

Estudo imunológico e genético de 10 isolados do vírus da raiva de morcegos do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil

Carla da Silva MOTA¹
Fumio Honma ITO¹
Marlon Vicente SILVA²
Go SATO³
Yuki KOBAYASHI³
Takuya ITOU³
Takeo SAKAI³

1- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP
2- Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman, Rio de Janeiro-RJ
3- Veterinary Research Center of Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, College of Bioresource Sciences, Fujisawa, Kanagawa, Japan

Correspondência para:

Carla da Silva Mota, 450, Sherbrooke Est., ap. 1201, Québec, Montréal, Canada – H2L 1J8
carla.mota1976@hotmail.com

Recebido para publicação: 19/02/2009
Aprovado para publicação: 07/01/2010

Resumo

O presente trabalho visou estudar dez isolados de vírus da raiva de morcegos hematófagos e não-hematófagos do Estado do Rio de Janeiro em suas características genéticas quanto aos genes N e G. Além disso, estudou-se a resposta de camundongos vacinados com a vacina antirrábica produzida pela replicação da amostra Pitman-Moore em cultivo celular, frente ao desafio com estes isolados virais, utilizando-se um ensaio imunológico baseado no teste de potência *NIH*. A vacina antirrábica utilizada na imunização dos camundongos ofereceu proteção em mais de 80% dos camundongos vacinados com a diluição 1:5 da vacina, frente à maioria dos isolados. A análise filogenética do gene da proteína N apresentou um padrão de agregação dividido em variante de morcego hematófago e variante de morcego insetívoro, com todos os isolados de morcegos frugívoros *Artibeus sp.* tendo sido segregados com a variante característica de morcegos *Desmodus rotundus*. Foram observadas diferenças filogenéticas entre as variantes do vírus da raiva de morcego hematófago isoladas na Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro e aquelas isoladas nas Regiões Metropolitana e Sul do Estado. A substituição do resíduo ácido aspártico por ácido glutâmico na posição 118, encontradas na caracterização genética da proteína G dos isolados 704/97BR-DR e 151/98BR-DR, permite inferir que esta posição esteja relacionada à antigenicidade viral. Não foram observadas diferenças genéticas temporais entre os isolados estudados. A vacina antirrábica utilizada ofereceu proteção satisfatória contra a maioria dos isolados estudados.

Palavras-chave:

Vírus da raiva.
Vacina antirrábica.
Potência de vacinas.
Morcegos.
Filogenia.

Introdução

A raiva continua representando um importante problema de saúde pública em todo o mundo, a despeito de todos os avanços científicos desde a sua descoberta na Antiguidade e da disponibilidade de vacinas efetivas para uso humano e animal, por sua evolução frequentemente fatal e pelo elevado número anual de casos em humanos e em animais¹.

Os reservatórios mais conhecidos e considerados eficientes na transmissão da raiva sempre foram espécies da ordem *Carnívora*². Entretanto, no Brasil, os morcegos apresentam-se como transmissores emergentes, em função do aumento do número de casos registrados de raiva humana transmitida por morcegos³, notadamente nas regiões norte e nordeste do país⁴, e da crescente invasão de morcegos hematófagos e

não-hematófagos nas áreas urbanas provocada pela adaptação a abrigos artificiais⁵.

As vacinas antirrábicas disponíveis para uso em humanos e animais são todas de vírus inativado⁶. Atualmente, a vacina utilizada nos programas de saúde pública no Brasil é a vacina produzida a partir da replicação da amostra WISTAR PM/WI 38-1503M em cultura de células Vero⁷. Para determinar a capacidade de um lote de vacina antirrábica em induzir proteção, o teste de potência NIH, realizado pela vacinação seriada de lotes de camundongos, seguida de desafio viral com o isolado padrão, é considerado o ensaio padrão-ouro⁸.

Considerando-se o potencial de casos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos e não-hematófagos em função de sua crescente proximidade ao ambiente urbano, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito do desafio de camundongos previamente vacinados com a vacina antirrábica humana, frente a isolados de morcegos e a diversidade genética destes isolados quanto ao gene da proteína N e ao gene da proteína G.

Materiais e Métodos

Foram utilizados camundongos albinos suíços recém-desmamados, pesando entre 13-16 g, provenientes do Biotério do

Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IMMVJV). Seu uso foi autorizado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo nº 532/2004.

Foi utilizada a amostra padrão do vírus da raiva CVS-37, além de outros 10 isolados do vírus da raiva de morcegos hematófagos e não-hematófagos, oriundos de seis Municípios do Estado do Rio de Janeiro, conforme os dados resumidos no quadro 1 e ilustrados na figura 1.

Utilizou-se a vacina antirrábica humana produzida a partir da replicação da amostra WISTAR PM/WI 38-1503M em cultura de células Vero, inativada pela beta-propiolactona, pelo laboratório *Aventis Pasteur* (Lyon, França), e gentilmente cedida pela Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro.

Camundongos previamente vacinados com a vacina antirrábica humana foram submetidos ao desafio viral com o vírus padrão CVS-37 e com os isolados de morcegos, em um ensaio imunológico realizado à semelhança do teste NIH⁸. A vacina antirrábica foi diluída a 1:5, 1:25 e 1:125. Para cada diluição foi vacinado um grupo de 16 camundongos, por via intraperitoneal, com 0,5 mL da vacina diluída, perfazendo um total de duas doses,

ISOLADO	ANO	ESPÉCIE ANIMAL	MUNICÍPIO
222/90BR-T	1990	<i>Tadarida sp.</i>	Rio de Janeiro
419/90BR-T	1990	<i>Tadarida sp.</i>	Rio de Janeiro
704/97BR-DR	1997	<i>Desmodus rotundus</i>	Itaperuna
151/98BR-DR	1998	<i>Desmodus rotundus</i>	Laje do Muriaé
204/01BR-AL	2001	<i>Artibeus lituratus</i>	Rio de Janeiro
399/02BR-AF	2002	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Rio de Janeiro
624/02BR-DR	2002	<i>Desmodus rotundus</i>	Valença
755/02BR-A	2002	<i>Artibeus sp.</i>	Paracambi
046/04BR-NL	2004	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Rio de Janeiro
384/04BR-A	2004	<i>Artibeus sp.</i>	Mesquita

Quadro 1 - Dados descritivos dos isolados do vírus da raiva obtidos de morcegos recebidos na Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária "Jorge Vaitsman" (IMMVJV) – Rio de Janeiro - 1990 – 2004

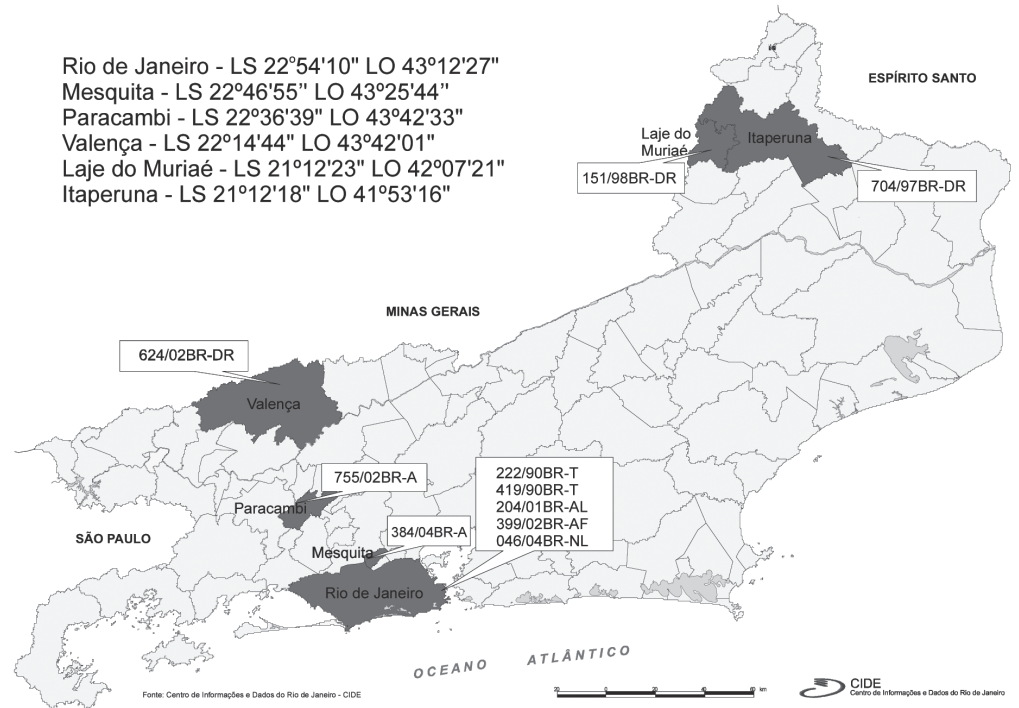


Figura 1- Mapa do Estado do Rio de Janeiro, destacando os Municípios de origem dos isolados utilizados neste trabalho. Centro de Informações e Dados do Rio de Janeiro – CIDE

administradas com um intervalo de sete dias. O desafio viral foi realizado 14 dias após a primeira vacinação, por via intracerebral, com um volume de 0,03 mL da suspensão do vírus-desafio, para cada um dos dez isolados estudados. O controle desta suspensão foi realizado por meio de sua titulação em camundongos não-vacinados, devendo a dose desafio se encontrar na faixa entre 12 a 50 DL_{50} para o ensaio ser considerado válido. Os animais inoculados foram observados por 14 dias, à procura de sinais clínicos da raiva. Foram realizados o cálculo da Dose Efetiva 50% ($DE_{50}/0,5mL$) com o teste de Probit, com o uso do programa *StatsDirect Statistical Software* versão 2.6.2, com intervalo de confiança de 95%; e o cálculo da Dose Protetora 50% ($DP_{50}/0,5mL$) com o método de Reed e Muench⁹.

A extração de RNA, PCR e sequenciamento foram realizados conforme metodologia descrita^{10,11}. Para o RT-PCR e

sequenciamento do gene das proteínas G e N foram utilizados os *primers* relacionados nos quadros 2 e 3, respectivamente. Para os isolados sequenciados quanto ao gene da proteína N, as sequências de nucleotídeos consensuais de cada isolado foram alinhados pelo método CLUSTAL W, com o uso do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.5.2¹². Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* – MEGA, versão 3.1¹³, com o algoritmo de *Neighbor-Joining*, modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e *bootstrap* com 1000 replicações. Para os isolados sequenciados quanto ao gene da proteína G, cada sequência nucleotídica foi traduzida em resíduos de aminoácidos e comparadas manualmente com o uso do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.5.2.

Primers	Sentido	Posição¹	Sequência
Ga3222-40	+	3221-3229	5'CGCTGCATTT(A/G)TCA(A/G)AGT3'
VT129	-	3438-3419	5'GGTGATGTATATCGATGGGG3'
Ga3222-40-1	+	3518-3536	5'GGGATACATCTCTGCCATA3'
Gb4119-39-1	-	3819-3801	5'GGGATTTGTCGTATGGGTC3'
GS3994	+	3995-4019	5'CGG(A/C)TTTGTGGATGAAAG(A/G)GGC3'
Gb4119-39	-	4135-4116	5'GGAGGGCACCATTGGT(A/C)TC3'
GS3994-1	+	4373-4392	5'GACTTGGAACGAGATCATCC3'
VT1391	-	4700-4681	5'CAGGAGATATTTCCCCAAC3'
RVL _a -5	-	4857-4836	5'CCCA(C/G)GAAGATAT(A/G)ACTTTCCC3'
VT1551	+	4852-4859	5'GTCGTATCTTCATGGGAG3'
G-antiBR2072-1	-	4996-4978	5'CATGAAGTATGTGAAGGGC3'
RVL _a -3	-	5114-5091	5'GCACCATTGGT(C/T)ACTGATACTGTC3'
G-antiBR2072	-	5375-5356	5'TGCTGATTGC(A/G)CCTACATT3'
RVL _a -1	-	5435-5416	5'AT(A/G)GGGTCATCATAAACCTC3'

¹ Numeração nucleotídica baseada na sequência do isolado PV (GenBank n. M13215)

Quadro 2- Descrição dos *primers* utilizados para o RT-PCR e para o sequenciamento genético dos isolados quanto ao gene da proteína G

Primers	Sentido	Posição¹	Sequência
P1	+	66-86	5'CTACAATGGATGCCGACAAGA3'
N8	-	1585-1568	5'AGTTTCTTCAGCCATCTC3'
BRABN-S1	+	336-355	5'GGACTAGCTATGGAATCCTG3'
BRABN-S3	+	782-801	5'GGACTGGTGTCAATACAGG3'
BRABN-C3	-	537-519	5'TGTCCAGAGATTTTGCTCA3'
P2	-	1029-1007	5'CCCATATAACATCCAACAAAGTG3'

¹ Numeração nucleotídica baseada na sequência do isolado PV (GenBank n. M13215)

Quadro 3- Descrição dos *primers* utilizados para o RT-PCR e para o sequenciamento genético dos isolados quanto ao gene da proteína N

Resultados

Os resultados dos ensaios imunológicos realizados com base no protocolo do teste de potência da vacina antirrábica humana (NIH), com os isolados do vírus da raiva de morcegos e vírus padrão CVS, estão apresentados na tabela 1. Dos camundongos vacinados com a vacina antirrábica de uso humano, diluída 1:5, a proteção conferida pela vacina foi maior que 80% para a maioria dos isolados do vírus da raiva utilizados no desafio viral dos ensaios imunológicos, à exceção dos isolados

704/97BR-DR, 151/98BR-DR, 399/02BR-AF e 624/02BR-DR.

No desafio viral realizado com a amostra padrão CVS, a proteção conferida pela vacina antirrábica humana (teste) foi maior que 80%, nos três grupos de camundongos vacinados com diluições diferentes da vacina. Para a vacina antirrábica de referência, cujo ensaio NIH foi realizado no mesmo momento do ensaio com a vacina teste e com a mesma suspensão de vírus-desafio, 81,25% dos camundongos vacinados foram protegidos na diluição 1:5

da vacina, 68,75% na diluição 1:25 e 43,75% na diluição 1:125. A tabela 2 apresenta os resultados dos ensaios imunológicos em Dose Efetiva 50% por 0,5 mL de vacina, calculada por meio do teste de Probit; a Dose Protetora a 50% por 0,5mL de vacina e as Dose Letal 50% por 0,03mL do vírus-desafio, ambas calculadas pelo método de Reed e Muench⁹. Para os isolados 151/98BR-DR, 399/02BR-AF e 624/02BR-DR, o teste de Probit não foi capaz de fornecer resultados com intervalo de confiança de 95% porque o número de animais sobreviventes foi igual

em diluições diferentes da vacina. Para o vírus padrão CVS, o teste também não produziu resultados em função do número de animais sobreviventes ter sido elevado e próximo entre diluições diferentes da vacina.

Os resultados mais baixos da DP₅₀ foram encontrados para os isolados 704/97BR-DR, 151/98BR-DR e 624/02BR-DR, oriundos de morcegos hematófagos. Para os isolados 384/04 e vírus padrão CVS não foi possível calcular o valor exato da DP₅₀, pois o acumulado de camundongos sobreviventes foi superior a 50% para todas as diluições

Tabela 1- Resultados dos ensaios imunológicos em valores absolutos e percentuais dos camundongos sobreviventes, por diluição da vacina antirrábica, de acordo com o isolado utilizado para o desafio viral, realizado na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ – Rio de Janeiro – 2005-2007

Isolado viral	Diluição da vacina		
	1:5	1:25	1:125
222/90BR-T	15/16 ¹ 93,8% ²	8/16 50,0%	8/16 50,0%
419/90BR-T	15/16 93,8%	10/16 62,5%	5/16 31,3%
704/97BR-DR	9/7 56,3%	2/14 12,5%	0/16 0,0%
151/98BR-DR	7/16 43,8%	7/16 43,8%	4/16 25,0%
204/01BR-AL	14/16 87,5%	12/16 75,0%	9/16 56,3%
399/02BR-AF	11/16 68,8%	11/16 68,8%	8/16 50,0%
624/02BR-DR	10/16 62,5%	6/16 37,5%	6/16 37,5%
755/02BR-A	14/16 87,5%	7/16 43,8%	5/16 31,3%
046/04BR-NL	16/16 100,0%	11/16 68,8%	6/16 37,5%
384/04BR-A	15/16 93,8%	14/16 87,5%	10/16 62,5%
Amostra CVS	16/16 100,0%	15/16 93,8%	13/16 81,3%

¹ Sobreviventes/Animais desafiados

² Percentual de sobreviventes

Tabela 2- Resultados das DE_{50} calculadas por Probit, e das DP_{50} calculadas pelo método Reed e Muench e obtidas a partir do desafio viral (DL_{50}) dos camundongos vacinados com a vacina antirrábica de uso humano, utilizando-se o vírus da raiva padrão CVS e os isolados oriundos de morcegos, realizado na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJV – Rio de Janeiro – 2007-2008

ISOLADOS	$DE_{50}/0,5\text{ mL}$ (PROBITO)	$DP_{50}/0,5\text{ mL}$ (REED E MÜENCH)	$DL_{50}/0,03\text{ mL}$ (REED E MÜENCH)
222/90BR-T	1:73	1:51	14,54
419/90BR-T	1:49	1:47	17,78
704/97BR-DR	1:6	1:7	31,62
151/98BR-DR	-	1:13	50,69
204/01BR-AL	1:224	1:84	13,33
399/02BR-AF	-	1:51	56,23
624/02BR-DR	-	1:18	13,33
755/02BR-A	1:33	1:28	42,17
046/04BR-NL	z1:75	1:62	23,71
384/04BR-A	1:312	> 1:125	36,30
Amostra CVS	-	> 1:125	18,62

(-) O teste não forneceu resultados com intervalo de confiança de 95%.

da vacina. Para os ensaios imunológicos realizados com os isolados 204/01BR-AL e 624/02BR-DR, para uma mesma dose-desafio, a vacina apresentou resultado 4,6 vezes superior frente ao isolado 204/01BR-AL. De modo semelhante, o ensaio com o vírus padrão CVS apresentou resultado pelo menos duas vezes superior ao realizado com o isolado 419/90BR-T. Por outro lado, com o isolado 704/97BR-DR, geneticamente relacionado ao isolado 151/98BR-DR, a vacina apresentou resultado inferior, frente a dose menor do vírus-desafio.

Comparando-se o gene N dos isolados do vírus da raiva de morcegos estudados neste trabalho com outros isolados do Brasil, a relação filogenética estabelecida segregou os isolados em dois grupos distintos: variante de morcego hematófago e variante de morcego insetívoro, conforme ilustrado na figura 2. As amostras 204/01BR-AL, 399/02BR-AF, 755/02BR-A e 384/04, todas obtidas de morcegos *Artibeus sp.* segregaram com a variante de característica de morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Os isolados 704/97BR-DR e 151/98BR-DR, oriundos de morcegos *D. rotundus* na Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro e que apresentaram resultados semelhantes no ensaio imunológico, formaram um

agrupamento à parte sustentado por um valor de *bootstrap* de 100, com base na sequência de 1,575 bp do gene da proteína G (Figura 3).

A região do ectodomínio do gene da proteína G dos isolados do vírus da raiva de morcegos apresenta-se mais conservada, com 89,75% de identidade entre os aminoácidos, enquanto a região do peptídeo de sinal apresenta 63,15% de identidade, seguida da região do endodomínio com 38,63% e o domínio transmembrana com 33,33%, quando comparado ao isolado vacinal Pitman-Moore. Os três isolados de morcegos insetívoros (222/90BR-T, 419/90BR-T e 046/04BR-NL) apresentaram o mesmo padrão de substituições de aminoácidos, à exceção de uma substituição de uma serina por uma fenilalanina na posição 391 do isolado 419/90BR-T. Algumas destas substituições estão presentes nas regiões II b (posição 37), II (posição 147), II a (posição 199), “wb+” (posição 264) e III (posição 330), que são sítios antigênicos e epítomos. A substituição de uma citosina (amostras PM e CVS)/timina (isolado PV) por uma guanina na posição 392 da sequência de nucleotídeos dos isolados 704/97BR-DR e 158/98, determinou a substituição do aminoácido ácido aspártico pelo ácido glutâmico (Figura 4).

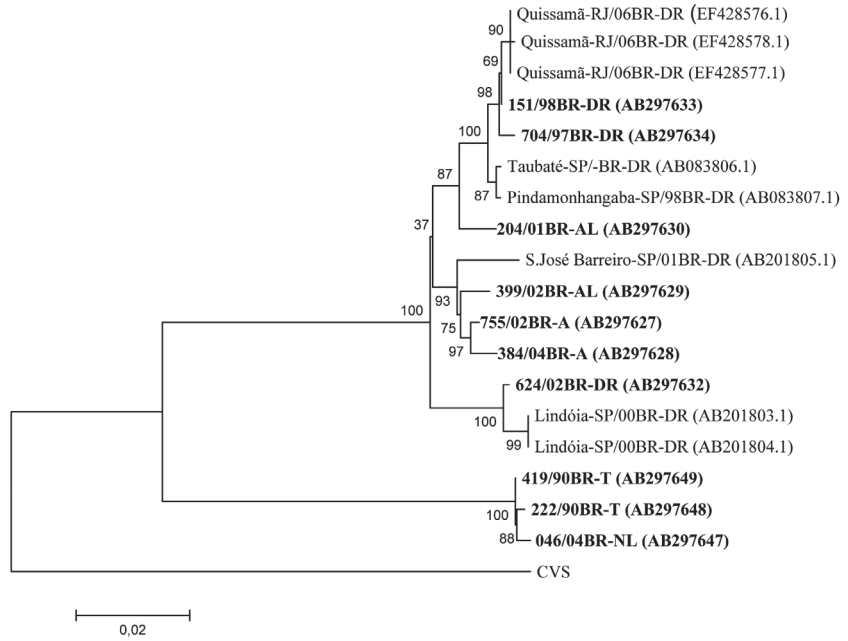


Figura 2- Dendograma da relação filogenética estabelecida entre os isolados do vírus da raiva de morcegos obtidos na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJV (em negrito) e de outros isolados de morcegos, com base na sequência de 1,353 bp do gene da proteína N – Rio de Janeiro – 2007-2008

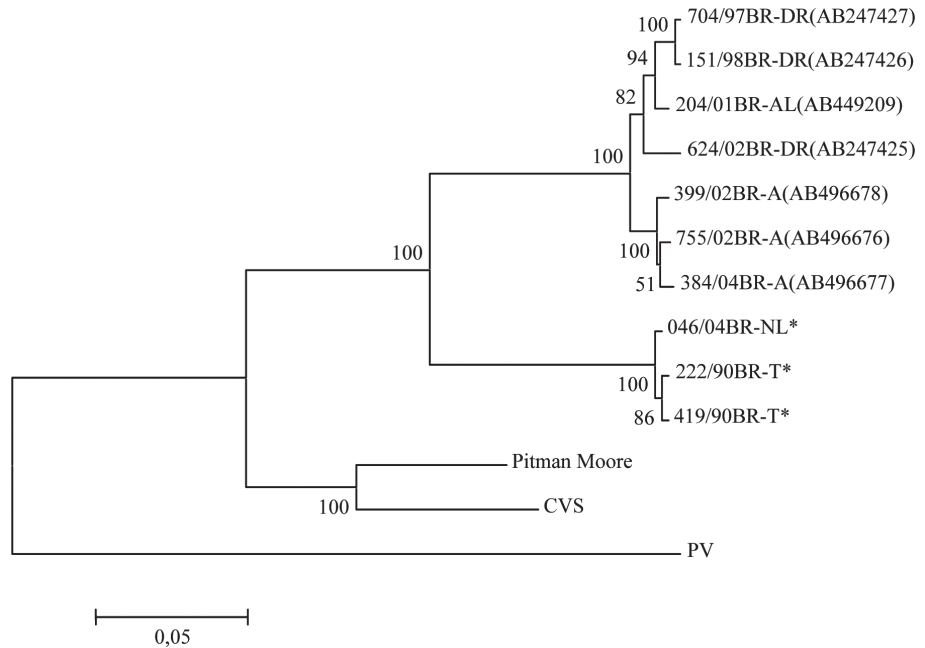


Figura 3- Dendograma da relação filogenética estabelecida entre os isolados do vírus da raiva de morcegos obtidos na Seção de Diagnóstico de Raiva do IMMJV e o vírus padrão CVS, Pitman Moore e PV, com base na sequência de 1,575 bp do gene da proteína G – Rio de Janeiro – 2007-2008 *Acesso GenBank não disponível

(Continua)

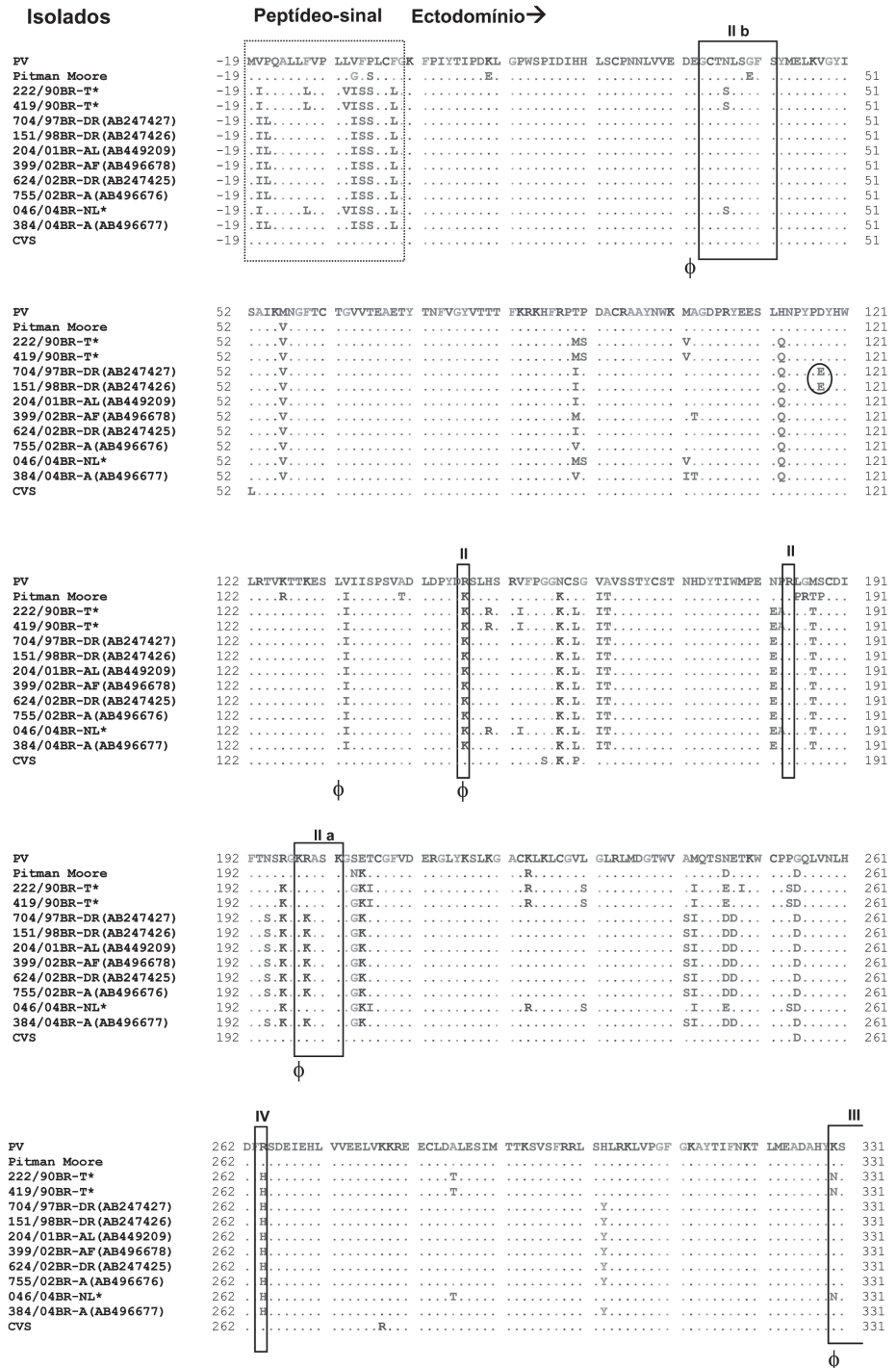
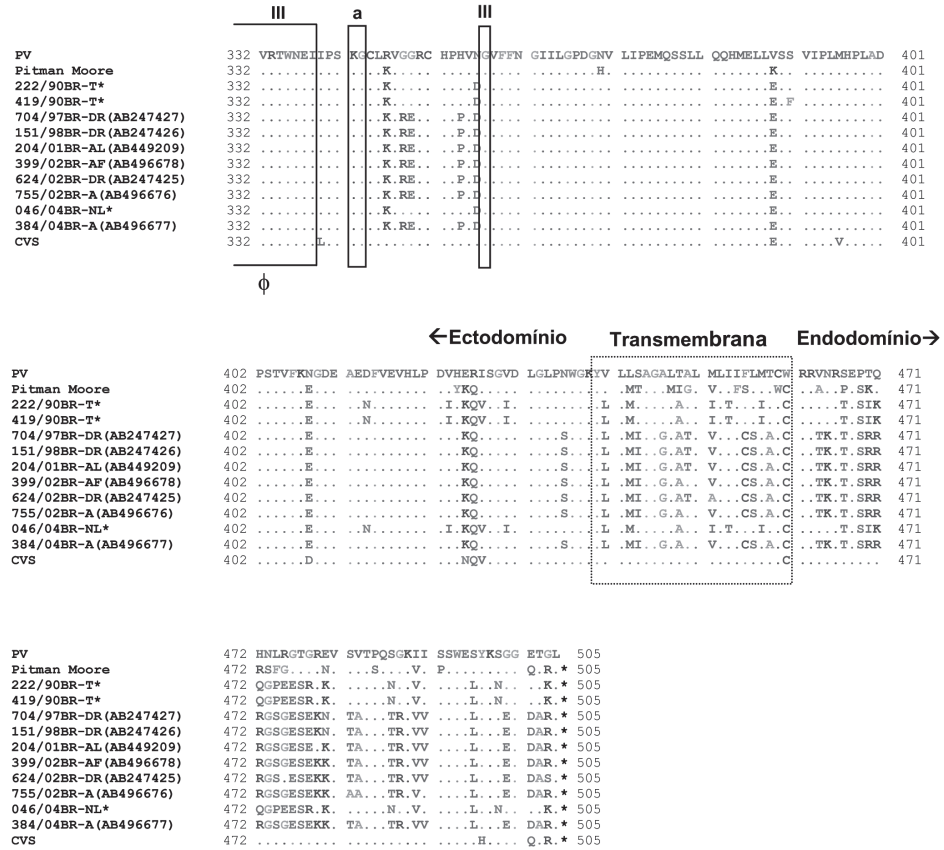


Figura 4- Alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína G dos isolados do vírus da raiva de morcegos e do vírus padrão CVS, PV e PM. Destaque em linha tracejada para a região do peptídeo-sinal e para o domínio transmembrana. Caixas de linha contínua indicam os principais sítios antigênicos e epítopos. Phi (φ) indica os resíduos envolvidos na patogenicidade. Círculo destaca a substituição presente na posição 118 dos isolados 704/97BR-DR e 151/98BR-DR – Rio de Janeiro – 2007-2008



(Conclusão)

Figura 4- Alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína G dos isolados do vírus da raiva de morcegos e do vírus padrão CVS, PV e PM. Destaque em linha tracejada para a região do peptídio-sinal e para o domínio transmembrana. Caixas de linha contínua indicam os principais sítios antigênicos e epitópos. Phi (φ) indica os resíduos envolvidos na patogenicidade. Círculo destaca a substituição presente na posição 118 dos isolados 704/97BR-DR e 151/98BR-DR – Rio de Janeiro – 2007-2008

Discussão e Conclusões

Um dos critérios de validação do teste NIH é a proteção de mais de 70% dos camundongos vacinados com a diluição 1:5⁸ - valor este que não foi alcançado nos ensaios imunológicos realizados com os isolados 704/97BR-DR, 151/98BR-DR, 399/02BR-AF e 624/02BR-DR, oriundos de morcegos hematófagos. Este resultado está em conformidade com o achado de Bernardi et al.¹⁴ para uma vacina antirrábica de uso veterinário importada, que não apresentou resultado satisfatório no teste CDC, quando este foi realizado com um isolado de morcego hematófago.

Utilizando a vacina antirrábica de uso humano produzida em células Vero, encontramos 100% de proteção dos camundongos para o teste NIH realizado com o vírus CVS e, dentre os desafios realizados com os isolados de morcego, a menor proteção encontrada foi de 43,8% para a diluição 1:5 da vacina, quando o isolado utilizado foi o 151/98BR-DR. Zanetti et al.¹⁵ avaliaram a atividade protetora da vacina Fuenzalida- Palácios modificada, utilizando como vírus-desafio (30 a 50 DL₅₀/0,03 mL) o vírus padrão CVS e outro, oriundo de morcego hematófago, nos testes de Habel e NIH, e verificaram que 94,4% dos camundongos foram protegidos pela vacina

diluída a 1:5, no desafio com a amostra CVS e apenas 36,2% dos camundongos foram protegidos quando o desafio foi realizado com a variante de morcego hematófago.

Em nosso trabalho, a dose de vacina aplicada nos camundongos foi cinco vezes maior que a utilizada por Dietzschold e Hooper¹⁶ e a dose do vírus-desafio foi cerca de um quinto inferior para os isolados de morcegos insetívoros, os quais apresentaram um percentual de proteção de 93,8% (222/90BR-T), 93,8% (419/90BR-T) e 100% (046/04BR-NL), enquanto estes autores observaram que 100% dos camundongos foram protegidos com a diluição 1:5 da vacina e 30% com a diluição 1:125. Pode-se concluir, então, que as diferenças de proteção observadas em nosso trabalho estão relacionadas com o isolado viral utilizado, em conformidade com a assertiva de Barth, Diderrich e Weineman¹⁷ e Zaneti et al.¹⁵. Em adição, para o ensaio imunológico realizado com os isolados 704/97BR-DR e 151/98BR-DR, relacionados quanto ao gene G e os únicos a apresentarem uma substituição de aminoácido em comum na posição 118 deste gene, verificou-se que, para o desafio com 31,62 DL₅₀ do isolado 704/97BR-DR, a DP₅₀ foi inferior à obtida com 50,69 DL₅₀ do isolado 151/98BR-DR.

As árvores filogenéticas dos isolados de morcego, quanto aos genes das proteínas N e G, apresentaram o padrão de agregação esperado, com a formação de dois grupos distintos denominados variante de morcego hematófago e variante de morcego insetívoro, em concordância com outros autores^{18,19}. Os isolados de morcegos *Artibeus sp.* segregaram com a variante *Desmodus rotundus* como encontrado em outros estudos^{20,21}, o que enfatiza a importância dos morcegos frugívoros como reservatório natural do vírus da raiva.

Em relação ao gene N, os isolados 704/97BR-DR e 151/98BR-DR, da Região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, formaram um agrupamento com isolados procedentes do Município de Quissamã, Norte do Estado, oriundos de morcegos *D. rotundus*, em 2006. Outros isolados das

mesmas regiões apresentaram diferenças no padrão de agrupamento, por estarem em bacias hidrográficas distintas²², mas este perfil não foi observado em nosso estudo, nem pelo realizado por Vieira (2007)²³. O contraste entre os agrupamentos da árvore filogenética construída foi observado entre os isolados das Regiões Noroeste e Sul, visto que o isolado 624/02BR-DR está agrupado com isolados do Município de Lindóia, na Região Norte do Estado de São Paulo.

Como em outros trabalhos^{24,25}, não foram encontradas diferenças temporais entre os isolados estudados. O isolado 046/04BR-NL, de 2004, se relaciona com o agrupamento formado pelos isolados 222/90BR-T e 419/90BR-T, de 1990, sustentado por um valor de *bootstrap* de 100, quanto aos genes da proteína G e da proteína N. Em adição, a substituição do aminoácido lisina (posição 330), envolvido na patogenicidade, por um resíduo de asparagina, foi encontrado nas sequências do gene da proteína G dos três isolados.

Uma correlação entre os dados imunológicos, genéticos e geográficos foi notada entre os isolados 704/97BR-DR e 151/98BR-DR, pois seus resultados no ensaio imunológico foram semelhantes e os mesmos estão intimamente relacionados quanto às suas sequências da proteína G e quanto à sua localização espacial, a noroeste do Estado do Rio de Janeiro e são, provavelmente, pertencentes ao mesmo surto. Estes isolados foram os únicos a apresentar a substituição de um ácido aspártico por um ácido glutâmico na posição 118 e os únicos em cujos ensaios imunológicos a vacina antirrábica de uso humano apresentou o mais baixo desempenho, podendo-se inferir que esta substituição pode ter alterado a antigenicidade dos isolados.

Em nosso estudo, a única substituição encontrada em um resíduo envolvido na patogenicidade viral está relacionada às três variantes de morcegos insetívoros e foi mesma substituição do isolado mutante desenvolvida por Coulon et al.²⁶ que, estudando um mutante do vírus CVS (RK-4), com a substituição do resíduo lisina (posição 330)

por uma asparagina, verificaram que o vírus mutante apresentou-se altamente patogênico para camundongos adultos. No ensaio biológico, verificou-se que a inoculação intracerebral dos camundongos com o isolado 222/90BR-T determinava sintomatologia clínica com quadro exacerbado de excitação e agressividade, diferente dos outros isolados.

Entretanto, em todos os ensaios imunológicos realizados com estes isolados (222/90BR-T, 419/90BR-T e 046/04BR-NL), o percentual de proteção dos camundongos vacinados com a vacina diluída a 1:5 foi superior a 90%, ressaltando a eficiência da neutralização viral conferida pelos anticorpos induzidos pela vacinação.

Immunological and genetic study of 10 bat rabies virus isolates from Rio de Janeiro State, Southeast Brazil

Abstract

In the present study we analyzed ten bats rabies viruses isolated from Rio de Janeiro State, focusing on its genetic characteristics from genes N and G, and also in the response of mice vaccinated with cell-culture rabies vaccine, produced with the Pitman-Moore strain, after viral challenge with bat rabies isolates, using an immunologic essay based on NIH vaccine potency test. The vaccine used conferred protection in more than 80% of the mice vaccinated with 1:15 vaccine dilution, after viral challenge. N gene genetic analysis divided the rabies virus isolates into haematophagous and insectivorous bat variants, with all isolates from *Artibeus sp.* frugivorous bats being clustered with the variant characteristic of the *Desmodus rotundus* vampire bat. Phylogenetic differences between isolates from Northeast Region and those from the Metropolitan and South Regions of Rio de Janeiro State were observed. The substitution of an aspartic acid to a glutamic acid found in the position 118 of G gene genetic characterization from samples 704/97BR-DR and 151/98BR-DR seems to be related to viral antigenicity. There were no time-related genetic differences between the studied samples. The vaccine employed was found with satisfactory protection against the majority of the isolates used.

Keywords:
Rabies virus.
Rabies vaccine.
Vaccine Potency.
Bats.
Phylogeny.

Referências

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO expert consultation on rabies**. Geneva: WHO Press, 2005. 121 p. (Technical Report Series, n. 931).
- 2 BRASS, D. A. **Rabies in bats: natural history and public health implications**. 1. ed. Connecticut: Livia Press, 1994. p. 131-147.
- 3 BRASIL. Ministério da Saúde. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no município de Portel-Pará, Março/Abril de 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 4, n. 6, p. 5, 2004.
- 4 ROSA, E. S. T. da; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C. de; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J. S.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUSA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. C. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1197-1202, 2006.
- 5 ÉSBERARD, C. Morcegos urbanos no Rio de Janeiro. In: KOTAIT, I.; TAKAOKA, N. Y.; PANACHAO, M. R. I.; SODRÉ, M. M. **Manejo de quirópteros em áreas urbanas**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. p. 28-32. (Manual Técnico do Instituto Pasteur, 7).
- 6- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies vaccines. **Weekly Epidemiological Record**, v. 14, n. 77, p. 109-120, 2002.
- 7 COSTA, W. A.; ÁVILA, C. A.; VALENTINE, E. J. G.; REICHMANN, M. L. A. B.; CUNHA, R. S.; GUIDOLIN, R.; PANACHÃO, M. R. L.; OMOTO, T. M.; BOLZAN, V. L. **Profilaxia da raiva humana**. 2. ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. p. 43, (Manual Técnico do Instituto Pasteur, 4).

- 8 WILBUR, L. A.; AUBERT, M. F. A. Épreuve d'activité NIH. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratoire techniques en la rage**. 5. ed. Genève: Organisation Mondiale de la Santé, 1999. p. 366-374.
- 9 REED, L. J.; MÜENCH, H. A. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.
- 10 SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, I. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 7, p.747-753, 2004.
- 11 SATO, G.; TANAB, G. O.; SHOJI, Y.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SATO, T.; SAKAI, T. Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, p. 267-273, 2005.
- 12 HILLS, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- 13 TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.
- 14 BERNARDI, F.; GOMES, A. A. B.; IT, F. H.; RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; SAKAMOTO, S. M.; MAIORKA, P. C. Biological and immunological studies of five Brazilian rabies virus isolates. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 4, p-307-312, 2005.
- 15 ZANETTI, C. R.; FRANCO, M. T. de; VASSÃO, R. C.; PEREIRA, C. A.; PEREIRA, O. A. C. Failure of protection induced by a brazilian vaccine against brazilian wild rabies viruses. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1745-1756, 1998.
- 16 DIETZSCHOLD, B.; HOOPER, C. Human diploid cell culture rabies vaccine (HDCV) and purified chicken embryo cell culture rabies vaccine (PCECV) both confer protective immunity against infection with the silver-haired bat rabies virus strain (SHBRV). **Vaccine**, v. 16, n. 17, p. 1656-1659, 1998.
- 17 BARTH, R.; DIDERRICH, G.; WEINMANN, E. NIH test: a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. **Vaccine**, v. 6, p. 369-377, 1988.
- 18 KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, 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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.
- 19 KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; KATO, M.; ITOU, I.; CUNHA, E. M.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic diversity of bat rabies in Brazil. **Archives of Virology**, v. 152, p. 1995-2004, 2007.
- 20 LANGONI, H.; HOFFMANN, J. L.; MENOZZI, B. D.; SILVA, R. C. da. Morcegos não-hematófagos na cadeia epidemiológica de transmissão da raiva. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 43-46, 2007.
- 21 ALBAS, A.; SOUZA, E. A. N. de; LOURENÇO, R. A.; FAVORETTO, S. R.; SODRÉ, M. M. Perfil antigênico do vírus da raiva isolado de diferentes espécies de morcegos não hematófagos da região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 15-17, 2009.
- 22 ROMIJN, P. C.; VAN DER HEIDE, R.; CATTANEO, C. A. M.; SILVA, R. C. F.; VAN DER POEL, W. H. M. Study of Lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 1, p. 81-86, 2003.
- 23 VIEIRA, L. F. P. **Caracterização molecular de vírus da raiva (Lyssavirus-Rhabdoviridae) isolados de espécimes clínicos de morcegos hematófagos Desmodus rotundus no Norte e Noroeste Fluminense**. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2007.
- 24 HEINEMANN, M. B. **Análise do polimorfismo do gene N de amostras de vírus da raiva isoladas no Estado de São Paulo**. 2000. 56 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- 25 KIMURA, L. M. S. **Epidemiologia molecular de vírus da raiva em mamíferos silvestres e domésticos do Brasil**. 2006. 94 f. (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.
- 26 COULON, P.; TERNAUX, J.-P.; FLAMAND, A.; TUFFEREAU, C. An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 273-278, 1998.