In

addition to amino acid mutations, there were six other specific markers in the sequence of nucleotides. However, these were synonymous mutations. According to their position and nucleotide, they were markers 21-A, 348-C 486-T, 504-G and 525-A.

Isolates 034-10 and 190-10 clustered in phylogenetic tree 1 in the *D. rotundus* + *A. lituratus* cluster. Isolate JQ071944 was retrieved from an *A. lituratus* and isolate JQ071957 was retrieved from a frugivorous bat (probably another *A. lituratus*). The species of the latter could not be identified because its face was torn apart and part of its skull was showing, probably because of an attack of a domestic cat, something that commonly happens in the urban area where the bat was found. This cluster formation agrees with the findings of Shoji et al. (2004) [20], who claim that samples isolated from *Artibeus spp.* and *D. rotundus* are closely related, with nucleotide identities varying from 97.6 to 99.4%.

After the deployment of the urban rabies control program in Brazil in the 70's, with mass vaccination of dogs and cats, the Southeast part of the country has virtually not reported any case of rabies in domestic animals [17]. However, the rabies virus is often isolated in insectivorous bats in urban areas of Brazil [21, 18], as well as cases of spillover in which variants that are typical of bats, mainly *D. rotundus* and *A. lituratus*, are isolated in dogs and cats [1, 7]. Therefore, attention must be given to the rabies of non-hematophagous bats to avoid cases of human rabies transmitted by such bats [8, 6]. According to the Pan American Health Organization [17], one case of human rabies transmitted by a non-hematophagous bat was recorded in Brazil between 1970 and 2011. In the same period, however, over 18 cases of rabies transmitted by non-identified bats have been registered.

Moreover, it is possible that cases of rabies in humans are not reported because of misdiagnosis, since quite a few cases of rabies transmitted by bats have a clinical picture of apathy and paralysis, unlike the classical clinical picture of furious rabies normally seen in the dog-transmitted rabies [16].

In the *D. rotundus* + *A. lituratus* cluster, isolates JQ071944 and JQ071957 were more closely related to isolates of the *A. lituratus* sub-cluster. The fact that the isolated sequences of *A. lituratus* in Espírito Santo have been very similar to the samples of *A. lituratus* from the State of São Paulo indicates that the *A. lituratus* strain has features that distinguish it from the *D. rotundus* strain. To confirm this hypothesis, samples JQ071944 and JQ071957 were aligned with all glycoprotein

sequences (having over 750 bases) of the rabies virus isolated from *D. rotundus* and *A. lituratus* in Brazil, available in GenBank. Phylogenetic tree 2 was constructed with these samples, which formed two main clusters. Isolates JQ071944 and JQ071957 were grouped into cluster 2 that contains only *A. lituratus* isolates. Molecular markers differentiating the cluster containing only *A. lituratus* were found. Given their respective position and nucleotide, they were markers 6-T, 45-A, 249-G 372-C, 504-C and 651-G. None of these nucleotide mutations resulted in an amino acid change. So it is possible to infer that despite the difference between sequences, the features of the viral particles isolated from *D. rotundus* and *A. lituratus* are the same.

Results indicate that there is an epidemiological cycle of rabies that is specific to the *A. lituratus* species. This result was also suggested by Fahl (2009) [5] in an analysis carried out with *D. rotundus* and *A. lituratus* isolates of rabies virus from the State of Sao Paulo and, also matches the findings of Mochizuki et al. (2011) [14], in which an isolate from *D. rotundus* (from the State of São Paulo, Brazil) was more similar to an isolate of *D. rotundus* from the French Guiana than to an isolate of *A. lituratus* from the State of São Paulo.

On the other hand, the rabies virus is still transmitted between the two bats species, as shown in sub-cluster 1.3, where isolates are found in both species. This fact causes an increase in the area of influence of the *D. rotundus* virus strain, as this type of bat does not usually inhabit urban areas. However, as *A. lituratus* bats are found in this habitat in great numbers, they might have carried the virus along.

The epidemiology of rabies in ES is complex. Rabies has been reported in domestic herbivores [9], which are typical cases of transmission by *D. rotundus*. In addition, this work reports the isolation of two different virus strains that are linked to non-hematophagous bats *N. laticaudatus* and *A. lituratus* found in urban areas. The isolated strain of *A. lituratus* was very similar to the sample found in bats of the same species from the State of São Paulo, which suggests a cycle that is different from that of the *D. rotundus*. The risk of cases of human rabies transmitted by bats in urban areas is constant, given the proximity of bats to human houses and the hard control of the rabies disease in these species.

Acknowledgement

The authors of this paper thank Instituto Pasteur in São Paulo and the Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal in ES. We would also like to thank Thiago da Silva Farias, the coordinator of the IDAF Laboratories. This work was financed by CNPq (the Brazilian Council for Scientific and Technological Development) and the Brazilian Ministry of Agriculture, Cattle Raising and Supply (MAPA), project 578545/2008-0.

References

1. Batista HBCR, Caldas E, Junqueira DM, Teixeira TF, Ferreira JC, Silva JR, Rosa JCA, Roehe PM (2009) Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant. *Acta Scientiae Veterinariae* 37:371-374.
2. Carnieli-Jr P, Fahl WO, Castilho JG, Oliveira RN, Macedo CI, Durymanova E, Jorge RSO, Morato RG, Spíndola RO, Machado LM, Úngar-de-Sá JE, Carrieri ML, Kotait I (2008) Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in northeastern Brazil. *Virus Res* 131:33-46.
3. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P (1996). The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H (Eds.) *Laboratory techniques in rabies*, 4. ed. World Health Organization, Geneva, pp 88-95.
4. DSA/SSA/MAPA (2011) Boletim de Defesa Sanitária Animal. MAPA. <http://www.agricultura.gov.br>. Accessed 25 October 2011.
5. Fahl WO (2009) Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G. Dissertation, Universidade de São Paulo.
6. Favi M, Mattos CA, Yung V, Chala E, López LR, Mattos CC (2002) First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. *Emerg Infect Dis* 8:79-81.
7. Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EMS, Aguiar EAC, Silva LHQ, Sodré MM, Souza MCAM, Kotait I (2002) Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 44:91-95.

8. Humphrey GL, Kemp GE, Wood EG (1960) A fatal case of rabies in a woman bitten by an insectivorous bat. *Public Health Rep* 75:317-326.
9. IDAF (2010) Raiva dos herbívoros. Boletim eletrônico epidemiológico. Nº. 1/2010. Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal. http://www.idaf.es.gov.br/Download/Boletim_DDSIA_1.pdf. Accessed 28 September 2011.
10. Ito M, Itou T, Shoji Y, Sakai T, Ito FH, Arai YT, Takasaki T, Kurane I (2003) Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Virol* 26: 317–330.
11. Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha E M S, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T (2007) Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Arch Virol* 152:1995-2004.
12. Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, Cunha E MS, Samara SI, Carvalho AAB, Nocitti DP, Ito FH, Sakai T (2005) Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J Vet Med Sci* 66: 647-652.
13. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) Mega2: molecular evolutionary analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244:1245.
14. Mochizuki N, Kobayashi Y, Sato G, Hirano S, Itou T, Ito FH, Sakai T (2011) Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a hematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. *J Vet Med Sci* 73:759–766.
15. Oliveira RN, Souza SP, Lobo RSV, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli PJr, Fahl WO, Achkar SM, Scheffer KC, Kotait I, Carrieri ML, Brandão PE (2010) Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology* 405:352-360.
16. Oliveira RN, Takaoka N, Brandão PE, Carnieli-Jr P, Macedo C, Castilho J, Carrieri ML, Kotait I (2006) Postmortem confirmation of human rabies source. *Emerg Infect Dis* 12:867-869.
17. OPAS/OMS (2011) Epidemiological Information System. Pan American Health Organization. <http://siepi2.panaftosa.org.br/Panel.aspx?Idioma=i>. Accessed 16 November 2011.

18. Queiroz-da-Silva LH, Cunha EMS, Pedro WA, Cardoso TC, Souza MCC, Ferrari CIL (1999) Isolamento do vírus rábico em *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae) no Estado de São Paulo. *Rev Saúde Pública* 33:626-628.
19. Sato G, Ito T, Shoji Y, Miura Y, Mikami T, Ito M, Kurane I, Samara SI, Carvalho AAB, Nociti DP, Ito FH, Sakai T (2004). Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *J Vet Med Sci* 66:747-753.
20. Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Ito T, Miura Y, Mikami T, Cunha EM, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Kurane I, Sakai T (2004). Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus spp.*) in Brazil. *J Vet Med Sci* 66:1271-1273.
21. Uieda W (1998) Rabies in insectivorous bat *Tadarida brasiliensis* in Southeastern Brazil. *Rev Saúde Pública* 32:484-485.
22. Velasco-Vila A, Orciari LA, Juárez-Islas V, Gomes-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, Souza V, Castillo A, Franka R, Escalante-Mañe M, Sauri-González I, Rupprecht CE (2006) Molecular Diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J Clin Microbiol* 44:1697-1710.
23. WHO – World Health Organization (2004) Expert consultation on rabies: first report (WHO Technical report series). World Health Organization, Geneva.

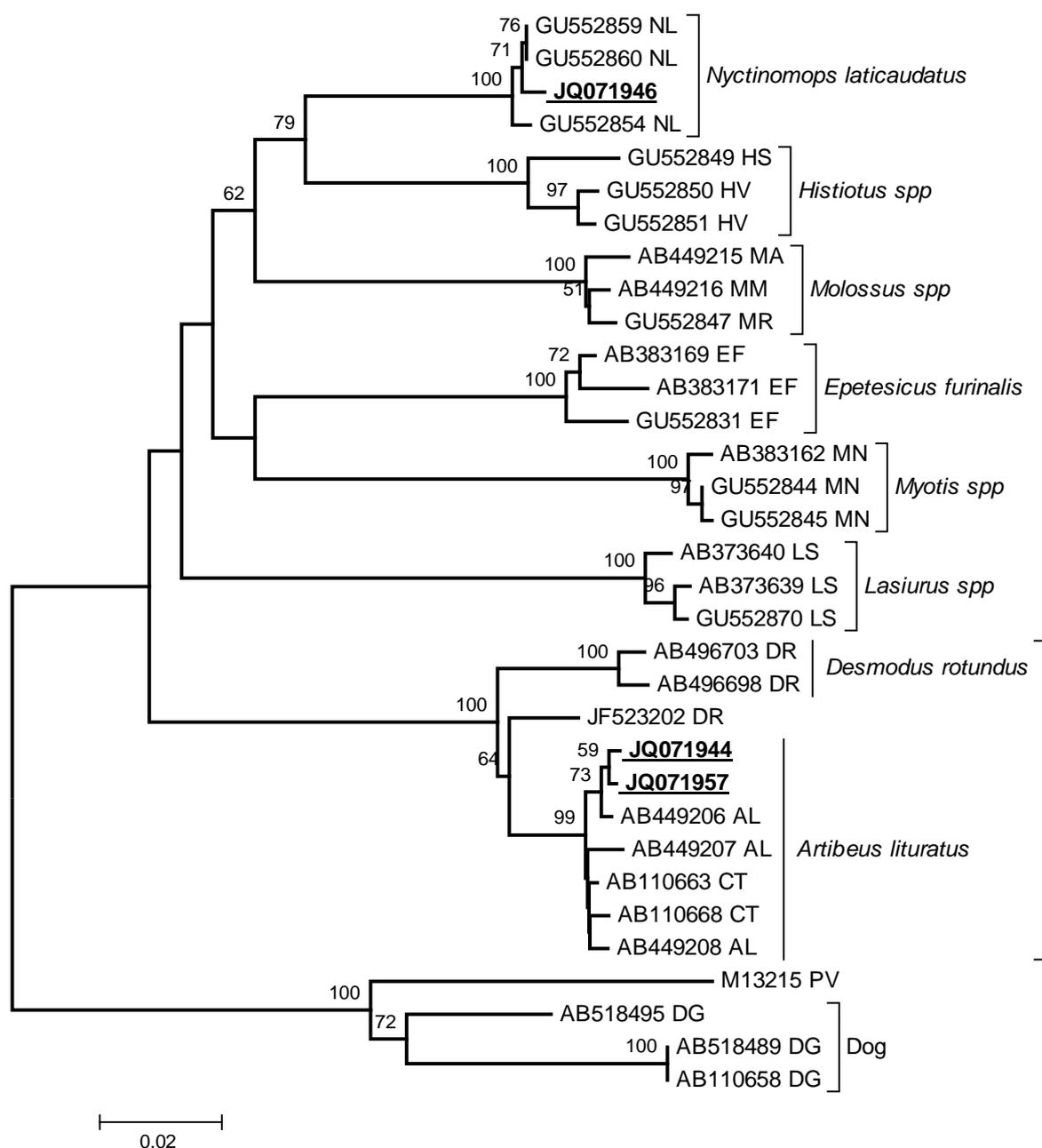


Figure 1. Phylogenetic tree 1. This tree was constructed using the distance method with the *neighbor-joining* algorithm and *kimura-2-parameter* evolutionary model, with 1,000 bootstrap repetitions, from partial sequences of the G gene of the rabies virus. The sequences in this study are highlighted in bold and underlined, the sequences retrieved from *GenBank* are represented by the access number, followed by the isolation species (NL- *N. laticaudatus*, HS – *Histiotus sp*, HV- *H. velatus*, MA – *M. abrasus*, MM – *M. molossus*, MR – *M. rufus*, EF – *E. furinalis*, MN- *M. nigricans*, LS – *Lasiurus spp.*, DR – *D. rotundus*, AL – *A. lituratus*, CT – Cattle, PV- Pasteur Virus, DG- Dog).

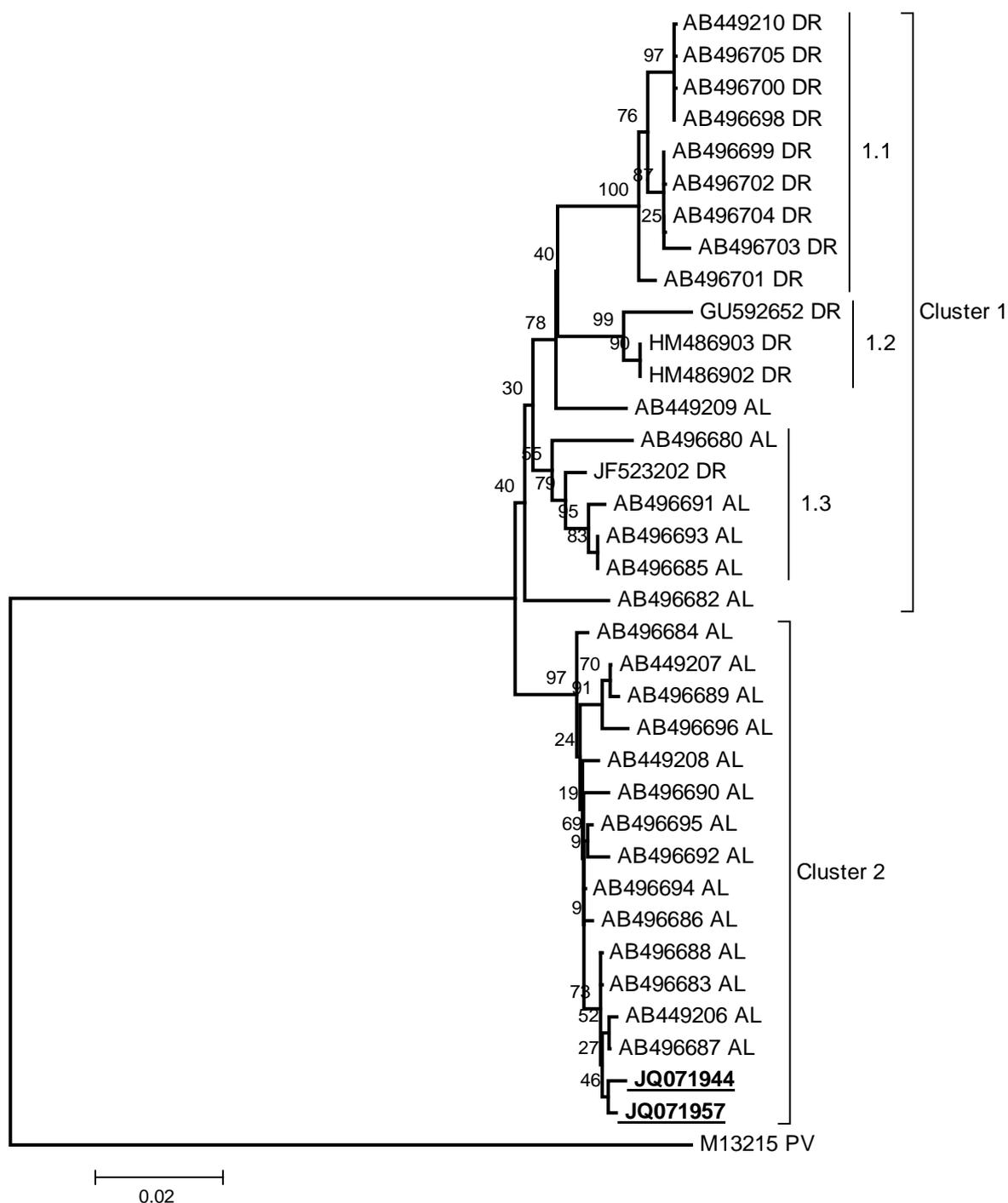


Figure 2. Phylogenetic tree 2. This tree was constructed using the distance method with the *neighbor-joining* algorithm and *kimura-2-parameter* evolutionary model, with 1,000 bootstrap repetitions, from partial sequences of the G gene of the rabies virus. The sequences in this study are highlighted in bold and underlined, the sequences retrieved from GenBank are represented by the access number, followed by the isolation species (DR – *D. rotundus*, AL – *A. lituratus*, PV- Pasteur Virus).

Table 1. Isolates of rabies virus from non-hematophagous bats in the city of Vitória, ES, Brazil.

Isolate	Species	Year	No. of access
065-10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	2010	JQ071946
034-10	<i>Artibeus lituratus</i>	2010	JQ071944
190-10	<i>Artibeus lituratus</i>	2010	JQ071957