

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

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS E  
DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE  
ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA RAIVA.**

**Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista**

**Porto Alegre**

**2011**

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

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS E  
DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE  
ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA RAIVA.**

**Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista`\***

**Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias na área de Medicina Veterinária  
Preventiva – Virologia Veterinária**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle**

**Porto Alegre**

**2011**

**\* Médica Veterinária, MsC**

**B385c Batista, Helena Beatriz Carvalho Ruthner**

Caracterização antigênica e molecular de amostras e desenvolvimento de testes sorológicos para detecção de anticorpos para o vírus da raiva / Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista - Porto Alegre: UFRGS, 2011.

102f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2011. Paulo Michel Roehle, Orient.

**1. Virologia veterinária 2. Raiva : vírus 3. Testes sorológicos I. Roehle, Paulo Michel, Orient. II. Título**

**CDD 619.4**

**Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista**

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS E  
DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE  
ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA RAIVA.**

**Aprovada em 17 de fevereiro de 2011**

**APROVADA POR**

---

**Prof. Dr. Paulo Michel Roehle**  
**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Amauri Braga Simoneti**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores**  
**Membro da Comissão**

---

**Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso**  
**Membro da Comissão**

## AGRADECIMENTOS

A minha família, sem a qual a realização desta tese não seria possível. Muito obrigada pelo apoio incondicional e pelo incentivo, decisivos....

O meu profundo agradecimento ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Michel Roehe, pela grande oportunidade de aprendizado, pelo exemplo de dedicação à virologia e pela amizade nos momentos difíceis, inerentes ao desenvolvimento de uma tese de doutorado.

À Ana e ao Frans pelo apoio técnico e amizade.

Ao Dr. Sylio Petzhold que abriu as portas de seu laboratório e juntamente com sua equipe me ajudou e me apoiou.

À Dra Susi Pacheco pela colaboração, disponibilidade na execução dos projetos e pelos ensinamentos sobre os morcegos.

Aos colegas recentes e os “antigos” da equipe de virologia (EVI-UFRGS/IPVDF). A formação de uma equipe é essencial para o êxito da pesquisa.

Aos funcionários do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desiderio Finamor

Aos funcionários do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do sul.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Este trabalho é fruto da colaboração de muitas pessoas, envolvidas direta ou indiretamente nele e este é o momento de agradecer:

***MUITO OBRIGADA!!!!***

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> -----	<b>07</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> -----	<b>08</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> -----	<b>09</b>
<b>RESUMO</b> -----	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> -----	<b>12</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> -----	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> -----	<b>26</b>
<b>3. CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA RAIVA</b> -----	<b>27</b>
3.1.1- Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant. -----	<b>28</b>
3.1.2- Registro de <i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae) positivo para o vírus rábico no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.-----	<b>39</b>
<b>4. CAPÍTULO 2- DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLOGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA RAIVA</b> -----	<b>50</b>
4.2.1- Immunoperoxidase inhibition assay (IIA) for rabies antibody detection.-----	<b>51</b>
4.2.2- A sandwich enzyme linked immunosorbent assay for rabies antibody detection in sera of different species.-----	<b>65</b>
<b>5. DISCUSSÃO GERAL</b> -----	<b>77</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>82</b>
<b>7. ANEXOS</b> -----	<b>98</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Membros do gênero <i>Lyssavirus</i> : classificação, abreviação, vetores/reservatórios e distribuição geográfica.-----	<b>13</b>
<b>Tabela 2:</b> Variantes antigênicas do genótipo 1 do vírus da raiva, já identificadas no Brasil.-----	<b>18</b>
<b>Table 3:</b> Monoclonal antibody profile of reactivity of rabies virus (RV) isolate 183-07 and other isolates representative of viruses of bat and canine origin.	<b>37</b>
<b>Table 4:</b> Sizes of fragments obtained after restriction endonuclease analysis (REA) on amplicons from RV isolates of different reservoirs. -----	<b>38</b>
<b>Tabela 5:</b> Perfil antigênico da amostra de vírus rábico isolado do morcego frugívoro <i>Artibeus lituratus</i> e outros isolados representativos do vírus.-----	<b>49</b>
<b>Tabela 6:</b> Tamanho dos fragmentos obtidos após a análise com enzimas de restrição (REA) do amplicon de amostras do vírus da raiva isoladas de diferentes hospedeiros. -----	<b>49</b>
<b>Tabela 7:</b> Comparison between the immunoperoxidase inhibition assay (IIA) and the simplified fluorescence inhibition microtest (SIMFT) for detection of rabies antibodies in human sera .-----	<b>64</b>
<b>Tabela 8:</b> Species of origin of serum samples used in the comparison between the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) and the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN).-----	<b>68</b>
<b>Tabela 9:</b> Comparison between results obtained with the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) and the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) at detection of rabies antibodies in 128 sera from different species. ---	<b>71</b>
<b>Tabela 10:</b> Positive results obtained with the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) and the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) at detection of rabies antibodies . -----	<b>72</b>
<b>Tabela 11:</b> Species of origin and number of serum samples tested for rabies antibodies by the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA); n= 738..-----	<b>73</b>

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1:** Esquema demonstrando os principais ciclos epidemiológicos da raiva, suas possíveis inter-relações e seus principais vetores. ----- **21**
- Figura 2:** Comparison between the first 281 nucleotides of the rabies virus (RV) nucleoprotein (N) gene of isolate 183-07 and seven other RV sequences available at Genbank. ----- **36**
- Figura 3:** Exemplar de *Artibeus lituratus*, mostrando as listras brancas faciais e a folha nasal, características da espécie. ----- **48**
- Figura 4:** Mapa do estado do Rio Grande do Sul e localização dos municípios de Dois Irmãos e Caxias do Sul. ----- **48**
- Figura 5:** Detalhe do crânio de morcego, mostrando a pequena incisão feita para retirar o cérebro sem danificar a estrutura óssea. ----- **48**



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABL - “Australian Bat Lyssavirus”
- ABTS – 2,2’ Azinobis, 3 Ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
- AcM (s) ou Mab - anticorpo (s) monoclonal (is)
- AEC – 3-amino-9-ethylcarbazole
- ARAV – Aravan Virus
- Arg - Arginina
- BHK - “Baby Hamster Kidney”
- bp - “base pair”
- CDC – “Centers for Disease Control and Prevention”
- CER - “Chicken Embrio Rellated”
- CEVS/SES – Centro de Vigilância Sanitária/ Secretaria Estadual da Saúde
- DNA- “Desoxiribonucleic acid”
- CVL ou VLA – “Central Veterinary Laboratory” ou “Veterinary Laboratory Agency”
- CVS - “Challenge Virus Standard”
- DICC<sub>50</sub> - doses infectantes em 50% do cultivo celular
- DUVV – Duvenhage Virus
- EBL 1 - “European Bat Lyssavirus” 1
- EBL 2 - “European Bat Lyssavirus” 2
- ELISA “Enzyme-link immunosorbent assay”
- E-MEM - “Eagle’s Minimum Essential Medium”
- EU/ml – “Equivalent units per ml”
- FAVNT – Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test
- FIMT - “Fluorescence Inhibition Microtest”
- FITC - “Fluorecein Isotiocianate Conjugated”
- G – glicoproteína
- ICTV – International Comitee on Taxonomy of Viruses
- IFD ou DFAT - imunofluorescência direta
- IFI ou IIF- imunofluorescência indireta
- IIA – “Immunoperoxidase Inhibition Assay”
- IPVDF – Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
- IRKV – Irkut Virus
- IU/ml – “International units per ml”

KHUV – Khujand Virus

Kb – kilobase

KDa - Kilodalton

L - polimerase viral

LBV – Lagos-Bat-Virus

LD - “Lethal Doses”

mRNAs – RNAs mensageiros

MIT – “Mouse intracerebral test”

MNT – “Mouse neutralization test”

MOK – Mokola Virus

M - proteína de preenchimento ou matriz

N- nucleoproteína

OIE – Organização Internacional de Epizootias

OMS ou WHO – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Panamericana da Saúde

P - fosfoproteína

PBS - “Phosphate-buffered saline”

PNCRH – Programa Nacional de Controle da Raiva Herbívora

PV - Pasteur vírus

REA – Restriction Enzyme Analyses

RFFIT – “Rapid Fluorescent Focus Inhibition test”

RNA- “Ribonucleic acid”

RT-PCR – “Reverse-transcriptase Polymerase chain reaction”

S-ELISA – “Sandwich Enzyme Immunosorbent Assay”

SFIMT – “Simplified Fluorescence Inhibition Microtest”

SNC - sistema nervoso central

TCID - “Tissue Culture Infectious Doses”

VR, RV ou RABV - vírus da raiva

WCBV – West Caucasian Bat Virus

## RESUMO

Esta tese compreende estudos sobre diagnóstico, caracterização antigênica e molecular de amostras do vírus da raiva e sobre o desenvolvimento de testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o vírus rábico. O primeiro capítulo descreve dois casos de raiva no Estado do Rio Grande do Sul (RS). O primeiro trabalho do primeiro capítulo descreve a ocorrência de raiva em um canino no município de Tapes, leste do RS. Após a confirmação do diagnóstico, a amostra de vírus isolada foi submetida à caracterização antigênica e molecular. Tal amostra apresentava características compatíveis com amostras de vírus rábico isoladas de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*. Portanto, o primeiro caso de raiva canina no RS após 19 anos, ocorreu devido a um contato incidental entre um morcego não hematófago e o canino infectado. Assim, o status de região livre de raiva urbana pode ser mantido no Estado. O segundo trabalho do primeiro capítulo descreve a primeira ocorrência no RS de raiva em morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus*. Neste caso, a amostra isolada apresentou características de amostras isoladas de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*. A identificação de vírus rábico em um morcego frugívoro, com tal perfil, não representa fato novo na história recente da raiva, mas a descrição deste caso ilustra que a raiva em morcegos frugívoros no RS apresenta características semelhantes à raiva em morcegos frugívoros de outras regiões do Brasil e sugere que o mesmo foi contaminado devido ao contato com morcegos hematófagos. Com o objetivo de permitir o monitoramento sorológico da raiva em morcegos e a identificar novos potenciais reservatórios do vírus, no segundo capítulo desta tese é reportado o desenvolvimento de dois testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra raiva. O primeiro teste desenvolvido é a inibição da imunoperoxidase (“immunoperoxidase inhibition assay”; IIA), que foi testada frente a 422 amostras de soros humanos. A IIA foi muito eficiente, tendo demonstrado uma acurácia de 97.63%. Esta técnica provavelmente poderá ser utilizada para detecção de anticorpos contra raiva em outras espécies, embora no presente estudo tenha sido avaliada apenas com soros humanos. Com o objetivo de pesquisar anticorpos contra raiva em diferentes espécies animais utilizando pequenos volumes de soro foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático do tipo “sandwich” (“sandwich enzyme linked immunosorbent assay”; S-ELISA). O S-ELISA foi inicialmente comparado com um teste padrão FAVN (Fluorescent Antibody Vírus Neutralization test) e a seguir empregado na pesquisa de anticorpos em soros de diferentes espécies, incluindo morcegos, sagüis, raposas, felinos silvestres, guaxinis, quatis, bovinos, camundongos e humanos. Os resultados mostraram que o S-ELISA foi eficiente na detecção de anticorpos contra o vírus da raiva em diferentes espécies, com uma acurácia de 87,5%. A caracterização de amostras de vírus rábico em situações epidemiológicas específicas, assim como o desenvolvimento de testes sorológicos a fim de identificar anticorpos em distintas espécies e identificar novos possíveis reservatórios para raiva, contribuirão para o maior conhecimento da biologia da raiva na natureza, particularmente em nosso Estado, possibilitando assim a tomada de medidas de controle mais adequadas.

**Palavras-chave:** vírus da raiva, caracterização, IIA e S-ELISA.

## ABSTRACT

*This thesis describes studies about diagnosis, antigenic and molecular characterization of rabies virus strains and about serological assays development for antibodies against rabies virus detection. The first chapter describes two cases of rabies in State of Rio Grande do Sul (RS). This first work of the first chapter on this thesis, describes the canine rabies in Municipality of Tapes, east of RS. After the diagnosis confirmation, the rabies virus strain was submitted to antigenic and molecular characterization. The sample shown similar characteristics with rabies virus isolates from insectivorous bats *Tadarida brasiliensis*. Thus, the first canine rabies in RS after 19 years occurred by an incidental contact between the contaminated canine and a non-haematophagous bat. In view of that, the status of urban rabies free of the area should not be compromised. The second work of first chapter describes the first occurrence in RS of rabies in frugivorous bats *Artibeus lituratus*. In this case, the isolated sample shown characteristics similar to characteristics from haematophagous bats *Desmodus rotundus*. The rabies virus identification in a frugivorous bat with this profile, does not represent a new fact in the recent history of rabies, but the description of this case illustrates that the rabies in frugivorous bats in RS has similar characteristics to rabies in frugivorous bats in other regions of Brazil and suggests that it was contaminated due to contact with haematophagous bats. With the purpose to allow the serological monitoring of rabies in bats and identify new potential reservoirs of the virus, in the second chapter of this thesis is reported the development of two serological tests for detection of antibodies against rabies. The first developed assay is the immunoperoxidase inhibition assay (IIA), that was tested with 422 sera from humans. The IIA was very efficient, with 97.63% of accuracy. This assay probably can be used to antibodies detection against rabies in other species, in despite of the present study, it was tested only with sera from humans. With the aim to research rabies antibodies in different animal species with small volume of serum, was developed the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA). The S-ELISA was initially compared with the gold standard test Fluorescent Antibody Virus Neutralization test and after used to search antibodies in sera from different species including bats, marmosets, foxes, wild felines, raccoons, coatis, bovines, mices and humans. The S-ELISA was efficient to detect antibodies in different species with 87.5% of accuracy. The characterization of rabies virus strains in specific epidemiological situations as well as the serological assays development to identify antibodies in distinct species and identify new potential rabies reservoirs for rabies, contribute to greater understanding of the biology of rabies in nature, particularly in our State, allowing the taking of appropriate control measures.*

**Key words:** rabies virus, characterization, IIA and S-ELISA.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 O vírus rábico:

O vírus da raiva (RABV) pertence ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*. O RABV corresponde ao genótipo 1 deste gênero, que inclui ainda os denominados “vírus relacionados à raiva” (genótipos 2 até 7). O genótipo 1 dos *Lyssavirus* apresenta distribuição mundial e até o momento é o único já identificado no Brasil. Os demais genótipos já identificados até o momento e sua respectiva distribuição estão descritos na tabela 1, de acordo com o ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).

Tabela 1: Membros do gênero *lyssavirus*: classificação, abreviação, vetores/reservatórios e distribuição geográfica.

Espécies	Abreviação	Sorotipo	Genótipo	Vetor/Reservatório	Distribuição
Lyssavirus (Vírus da raiva)	RABV	1	1	Carnívoros/ Morcegos	Mundial
Lagos-Bat- Virus	LBV	2	2	Morcegos Frugívoros (Megachiroptera)	África
Mokola Virus	MOKV	3	3	?	África
Duvenhage Vírus	DUVV	4	4	Morcegos insetívoros	África
European Bat Lyssavirus 1	EBLV 1	?	5	Morcegos insetívoros ( <i>Eptesicus serotinus</i> )	Europa
European Bat Lyssavirus 2	EBLV 2	?	6	Morcegos Insetívoros ( <i>Myotis</i> sp)	Europa
Australian Bat Lyssavirus	ABLV	?	7	Morcegos Frugívoros e insetívoros (Megachiroptera e Microchiroptera)	Austrália
Aravan Virus	ARAV	?	?	Morcegos Insetívoros	Ásia Central
Khujand Virus	KHUV	?	?	Morcegos Insetívoros	Ásia Central
Irkut Vírus	IRKV	?	?	Morcegos insetívoros	Sibéria
West Caucasian Bat Virus	WCBV	?	?	Morcegos Insetívoros	Cáucasio

Fonte: ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).

O RABV é um vírus com genoma RNA de fita simples, não segmentado com polaridade negativa, envelopado e tamanho aproximado de 12 Kb e massa molecular de  $4,6 \times 10^6$  KDa (SMITH, *et al.*, 1996; WUNNER, 1991). A partícula completa do RABV (virion) apresenta uma forma característica semelhante a uma bala de revólver, com um diâmetro de aproximadamente 75 nm e comprimento de 180 nm (DAVIES, *et al.*, 1963).

O vírion apresenta-se como um denso cilindro formado pelo genoma disposto em formato de mola e envolto em uma proteína denominada nucleoproteína (N); este conjunto forma um nucleocapsídeo helicoidal, com o RNA e a proteína N fortemente unidos (BANERJEE, *et al.*, 1987; ISENI, *et al.*, 1998). O nucleocapsídeo e algumas moléculas de outras três proteínas estruturais (P, M e L) são circundados por um envelope, o qual é derivado das membranas celulares. Neste envelope estão inseridas moléculas de uma glicoproteína trimérica, denominada “G”, cujas moléculas o atravessam e são projetadas para a parte externa do vírion (BANERJEE, *et al.*, 1987). Devido ao envelope lipoprotéico, o RABV torna-se sensível a detergentes e solventes lipídicos (éter, clorofórmio), tendo baixa resistência fora do hospedeiro.

## 1.2. Proteínas virais:

Cinco proteínas são codificadas pelo genoma do RABV:

1- Glicoproteína (G): com 525 aminoácidos, 65-70 KDa, a glicoproteína é responsável pela adsorção do vírus à célula hospedeira e pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática. Além disso, G é a principal responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, especialmente por sua porção externa ao envelope, denominada domínio antigênico ou ectodomínio (MARTORELLI, *et al.*, 1995; WIKTOR, & KOPROWSKI, 1978). Alguns sítios de G, como a Arg<sup>333</sup>, estão relacionados com a patogenicidade da amostra (DIETZSCHOLD, *et al.*, 1987). A glicoproteína G é ainda capaz de estimular, em conjunto com as proteínas N e P, células T auxiliares e citotóxicas, gerando uma resposta imune celular, além de participar do processo de brotamento de novos vírions (KAWANO, *et al.*, 1990; TORDO, & POCH, 1988). A expressão da glicoproteína G parece estar inversamente associada à indução de apoptose e à inibição da atividade da proteína N no transporte axoplásmico, ou seja, quanto maior a expressão de G em determinada amostra viral, mais apoptose e maior inibição do transporte viral nos neurônios, resultando em menor patogenicidade (MORIMOTO, *et al.*, 1999).

2- Nucleoproteína (N): com 450 aminoácidos, 58-62 KDa a proteína N é capaz de induzir anticorpos neutralizantes, apesar da glicoproteína G ser imunodominante (WUNNER, 1991). A nucleoproteína é a mais conservada dentre as proteínas dos lissavírus. Como citado anteriormente, N forma o capsídeo e está intimamente associada ao RNA viral, protegendo-o da ação de ribonucleases (TORDO, *et al.*, 1986). N desempenha outras atividades importantes, como a participação ativa na encapsidação de novas moléculas de RNA genômico sintetizadas, na transcrição do genoma viral e no transporte axoplásmico intraneuronal (MORIMOTO, *et al.*, 1999). Além disso, a proteína N apresenta regiões que são importantes epitopos para o reconhecimento de linfócitos T (DIETZSCHOLD, *et al.*, 1987).

3- Fosfoproteína (P): com 298 aminoácidos, 35-40 KDa, P é a proteína menos conservada entre os lissavírus; encontra-se associada ao ribonucleocapsídeo e interage com L. A proteína P liga-se à dineína intracitoplasmática e está envolvida no transporte axonal do vírus.

4- Proteína da matriz (M): com 203 aminoácidos, 22-25 KDa, a proteína da matriz preenche o espaço entre o ribonucleocapsídeo e o envelope. É a proteína que promove a montagem das partículas, aproximando membranas, RNP e G, exercendo um papel ativo no brotamento dos novos vírions (MEBATSION, *et al.*, 1996).

5- RNA polimerase, RNA viral-dependente (L): com 2128 aminoácidos, 190 KDa, a L é uma subunidade do complexo que forma a RNA polimerase, que juntamente com P e N formam o conglomerado que transcreve o genoma viral (BANERJEE, *et al.*, 1987). Além dessa, desenvolve várias outras atividades enzimáticas, como a formação do “cap”, metilação, poliadenilação, atividade de proteína quinase, além de estar envolvida na inicialização da cadeia de RNA (TORDO, *et al.* 1986). A proteína L necessita interagir com P para tornar-se ativa (MARSTON, *et al.*, 2007).

Além das cinco proteínas, o RABV apresenta ainda duas regiões intergênicas não codificantes: uma delas está situada entre os genes que codificam M e G e a outra entre os genes que codificam G e L. Esta última foi previamente chamada “pseudogene”, simbolizado pela letra "psi" ( $\psi$ ), mas trata-se de uma região não codificante (TORDO. 1986 e 1996; WUNNER, 1991).

### 1.3. Replicação viral:

A G é responsável pela adsorção, fase inicial da replicação viral. Inicialmente trímeros de G interagem com os receptores celulares e levam à fusão e internalização

dos vírions (COLL, *et al.*, 1995; COX, *et al.*, 1977). Aparentemente não há um receptor específico para o RABV; possivelmente diferentes células utilizam diferentes tipos de receptores para permitir a penetração do vírus. Após a adsorção à célula hospedeira, o vírion penetra na célula por fagocitose, sendo englobado por uma vesícula formada às expensas da membrana celular, vesículas estas ricas em uma proteína denominada clatrina. Eventualmente, lisossomos fundem-se à vesícula contendo o vírion, liberando a RNP no citoplasma celular e permitindo que seja iniciado o processo de replicação (THOULOZE, *et al.*, 1998).

Já no interior da célula, uma vez que o genoma apresenta polaridade negativa, este deve ser inicialmente transcrito para dar início à produção de proteínas. Para tanto, a RNA polimerase viral transcreve o genoma em um RNA líder e cinco mRNAs, todos os cinco com “cap” e poli-adenilados, tal como os mRNA celulares. A transcrição diminui sua eficiência em cerca de 30 % nas junções dos genes N-NS, NS-M e M-G, resultando em um efeito cumulativo na expressão gênica, ou seja, a expressão é mais eficiente na extremidade 3’ do genoma (IVERSON, & ROSE, 1981). Estes, por sua vez, são traduzidos nas proteínas N, P, M, G e L, em ribossomos livres no citoplasma. A proteína G, que requer glicosilação, recebe seus carboidratos no retículo endoplasmático rugoso e é então transportada via aparato de Golgi para a membrana citoplásmica (THOULOZE, *et al.*, 1998).

Por outro lado, é necessário que ocorra a replicação do genoma viral para formar os novos vírions. Isso se dá somente após a tradução dos mRNAs. A proporção entre a quantidade de RNA e da proteína N no interior do citoplasma regulam o processo de passagem do processo de transcrição para replicação. Sendo assim, havendo muita proteína produzida, o processo é parado e a replicação do genoma é iniciada. O primeiro passo na replicação é a síntese de cópias de polaridade positiva (anti-genoma) de todo o genoma viral. Para que estas sejam geradas, os sinais de transcrição representados por códons de parada e continuação de leitura são ignorados; a RNA polimerase reconhece a extremidade 3’ do genoma e sintetiza uma cópia complementar ao mesmo, em todo seu comprimento. Estas cópias positivas servirão de molde para a síntese de novos genomas (de polaridade negativa), que irão fazer parte dos novos vírions a serem formados durante a montagem, um complexo formado pelas proteínas N, P e L promove a encapsidação dos novos genomas. A proteína M envolve a RNP; esse complexo vai para uma área da membrana plasmática (ou vesículas membranosas internas) e M inicia o “enovelamento” da partícula, conferindo-lhe o formato de “mola” que caracteriza a



disposição helicoidal da RNP. A seguir, as partículas ligam-se à membrana celular, que dará origem ao envelope no qual foram inseridas moléculas da glicoproteína G; tem início o processo de liberação dos novos vírions, por brotamento. Tal processo, não lisa as células infectadas. Por outro lado, alerta para o papel do sistema imune do hospedeiro, que parece desempenhar função importante na evolução da infecção (SUGAMATA, *et al.*, 1992).

#### 1.4. Variabilidade entre as amostras do vírus da raiva

O RABV é considerado um vírus estável antígenicamente, o que pode ser evidenciado pelo fato de que ainda hoje, algumas vacinas utilizam amostras derivadas do vírus isolado por Pasteur no final do XIX. Os métodos disponíveis naquela época, baseados essencialmente na inoculação em animais de experimentação, eram pouco sensíveis para a identificação de variações mais sutis.

Diferenças antigênicas entre amostras deste vírus já eram apontadas nos estudos de Fuenzalida e Palácios em 1955; já em 1970, Shope *et al.* demonstraram que amostras de RABV eram diferenciáveis sorologicamente. Atualmente, sabe-se que a estabilidade do RABV não é absoluta. A ocorrência de variações antigênicas tornou-se evidente com o advento dos anticorpos monoclonais (AcMs) nos anos 80 (DIETZSCHOLD, *et al.*, 1987; EAST, *et al.*, 2001; WIKTOR & KOPROWSKI 1978). Tais estudos mostraram que diferentes hospedeiros naturais eram infectados por amostras de vírus, com características antigênicas particulares, sugerindo uma possível adaptação de determinadas amostras de vírus a um hospedeiro específico. Estas amostras com características antigênicas particulares foram denominadas “variantes”.

As variantes antigênicas são bastante estáveis, uma vez que a passagem de uma amostra de RABV em outro hospedeiro não altera as características antigênicas desta amostra (LODMELL, *et al.*, 1993). Um exemplo que elucida esta estabilidade é o fato de que geralmente amostras de RABV isoladas de bovinos apresentam características antigênicas semelhantes às características antigênicas de morcegos hematófagos.

A identificação de variantes antigênicas passou a ser realizada através da prova de imunofluorescência indireta (IFI). Para tanto, lâminas com o RABV são fixadas em acetona e submetidas à reação com painéis de AcMs (DELPIETRO, *et al.*, 1997; DIETZSCHOLD, *et al.*, 1983). O comitê de “experts” em raiva da OMS, referendado pela OPAS, recomenda a utilização de um painel de AcMs para o estudo de amostras isoladas nas Américas (DIETZSCHOLD, *et al.*, 1983). Tal painel é composto por oito

AcMs preparados contra diversas amostras do RABV, fornecido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA e são fornecidos para laboratórios de referência em diversos países. Com esse painel foram identificadas no Brasil até o presente as variantes descritas na tabela 2, além de algumas amostras com perfis atípicos que não puderam ser enquadradas na classificação adotada, estas, provavelmente outros exemplos do processo adaptativo (FEKADU, *et al.*, 1972).

Tabela 2: Variantes antigênicas do genótipo 1 do vírus da raiva, já identificadas no Brasil.

Variante	Hospedeiro	Perfil antigênico
2	Caninos	Raiva urbana
3	Morcegos hematófagos ( <i>Desmodus rotundus</i> ) e Bovinos	Raiva herbívora
4	Morcegos Insetívoros ( <i>Tadarida brasiliensis</i> )	Morcegos Insetívoros
5	Cachorro do mato ( <i>Cerdocyon thous</i> )	Morc. Hematófagos na Venezuela
6	Morcegos Insetívoros ( <i>Lasiurus cinereus</i> )	Morcegos Insetívoros

No final dos anos 80 foi iniciado na Inglaterra, no então Central Veterinary Laboratory (CVL) hoje Veterinary Laboratory Agency (VLA), um trabalho buscando o desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra antígenos dos demais genótipos do gênero *Lissavirus* (KING, 1991). Para tanto, amostras de distintos lissavírus reconhecidos à época foram utilizadas. Esse trabalho originou um amplo painel de AcMs, dentre os quais foram selecionados 14 AcMs anti-N, preparados a partir de amostras dos vírus Lagos bat, Mokola, Duvenhage e European Bat Lyssavirus. Em função de que o painel cedido pela OPAS não se encontrava disponível para instituições estaduais de diagnóstico (como é o caso do IPVDF), pelo início dos anos 90 foi iniciado um trabalho de análise antigênica de amostras de RABV ocorrentes no Rio Grande do Sul com o painel cedido pelo então CVL. No IPVDF tal painel foi ampliado pela inclusão de outros dois AcMs preparados localmente contra antígenos da amostra CVS de RABV (SCHAEFER, *et al.*, 2005). Este painel permite a diferenciação entre as duas variantes envolvidas nos principais ciclos epidemiológicos da raiva: variantes de caninos domésticos e variantes de morcegos, correspondentes às variantes 2 e 3 no painel do CDC (BATISTA, *et al.*, 2008).

Com a evolução dos métodos de diagnóstico molecular, a caracterização genômica das variantes passou a ser empregada na maioria dos estudos de análise de variantes. Para tanto, o RNA viral é extraído e submetido à transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase/RT-PCR (BERNARDI, *et al.*, 2005; ITO, *et al.*, 2001 e 2003). Para a identificação das variantes genotípicas, inicialmente eram utilizadas enzimas de restrição (SCHAEFER, *et al.*, 2005), os quais tem sido substituídos pelo sequenciamento genômico e posterior análise filogenética (KOBAYASHI, *et al.*, 2006). Diante da importância tanto para a epidemiologia, como para a patogenia do vírus, a identificação destas variantes (antigênicas ou genotípicas) tem sido o foco da atenção de um grande número de pesquisadores (BERNARDI, *et al.*, 2005; CUNHA, *et al.*, 2005; DAVID, *et al.* 2007; CASTILHO, *et al.*, 2008; BATISTA, *et al.*, 2009).

#### 1.5. Patogenia e sinais clínicos:

A infecção pelo RABV, geralmente ocorre pela inoculação do vírus por via percutânea, através da mordida de animais infectados. O período de incubação da raiva é muito variável após infecções naturais, mais comumente este período dura entre 2 e 12 semanas. Diversos fatores podem estar envolvidos no tempo de evolução da infecção, como o local da mordida, a carga viral presente na ocasião da agressão, a variação na suscetibilidade da espécie envolvida e a imunidade do animal agredido.

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

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

glândulas adrenais, tecidos neuroepiteliais dos ureteres, bexiga e uretra (CHARLTON, *et al.*, 1988). A replicação do vírus rábico, nas glândulas salivares e subsequente excreção através da saliva, representa o principal mecanismo de disseminação e perpetuação do vírus na natureza (SCHNEIDER, *et al.*, 1991).

A apresentação clínica da raiva é muito variada, porém existem duas formas clássicas da doença: as formas paralítica e furiosa, as quais são consequentes à localização das lesões no SNC. Os sinais clínicos tornam-se aparentes após o envolvimento do SNC. A forma paralítica da raiva é mais comum em bovinos, já a forma furiosa, é mais comum em caninos. O início do quadro, ou fase prodrômica, pode anteceder as manifestações mais típicas e revelar sinais pouco sugestivos.

Os sinais da raiva paralítica incluem claudicação sutil dos membros posteriores, ataxia e subsequente paresia dos membros pélvicos. Além disso, sinais de comprometimento dos nervos lombares e sacrais podem ocorrer, provocando constipação, tenesmo, parafimose em machos e gotejamento de urina. A morte do animal ocorre devido ao comprometimento dos centros nervosos vitais (REBUHN, 2000).

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

Em outras espécies, a raiva deve ser lembrada sempre que qualquer tipo de comportamento sugestivo de comprometimento neurológico for evidenciado.

#### 1.6. Epidemiologia:

A raiva foi erradicada em alguns Países como a Inglaterra, Irlanda, Japão e Países Escandinavos, porém a doença está presente em todos os continentes exceto na Austrália e Antártica, apresentando distribuição mundial. Nas Américas, até o momento, a raiva é endêmica e somente o genótipo 1 dos lissavirus (vírus da raiva clássica) foi identificado.

Na natureza, o RABV se mantém pelos “ciclos epidemiológicos” que eventualmente podem estar inter-relacionados (Figura 1). São eles: ciclo urbano, aéreo, silvestre e rural. O ciclo aéreo refere-se à raiva em morcegos (sendo os demais ciclos denominados ciclos “terrestres”).

No ciclo urbano da raiva, o principal vetor é o cão doméstico, tendo os felinos importância secundária. O caráter zoonótico da raiva é mais evidente neste ciclo, devido à proximidade destes animais aos seres humanos.

O ciclo silvestre da raiva pode ser mantido na natureza por diferentes espécies que variam de acordo com a fauna da região. Na Europa, a espécie responsável pela manutenção deste ciclo é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*); já na América do Norte, além das raposas, gambás (*Mephitis mephitis*) e guaxinins (*Procyon sp.*) desenvolvem papel importante na manutenção do ciclo silvestre..

Na América Latina, os ciclos aéreo e silvestre se entrelaçam, uma vez que os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são os principais vetores da raiva silvestre e os principais transmissores da raiva aos bovinos (ciclo rural da raiva).

No Brasil, apesar dos morcegos hematófagos serem os principais reservatórios da raiva silvestre, outras espécies, podem estar envolvidas em situações particulares. O RABV já foi identificado na raposa cinzenta (*Dusicyon vetulus*), em jaritatacas (*Conepatu ssp*), guaxinins (*Procyon sp.*) e saguis (*Calithrix sp.*), além de diversas outras espécies de morcegos não hematófagos e canídeos selvagens (CUNHA, *et al.*, 2005; RIDRIGUES, *et al.*, 1975; VELASCO-VILA, *et al.*, 2006).

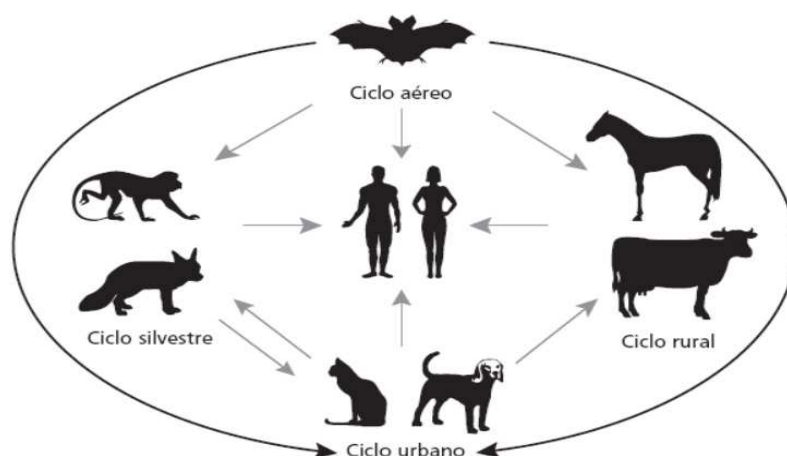


Figura 1: Esquema demonstrando os principais ciclos epidemiológicos da raiva, suas possíveis inter-relações e seus principais vetores.

1.6.a. Situação atual da raiva no Brasil:

A incidência de casos de raiva urbana no Brasil varia de acordo com a região geográfica. Na região sul do País, a raiva urbana está controlada, não tendo sido mais registrados casos de raiva humana ou identificação do “vírus de rua” nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do sul desde 1981. No Estado do Paraná o último registro foi em 1987 (BORDIGNON, *et al.*, 2005). As demais regiões do País ainda apresentam casos de raiva urbana, porém tem havido um decréscimo significativo nos casos de raiva em caninos e felinos domésticos. Até 2003 os caninos eram os principais vetores da raiva aos humanos, porém com a ocorrência dos surtos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos no norte do País, tais morcegos foram os principais vetores da raiva para humanos em anos subsequentes.

Com relação ainda à raiva urbana, deve-se salientar o fato de diferentes espécies de morcegos não hematófagos estarem sendo identificadas positivas no diagnóstico de raiva. Este aumento, porém, pode ser reflexo de uma maior vigilância direcionada para tais espécies, não representando necessariamente um aumento na incidência de raiva em espécies não hematófagas de morcegos.

A raiva rural é endêmica em todas as regiões do Brasil, acarretando grandes prejuízos à pecuária nacional. Bovinos são as fontes de alimento preferencial dos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, sendo assim, nas regiões sul e sudeste, a raiva é frequentemente detectada nesta espécie. Já na região Nordeste, face à maior disponibilidade de ovinos e caprinos, a raiva nestas espécies representa uma parcela significativa dos casos lá registrados.

### 1.7. Diagnóstico:

O diagnóstico clínico da raiva ainda é o único disponível em alguns países subdesenvolvidos, apesar dos possíveis equívocos ocasionados principalmente pela grande variabilidade dos sinais clínicos da doença. Nestes casos, devem ser considerados também o histórico e epidemiologia da raiva na região, porém a confirmação laboratorial é indispensável para o diagnóstico definitivo.

O tecido de eleição para o diagnóstico de raiva é o encéfalo dos animais suspeitos e tal material deve ser remetido ao laboratório, sob refrigeração. Em equinos, além do encéfalo, recomenda-se enviar ao laboratório fragmentos de medula. Animais pequenos (p.ex. morcegos, gambás, sagüis) devem ser remetidos inteiros ao laboratório.

A imunofluorescência direta (IFD) que baseia-se na detecção do vírus em esfregaços de tecido com anticorpos específicos conjugados a uma substância

fluorescente, é a técnica de eleição para o diagnóstico rápido de raiva (DEAN, *et al.*, 1996). Usualmente, a IFD é acompanhada de um teste de confirmação biológica, a inoculação em camundongos lactentes. Pode ser realizado mais de um tipo de teste laboratorial, para cada amostra, no diagnóstico de raiva, principalmente quando há humanos expostos (OIE, 2008).

Técnicas moleculares têm sido empregadas para o diagnóstico *in vivo* de raiva em humanos através da detecção do RABV por RT-PCR em amostras de biopsia de pele e saliva (MACEDO, *et al.*, 2006)

A detecção de anticorpos não é rotineiramente empregada no diagnóstico de raiva, porém em casos de raiva humana, no diagnóstico *ante mortem* da infecção, esta pode fornecer resultados valiosos ao diagnóstico. Nestes casos, a elevação de títulos de anticorpos no líquido céfalo-raquidiano é considerada diagnóstica em casos suspeitos.

#### 1.8. Testes sorológicos para detecção de anticorpos contra raiva

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos contra raiva podem ser utilizados com vários objetivos: avaliação da capacidade imunogênica de vacinas anti-rábicas, monitoramento do “status” sorológico de populações submetidas à vacinação e auxílio no diagnóstico *ante mortem*. Os testes sorológicos podem ainda ser usados para comprovar o contato de populações não vacinadas com o vírus, levando à identificação de novos reservatórios.

O primeiro teste sorológico desenvolvido para detecção de anticorpos contra raiva foi a soroneutralização em camundongos (MNT- “mouse neutralization test”), que foi desenvolvido em 1935 por Webster (WEBSTER & DAWSON, 1935) e ainda hoje é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como prova padrão para detecção de anticorpos contra raiva (WHO, 2005).

Devido ao uso de animais e com a possibilidade do cultivo do RABV *in vitro*, o MNT está em desuso atualmente e diversos testes sorológicos utilizando cultivos celulares como indicadores, têm sido utilizados facilitando o diagnóstico sorológico da raiva, diminuindo custos e o tempo necessário para a obtenção dos resultados (WEBSTER & CASEY 1996). A soroneutralização revelada por fluorescência (Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test- FAVNT), desenvolvida por Cliquet em 1998, assim como o teste rápido de inibição de focos fluorescentes (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test- RFFIT; SMITH *et al.*, 1996), especialmente esta

última, foram recomendadas como provas sorológicas padrão para detecção de anticorpos contra raiva pela OMS (WHO, 2005).

Diversas outras técnicas que não visam a detecção de anticorpos neutralizantes, mas anticorpos capazes de reconhecerem antígenos virais, já foram desenvolvidas, tais como a hemaglutinação passiva (GOUG & DIERKS 1971), a contraimunoelctroforese (Diaz *et al.*, 1986) e a hemaglutinação por imunoaderência (ZANETTI, *et al.*, 1989), além da imunoperoxidase (CARDOSO, *et al.*, 2004; OGAWA, *et al.*, 2008).

Além destes testes, diferentes padrões de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos contra a raiva (ATANASIU, *et al.*, 1977; BARTON & CAMPBELL, 1988; ESTERHUYSEN, *et al.*, 1995; YANG, *et al.*, 2006). No Brasil, Piza *et al.* (1999) avaliaram um teste de ELISA para a detecção de anticorpos em pessoas vacinadas. Em outro estudo de pesquisadores brasileiros, a citometria de fluxo foi experimentada, mas não foi adotada, para a detecção de anticorpos contra o RABV (BORDIGNON, *et al.*, 2002).

#### 1.9. Controle:

Apesar de alguns países terem obtido sucesso na erradicação da raiva, esta não é uma tarefa simples. O principal aspecto a ser considerado neste caso são as espécies animais responsáveis pela manutenção dos ciclos epidemiológicos da raiva. Considerando que a eliminação da raiva não se dará pela eliminação destes animais é preciso avaliar as espécies silvestres envolvidas (KOPROWSKI, 2006). No caso do Brasil o principal reservatório silvestre do vírus rábico são os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, porém diversas outras espécies como os canídeos silvestres, os morcegos não hematófagos e os sagüis podem estar envolvidas em casos de raiva (FAVORETTO, *et al.*, 2001). Assim sendo a erradicação da raiva na Brasil ainda é pouco factível, devendo ser tomadas medidas que visem o controle da doença.

A vigilância epidemiológica deve ser mantida inclusive em regiões onde a raiva está controlada, a fim de se evitar a re-introdução da doença. O Programa de Controle da Raiva preconizado pela Organização Mundial da Saúde, prevê as seguintes medidas para o controle eficaz da raiva urbana: vacinação de caninos e felinos domésticos, apreensão de cães errantes, atendimento às pessoas envolvidas em agravos com animais, observação clínica de cães e gatos, vigilância epidemiológica incluindo a colheita e envio de material para o laboratório e controle das áreas de risco e ainda educação em saúde.



Já o Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) prevê a vacinação dos herbívoros domésticos em áreas endêmicas e o controle da população de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (POMPEI, 2009) Dois métodos podem ser utilizados para o controle da população de morcegos:

-Método de controle seletivo direto: realizado através da aplicação tópica da pasta vampiricida a base da substância anticoagulante warfarina. Alguns indivíduos são capturados com o uso de redes próprias para este fim, a pasta vampiricida é aplicada no dorso do animal que é solto novamente para que volte para a colônia. Os morcegos hematófagos têm o hábito de se lambar mutuamente, assim sendo estima-se que para cada animal tratado com a pasta vampiricida, aproximadamente 20 outros morcegos devem ingerir a mesma (MANUAL TÉCNICO DO INSTITUTO PASTEUR 1998).

-Método de controle seletivo indireto: realizado com a colaboração dos produtores rurais, prevê a aplicação da pasta vampiricida no local da mordedura provocada pelo morcego, ou ainda a aplicação de anticoagulante por via intramuscular ou intraruminal nos bovinos (MANUAL TÉCNICO DO INSTITUTO PASTEUR 1998).

Já foram realizados estudos visando à vacinação de morcegos hematófagos, tais estudos porém, permanecem restritos ao ambiente acadêmico, não tendo sido ainda avaliados em grande escala (ALMEIDA, *et al.*, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivos gerais:**

Construir ferramentas para ampliar o conhecimento sobre a história natural da raiva no Brasil, possibilitando maior entendimento desta infecção nas diferentes espécies podendo assim contribuir para o controle mais eficaz desta enfermidade.

### **Objetivos específicos:**

- Analisar as características antigênicas e moleculares de amostras do vírus da raiva envolvidos em situações epidemiológicas específicas;
- Desenvolver testes sorológicos capazes de detectar e quantificar anticorpos contra a raiva em diferentes espécies.

**3. CAPÍTULO 1:**  
**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA**  
**RAIVA**

## 3.1.1



---

Acta Scientiarum Veterinariae. 37(4): 391-394, 2009.

---

FAST TRACK  
Pub. 859

ISSN 1679-9216 (Online)

### **Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant**

Raiva canina no Rio Grande do Sul causada por uma variante de vírus rábico de morcego insetívoro

**Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista<sup>1</sup>, Eduardo Caldas<sup>3</sup>, Dennis Malettich Junqueira<sup>1</sup>,  
Thais Fumaco Teixeira<sup>1</sup>, José Carlos Ferreira<sup>2</sup>, Juliana Reis Silva<sup>1</sup>,  
Julio César de Almeida Rosa<sup>2</sup> & Paulo Michel Roehe<sup>1,2</sup>**

1- Laboratório Virologia- Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2- Laboratório de Virologia- FEPAGRO Saúde Animal- Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor

3- Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul.

Autor para correspondência: P. M. Roehe, E-mail: [proehe@gmail.com](mailto:proehe@gmail.com) FAX: 34813711

**RESUMO:**

A raiva é causada pelo vírus da raiva (VR), um RNA vírus, membro do gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*. Esta é mantida na natureza pelos ciclos silvestre e urbano. No Brasil os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e os cachorros domésticos são os principais vetores da raiva no ciclo silvestre e urbano, respectivamente. A raiva urbana, transmitida por caninos não é detectada no Estado do Rio Grande do Sul (RS), desde 1988. O objetivo deste trabalho foi buscar inferir a fonte mais provável de contaminação de uma cadela que morreu de raiva em uma região onde não ocorriam casos da infecção em cães há mais de 20 anos. Para tanto, algumas características antigênicas e genômicas do vírus isolado (RV 183-07) foram determinadas. O vírus foi identificado por imunofluorescência direta, multiplicado através de uma passagem em camundongos e analisado antígenicamente frente a um painel de anticorpos monoclonais anti-lissavírus. Um fragmento do genoma viral correspondente ao gene da nucleoproteína (N) foi submetido à transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase e o *amplicom* obtido foi submetido a análises com enzimas de restrição. Um fragmento de 303 pares de bases do gene N foi clonado, seqüenciado e comparado com outras seqüências análogas disponíveis no Genbank. O vírus isolado demonstrou características antigênicas e genômicas de variantes que tem os morcegos não hematófagos da espécie *Tadarida brasiliensis* como hospedeiro natural. Assim, a fonte de contaminação mais provável no caso em questão foi um contato incidental com um morcego não hematófago dessa espécie, habitante comum da região. Em vista disso, o status de “livre de raiva urbana” da região não foi comprometido.

Descritores: raiva, variantes, raiva canina, raiva urbana, raiva em morcego insetívoro, diagnóstico.

**ABSTRACT:**

Rabies is caused by rabies virus (RV), a RNA virus member of the *Lyssavirus* genus, family *Rhabdoviridae*. This is maintained in nature by sylvatic and urban cycles. In Brazil the hematophagous bat *Desmodus rotundus* and the domestic dogs are the main vectors of rabies in sylvatic and urban cycle, respectively. The urban rabies, transmitted by dogs is not detected in the state of Rio Grande do Sul (RS), since 1988. This study was carried out in an attempt to infer the most likely source of contamination a of a stray bitch that died of rabies in an area where no urban rabies has been reported in more than 20 years. In order do achieve that, some antigenic and genomic characteristics the rabies virus recovered from the animal (isolate RV 183-07) were determined. The virus was identified by direct immunofluorescence and multiplied by passage in mice. Its antigenic profile was determined with a panel of monoclonal antibodies to lyssavirus antigens. A fragment of the viral genome corresponding to the nucleoprotein (N) gene was submitted to reverse transcription/polymerase chain reaction and the amplicon obtained was examined by restriction enzyme analysis. A 303 base pair fragment of the N gene was cloned, sequenced and compared to analogous sequences available at Genbank. The recovered virus displayed antigenic and genomic characteristics of rabies virus variants whose natural reservoir is the non-hematophagous bat *Tadarida brasiliensis*. Thus, the most likely source of contamination in this case was an incidental contact with a non-haematophagous bat of that species, common inhabitants of the region. In view of that, the status of “urban rabies free” of the area should not be compromised.

Key words: rabies variants, canine rabies, urban rabies, insectivorous bat rabies, diagnosis.

## INTRODUCTION:

Rabies is a widespread zoonotic disease caused by rabies virus (RV), a member of the *Lyssavirus* genus, family *Rhabdoviridae* [1]. In nature, RV is maintained in cycles with distinct natural reservoirs. In the urban cycle, the reservoir for the virus is domestic dog<sup>1</sup>. In the sylvatic cycle in Latin America, the main natural RV reservoir is the haematophagous (vampire) bat *Desmodus rotundus*. However, RV variants adapted to different bat species, including insectivorous and frugivorous bats, have been frequently reported. Such variants are antigenically and genetically distinct from variants whose natural reservoirs are vampire bats [4]. Antigenic differentiation of RV variants can be achieved either by monoclonal antibody analyses<sup>4</sup> or by genomic analyses. Within the latter, restriction enzyme analyses (REA) of genome fragments amplified by reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) have often been employed, usually complemented by nucleotide sequencing [4].

In the state of Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil, urban rabies has not been detected since 1988 [3]. Nevertheless, rabies in vampire bats remains endemic [1]. However, on a growing number of occasions, non-haematophagous bats have been found infected with RV in urban areas [1]. In this study, a case is reported where rabies virus was isolated from a stray bitch which, as deduced from the antigenic and genomic characteristics of the isolate, was more likely incidentally infected by a RV variant whose natural reservoirs are insectivorous bats of the species *Tadarida brasiliensis*.

## **METHODS:**

### Virus isolation

In January 2007, a stray bitch was found dead by local residents in the city of Tapes (eastern RS). The bitch apparently did not develop any signs of disease or these were not noticed, as reported by locals which notified public health authorities. The public health service collected the dead animal, which was submitted to the laboratory for rabies diagnosis (sample number 183-07).

Routine identification of rabies virus antigens was performed by the direct fluorescent antibody test (DFAT) following standard diagnostic procedures [1]. A polyclonal anti-rabies nucleocapsid fluorescein conjugate (Pasteur Institute, São Paulo, Brazil) was used. Virus identification was confirmed by mouse intracerebral inoculation followed by DFAT on brain tissues of infected mice [1].

### Antigenic characterization

The antigenic profile of isolate RV183-07 was determined by indirect immunofluorescence (IIF) with a panel of eight monoclonal antibodies (Mabs) raised to lyssavirus antigens [4]. Three other RV isolates, named 1024 (from an insectivorous bat), 576/RS (from a haematophagous bat) and 585/BA (from a case of urban dog rabies) were included in the tests for comparisons.

### Genomic characterization

Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and submitted to reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers targeting the N gene as described by Tordo [5].

The amplicon obtained was subjected to restriction enzyme analysis (REA) with *Bgl*III and *Pvu*II endonucleases. Cleavage was performed at 37°C for 1 hour. The



products were submitted to electrophoresis in 0.7% agarose, stained with ethidium bromide by and visualized on a UV transilluminator [2].

#### Nucleotide sequence analysis

A fragment of the N gene was targeted for sequence amplification and comparative analyses. Primers corresponding to positions 66-82 (sense primer: 5'-CTACAATGGATGCCGAC-3') and 385-365 (anti-sense primer 5'-TGGGGTGATCTTRTCTCCTTT -3') were used to amplify the isolate RV183-07 by RT-PCR as described above. The amplicon obtained was cloned into plasmid pCR2.1 (Invitrogen) and sequenced three times in both senses, from three different clones. Sequencing was carried out with the DYEnamic ET terminators sequencing kit (GE Healthcare, Giles, UK) following the manufacturer's protocol, in a MegaBACE 500 automatic sequencer (GE). Assembled sequences with high quality were aligned using the Clustal V method (weighted), gap penalty 10 and gap length penalty 10. Homology analyses were performed with basis on RV sequences available at the GenBank database.

## **RESULTS:**

#### Antigenic characterization

Mab analysis revealed that isolate RV183-07 displayed an antigenic pattern usually found in RV variants whose natural reservoirs are bats, indicating the likely origin of the recovered virus (Table 1).

#### Genomic characterization

REA of the DNA fragment amplified from RV183-07 gave rise to two *Bgl*II fragments of 1000 and 530 bp, and two *Pvu*II fragments of 1100 and 430 bp. The REA cleavage pattern obtained was similar to that observed with other bat RV variants, and unlike the pattern usually displayed by RV variants found in dogs (Table 2) [4].

### Nucleotide sequence analysis

By aligning the sequenced fragment of RV183-07 with equivalent RV sequences available at Genbank, high similarity was found between RV183-07 and RV variants whose natural reservoirs are insectivorous bats of the Brazilian "free-tailed" bat species *Tadarida brasiliensis* (Figure 1).

### **DISCUSSION:**

The present study reports an investigation on the origin of a rabies virus variant isolated from a bitch in a canine rabies-free area. Antigenic analyses and REA suggested that the recovered virus was a RV variant whose natural reservoirs are bats. Phylogenetic analysis of the sequenced fragment of the viral genome confirmed that the recovered virus was an RV variant with characteristics of variants which have the Brazilian free-tailed bat species *Tadarida brasiliensis* as reservoirs. Such bats are fairly abundant in the area of occurrence of the case. Thus, the findings of the present study reveal that the detection of such variant in a canine was likely an occasional spillover.

The determination of the species of origin of the case was important to allow appropriate management of sanitary vigilance resources; as the isolate RV183-07 was originated from an episode of incidental contamination, the status of "canine rabies free" of the area was not compromised. This highlights the importance of the maintenance of strict surveillance on rabies infections in bats and the identification of RV variants. Moreover, a better understanding of the biology of rabies in non-haematophagous bat species in Brazil and its role in rabies epidemiology must remain as targets for continuing research.

### **CONCLUSION:**

The virus recovered from a bitch in the municipality of Tapes, RS, was a RV variant with characteristics of variants which have the insectivorous bat *Tadarida*

*brasiliensis* as natural reservoir. Thus, the most likely source of contamination of the bith in this case was an incidental contact with a non-haematophagous bat of that species.

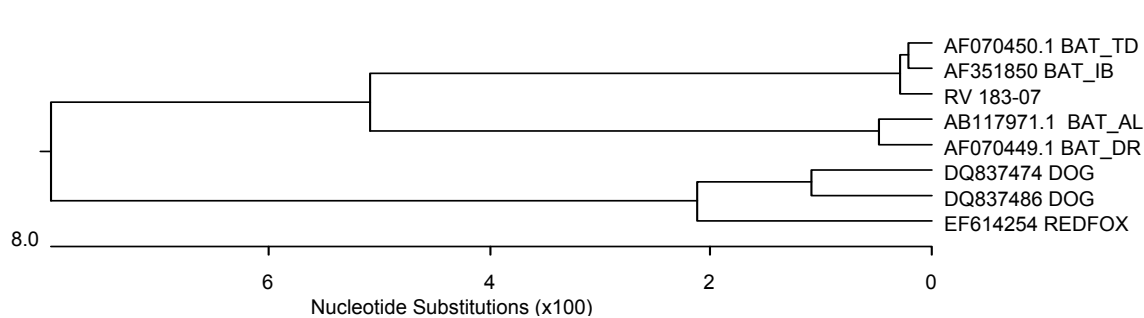
#### **ACKNOWLEDGEMENTS:**

All procedures involving animal care, handling and experimentations were performed under veterinary supervision and according to the recommendations of the Brazilian Committee on Animal Experimentation (COBEA; law no. 6.638 of May 8<sup>th</sup>, 1979). Work funded by FEPAGRO, CNPq and FAPERGS. H.B.C.R.B. is a doctorate fellow at the Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), UFRGS. P.M.R. is a CNPq 1C researcher.

#### **REFERENCES:**

- 1- Batista H.B.C.R., Roehe P.M. & Franco A.C. 2007. Rabies: a brief review. *Acta Scientiae Veterinariae* .35: 125-144.
- 2- Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd. Ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory.
- 3- Schaefer R., Caldas E., Schmidt E., King A.A. & Roehe P.M. 2002. First case of cat rabies in Southern Brazil for 11 years. *Veterinary Record*. 150: 216-217.
- 4- Schaefer R., Batista H.B.C.R., Franco A.C., Rijsewijk F.A. & Roehe P.M. 2005. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Veterinary Microbiology*. 107: 161-170.
- 5- Tordo N., Poch O., Ermine A. & Keith G. 1986. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Research*. 14: 2671–2683.

Figure 1: Comparison between the first 281 nucleotides of the rabies virus (RV) nucleoprotein (N) gene of isolate 183-07 and seven other RV sequences available at Genebank. (Phylogenetic tree based on using the Clustal V method (weighted); gap penalty 10, gap length penalty 10).



\* Hosts of origin of the rabies virus isolates whose sequences were used in the present study (source: Genebank):

AF070450.1 BAT\_TD: *Tadarida brasiliensis* species.

AF351850 BAT\_IB: Insectivorous bat of undetermined species.

AB117971.1 BAT\_AL: *Artibeus lituratus*.

AF070449.1 BAT\_DR: *Desmodus rotundus*.

DQ837474 DOG and DQ837486 DOG: Domestic dogs.

EF614254 REDFOX: *Vulpes vulpes*.

Table 1: Monoclonal antibody profile of reactivity of rabies virus (RV) isolate 183-07 and other isolates representative of viruses of bat and canine origin.

Isolate designation	Source species of isolate/ expected natural reservoir**	Monoclonal antibodies *			
		5G2	DB3	DB4	L18
183-07	Canine/ Insectivorous bat	+	+	+	+
1024	Insectivorous bat/ insectivorous bat	+	+	+	+
576/RS	Insectivorous bat/ hematophagous bat	+	+	+	-
585/BA	Canine/ canine	+	-	-	-

\* Isolates were tested against a panel of eight different monoclonal antibodies (King, 1991; Roehe *et al*, 1997; Schaefer, 1999). Only the relevant differential profiles are shown on table.

\*\* As deduced from the monoclonal antibody patterns of reactivity.

Table 2: Sizes of fragments obtained after restriction endonuclease analysis (REA) on amplicons from RV isolates of different reservoirs.

Reservoir species	Isolate designation	Restriction enzymes used at REA	
		<i>Bgl</i> III	<i>Pvu</i> II
Urban dog	183-07	1000 and 530bp*	1100 and 430bp
	585/BA	Nil**	830 and 700bp
Non-haematophagous bat	1024	1000 and 530bp	1100 and 430bp

\*Refers to the sizes of fragments generated after digestion.

\*\* Not cleaved with that enzyme.

## 3.1.2



## NOTA CIENTÍFICA

**Registro de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae) positivo para o vírus rábico no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

Susi Missel Pacheco<sup>1\*</sup>, Eduardo Pacheco Caldas<sup>2</sup>, Julio César de Almeida Rosa<sup>3</sup>, Daniel Pires Rosa<sup>3</sup>, Helena Batista<sup>4</sup>, José Carlos Ferreira<sup>3</sup>, Jairo Predebom<sup>5</sup> e Paulo Michel Roehs<sup>3,4</sup>

Submetido em: 30 de julho de 2009 Recebido após revisão em: 23 de setembro de 2009 Aceito em: 02 de dezembro de 2009

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1323>

1. Instituto Sauver (ISAUVER). Av. Pernambuco 2623/404, CEP 90240-005, Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Ministério da Saúde, Vigilância Sanitária (MS/Brasil). Brasília, DF, Brasil.
3. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF/FEPAGRO). Eldorado do Sul, RS, Brasil.
4. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.
5. Centro Estadual de Vigilância Sanitária do Rio Grande do Sul (CEVS/SES/RS). Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: [batsusi@uol.com.br](mailto:batsusi@uol.com.br)

**RESUMO:** Registro de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae) positivo para o vírus rábico no estado do Rio Grande do Sul, Brasil). O presente trabalho apresenta dois casos de morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus* (Mammalia: Chiroptera: Phyllostomidae), infectados pelo vírus rábico no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O isolado dos vírus foram caracterizados antígenicamente utilizando painel de anticorpos monoclonais, como também analisado geneticamente. A análise dos resultados mostrou que as amostras isoladas de *A. lituratus* apresentam variante antigênica compatível com *Desmodus rotundus*, o morcego vampiro comum.

**Palavras-chave:** *Artibeus lituratus*, vírus rábico, variante 3.

**ABSTRACT:** Record of *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae) positive for rabies virus of Rio Grande do Sul State, Brazil). This paper presents two reports of rabies in frugivorous bats, *Artibeus lituratus* (Mammalia: Chiroptera: Phyllostomidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. The isolated viruses were characterized antigenically using monoclonal antibodies panel, but have been considered genetically. Analysis of the results showed that the samples isolated from *A. lituratus* presented antigenic variant consistent with that isolated from *Desmodus rotundus*, the common vampire bat.

**Key words:** *Artibeus lituratus*, rabies virus, variant 3.



## INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença geralmente fatal, que acomete todos os mamíferos, inclusive o homem. O controle desta enfermidade baseia-se na rápida aplicação de medidas profiláticas em casos de contato com animais suspeitos (medidas pré-exposição e pós-exposição) e no controle e vacinação dos reservatórios do vírus rábico. No Brasil, os principais reservatórios da raiva são as ordens Carnivora, no ciclo urbano (cães domésticos), e Chiroptera, em especial, *Desmodus rotundus* (Geoffrey, 1810) e Primates (*Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758)), no ciclo silvestre (Uieda *et al.* 1995, Kotait *et al.* 2007). Conforme informações divulgadas pelo Instituto Pasteur (2006), os quirópteros contribuem com aproximadamente 12% dos casos de positividade e diversas espécies foram identificadas com o vírus rábico. Porém, o morcego hematófago *D. rotundus* é o principal responsável pela manutenção e transmissão da raiva silvestre em herbívoros.

*Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Fig. 1) é uma espécie com ampla distribuição no continente americano. Ocorre desde Sinaloa, oeste do México, na América do Norte, Trinidad e Tobago, Antilhas e Panamá, na América Central, até Venezuela, Brasil, Argentina e Uruguai, na América do Sul (Eisenberg & Redford 1999). Pode ser encontrada em altitudes que variam desde o nível do mar até 2.000 m. No Brasil, está representada em todas as regiões e biomas, sendo uma importante espécie dispersora de sementes e formadora de florestas.

Essa espécie forma grupos pequenos (oito indivíduos) ou grandes (superior a 30 morcegos), habitando tanto árvores copadas, como cavernas, frestas entre rochas, ocos de árvores, telhados (Esbérard *et al.* 2006), ou formando tendas com as folhas de palmeiras, as quais são cortadas com os dentes (Zortéa & Chiarello 1994). Vive tanto

em áreas conservadas quanto em ambientes alterados, como é caso das cidades (Sazima *et al.* 1994).

*Artibeus lituratus* é frugívora, pertencente à família Phyllostomidae, sendo considerada de médio porte, com massa corporal atingindo 90 g e antebraccio ultrapassando 75 mm. Apresenta quatro listras brancas na cabeça, um apêndice nasal na face e diversas verrugas no lábio inferior, características que facilitam sua identificação taxonômica. Seu vôo é característico: baixo com manobras ascendentes e descendentes em forma de “clave de sol” ou de “oito invertido” ( $\infty$ ).

Na área urbana, a presença de *A. lituratus* é comumente relatada para Brasília, Belo Horizonte, Rio de Janeiro, São Paulo e Curitiba (Pacheco *et al.* 2008, Sodré & Esbérard 2008, Uieda *et al.* 2008). Casos de positividade para o vírus rábico para esta espécie foram constatados para os estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Pará (Deus *et al.* 2003, Scheffer *et al.* 2007, Silva *et al.* 2009). No entanto, no estado do Rio Grande do Sul, nenhum caso de raiva em morcegos desta espécie tinha sido registrado até a presente data. Este trabalho tem por objetivo descrever o primeiro caso de raiva em morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus* no Rio Grande do Sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em 2007, foram diagnosticados dois exemplares de *A. lituratus*, positivos para a raiva. O primeiro exemplar, uma fêmea capturada em 23 de maio, é proveniente da área urbana de Dois Irmãos, município com área total superior a 73 km<sup>2</sup>, população de 27.284 habitantes e densidade populacional de 264,47 hab./km<sup>2</sup>. O segundo exemplar foi coletado em 25 de setembro do mesmo ano, em Caxias do Sul, cidade cuja área total é de 1.643,913 km<sup>2</sup>, população de aproximadamente 399.038 habitantes, e densidade populacional de 250,7 hab./km<sup>2</sup> (Fig. 2).

Os espécimes foram capturados e enviados para o Centro de Vigilância Sanitária/SES (CEVS/SES), em Porto Alegre, e ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor/SCT (IPVDF/SCT), em Eldorado do Sul.

O IPVDF vem realizando uma técnica menos intrusiva para retirar a massa encefálica. O procedimento padrão retira toda a calota cefálica ou parte dela, para extrair o cérebro, danificando o crânio. Neste método, faz-se uma incisão na área dos côndilos occipitais e do foramen magnum (Fig. 3), sem causar dano aos forames e cristas sagital e mastóidea, ou das bulas timpânicas, estruturas importantes na identificação de quirópteros.

Para o diagnóstico de raiva, foram realizadas as técnicas usuais de Imunofluorescência Direta (IFD) e Inoculação Intracerebral em Camundongos Lactantes (Mouse Intracerebral Test-MIT).

A caracterização antigênica foi obtida através de imunofluorescência indireta, frente a um painel composto por 16 anticorpos monoclonais, preparados contra diferentes antígenos dos *Lyssavirus*. Na caracterização molecular, o RNA total foi extraído e submetido à transcrição reversa, seguido de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), com alvo na nucleoproteína do vírus. O amplicon foi submetido à análise com enzimas de restrição (REA) avaliado em gel de agarose 1%, e visualizado sob luz ultravioleta.

## **RESULTADO E DISCUSSÃO**

O primeiro exemplar de *A. lituratus* da área urbana de Dois Irmãos possui o relato do jardineiro da residência que o coletou: “dois morcegos da mesma espécie estavam se confrontando em pleno vôo. Caíram no solo e, então, foram presos”. O morcego positivo era uma fêmea, com peso de 70,8 g. Tanto a caracterização antigênica quanto a molecular identificaram um padrão de reatividade semelhante ao encontrado

em morcegos hematófagos, *D. rotundus*, (Tabelas 1 e 2) compatível com a variante 3, de acordo com dados também apresentados por Scheffer *et al.* (2007). O outro exemplar coletado foi diagnosticado como negativo para o vírus rabílico.

Para o segundo exemplar de *A. lituratus* positivo, uma fêmea, não pôde ser caracterizada a sua amostra de vírus. Registra-se que, no Brasil, no ano de 2007, 36 espécies de morcegos foram diagnosticadas como positivas para a raiva (Kotait *et al.* 2007). No Rio Grande do Sul os dados amostrais com quirópteros ainda são incipientes. No ano de 2007, apenas 292 amostras de morcegos foram analisadas. Destas, 145 eram não hematófagas e 147 hematófagas (*D. rotundus*). De aproximadamente 40 espécies de morcegos conhecidas para o Rio Grande do Sul (Pacheco *et al.* 2007), no mesmo período, apenas cinco indivíduos não hematófagos foram positivos: três de *Tadarida brasiliensis* (Geoffroy, 1824) e dois de *A. lituratus*, conforme os laudos analisados no IPVDF/RS.

Um dos poucos estados brasileiros que possui dados consistentes é São Paulo. No estudo de Scheffer *et al.* (2007), 4.393 animais foram analisados, dos quais 3.978 (90,5%) eram morcegos não hematófagos e 415 (9,4%) morcegos hematófagos. Os autores consideraram o hábito alimentar dos espécimes, informando que dentre os morcegos positivos, 43 eram insetívoros, predominando as espécies dos gêneros *Myotis* (Kaup, 1829) (15/82) e *Eptesicus* (Rafinesque, 1820) (10/82), 33 frugívoros, todos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) e seis hematófagos (*D. rotundus*), informando que muitos têm hábitos sinantrópicos.

Para o Rio Grande do Sul, ainda não há dados específicos que possam comprovar se há um aumento de positividade relacionada aos quirópteros ou se apenas a amostragem está aumentando devido ao incremento na divulgação junto aos órgãos de saúde. Por isso, é importante manter o tratamento profilático humano pós-exposição

(soro e vacina), quando ocorrer contato entre pessoas e morcegos e utilizar proteção manual para morcegos caídos no solo ou em caso de adentramento.

Igualmente, é fundamental guardar carcaças de animais e que seja contatado o Centro de Controle de Zoonoses do estado, município ou órgão de saúde, a fim de que sejam recolhidos e realizados diagnósticos para a raiva.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao Médico Veterinário Osvaldo Vieira (CRMV-RS 4989), que enviou os exemplares de Dois Irmãos, RS. Ao IPVDF e ao Med. Vet. Alexandre de Carvalho Braga, coordenador do Lab. Virologia do IPVDF. À Adriana R. da Gama, que fez novas críticas ao trabalho e revisou o abstract.

## REFERÊNCIAS

- DEUS, G.T.; BECER, M.; NAVARRO, I.T. 2003. Diagnóstico da raiva em morcegos não hematófagos na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Centro Oeste do Brasil: Descrição de casos. *Semina: Ciências Agrárias*, 24(1):171-176.
- EISENBERG, J.F. & REDFORD, K.H. 1999. *Mammals of the Neotropics. Vol. 3, The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. Chicago: University of Chicago. 609 pp.
- ESBÉRARD, C.E.L.; NOGUEIRA, T.J.; LUZ, J.L.; MELO, G.G.S.; MANGOLIN, R.; JUCÁ, N.; RAICES, D.S.L.; ENRICI, M.C. & BERGALLO, H.G. 2006. Morcegos da Ilha Grande, Angra dos Reis, Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecias*, 8: 147-153.
- KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; CARNIELI, J.R.P.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.; MACEDO, C.I.; FERREIRA, K.C.S. & ACHKAR, S.M. 2007. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Boletim de Epidemiologia Paulista*, 4(40): 1-10.
- PACHECO, S.M.; SEKIAMA, M.L.; OLIVEIRA, K.P.A.; QUINTELA, F.; WEBER, M.M.; MARQUES, R.V.; GEIGER, D. & SILVEIRA, D.D. 2007. Biogeografia de Quirópteros da Região Sul. *Ciência & Ambiente*, 35: 181-202.
- PACHECO, S.M.; MARQUES, R.V.; GRILLO, H.C.Z.; MARDER, E.; BIANCONI, G.V.; MIRETZKI, M.; LIMA, I.P. & ROSA, V.A. 2008. Morcegos em áreas urbanas da Região Sul do Brasil. In: *Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação*. PACHECO, S.M.; MARQUES, R.V.; ESBÉRARD, C.E.L. (Org). Porto Alegre: Armazém Digital, 574 p.

INSTITUTO PASTEUR. 2006. *Raiva dos quirópteros*. [Online]. Disponível em: <[http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes\\_02.htm](http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_02.htm)> Acessado em 12 de janeiro de 2008.

SAZIMA, I.; FISCHER, W.A.; SAZIMA, M. & FISCHER, E.A. 1994. The fruit bat *Artibeus lituratus* as a forest and city dweller. *Ciência & Cultura*, 46(3): 164-168.

SCHEFFER, K.C.; CARRIERI, M.L.; ALBAS, A.; SANTOS, H.C.P.; KOTAIT, O. & ITO, F.H. 2007. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 41(3): 389-395.

SILVA, L.P. DE; RAMOS, O.S.; XAVIER, S.M. & REIS, J.R. 2008. *Vírus da raiva em quirópteros no município de Anajás, Estado do Pará, Brasil*. [online]. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/combravet/2008/anais/cd>> Acessado em: 01 de junho de 2009.

SODRÉ, M.M. & ESBÉRARD, C.E.L. 2008. Morcegos urbanos do Sudeste do Brasil. In: *Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação*. Pacheco, S.M.; Marques, R.V.; Esbérard, C.E.L. (Org). Porto Alegre: Armazém Digital, 574 p.

UIEDA, W.; SANTOS, N.M. & SILVA, M.M.S. 1995. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 29(5): 393-397.

UIEDA, W.; BREDT, A. & PINTO, P.P. 2008. Dieta, abrigos e comportamento do morcego fitófago *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae) em Brasília, Distrito Federal, e sua relação com as plantas usadas na arborização urbana. In: *Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação*. PACHECO, S.M.; MARQUES, R.V.; ESBÉRARD, C.E.L. (Org). Porto Alegre: Armazém Digital, 574 p.

ZORTÉA M. & CHIARELLO AG. 1994. Observations on the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus*, in an urban reserve southeast Brazil. *Mammalia*, 58(4): 665-670.



Figura 1. Exemplar de *Artibeus lituratus*, mostrando a listras brancas faciais e a folha nasal, características da espécie. Foto: Wilson Uieda.

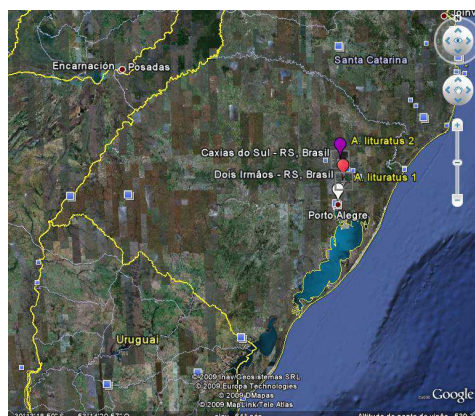


Figura 2. Mapa do estado do Rio Grande do Sul e localização dos municípios de Dois Irmãos e Caxias do Sul. Fonte: Google Earth.



Figura 3. Detalhe do crânio de morcego, mostrando a pequena incisão feita para retirar o cérebro sem danificar a estrutura óssea. Foto: Susi Missel Pacheco.



Tabela 1: Perfil antigênico da amostra de vírus rábico isolado do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* e outros isolados representativos do vírus.

Espécie	Anticorpos monoclonais *			
	5G2	DB3	DB4	L18
Morcego insetívoro	+	+	+	+
Morcego frugívoro	+	+	+	-
Morcego hematófago	+	+	+	-
Canino	+	-	-	-

\* Os isolados foram testados frente a um painel composto por 16 anticorpos monoclonais (King, 1991; Roehe *et al*, 1997; Schaefer, 1999). Estão mostrados na tabela somente o perfil de reatividade frente aos anticorpos monoclonais relevantes.

Tabela 2: Tamanho dos fragmentos obtidos após a análise com enzimas de restrição (REA) do amplicon de amostras do vírus da raiva isoladas de diferentes hospedeiros.

Hospedeiro	Enzima de restrição utilizada na REA	
	<i>Bgl</i> II	<i>Pvu</i> II
Canino doméstico	Nenhum**	830 e 700bp
Morcego hematófago	1000 e 530bp	1100 e 430bp
Morcego frugívoro	1000 e 530bp	1100 e 430bp

\*\* Não cliva com a enzima.

**4. CAPÍTULO 2:**

**DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS**

**PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS**

**DA RAIVA**

#### 4.2.1. Immunoperoxidase inhibition assay (IIA) for rabies antibody detection

\*Batista, H.B.C.R.<sup>1</sup>; Lima, F.E.S.<sup>1</sup>; Maletich, D.<sup>1</sup>, Silva, A.C.R.<sup>4</sup>; Vicentini, F.K.V.<sup>1</sup>;  
Roehe, L.R.<sup>1</sup>; Spilki, F.R.<sup>3</sup>; Franco, A.C.<sup>1</sup>; Roehe, P.M.<sup>1,2</sup>

Authors affiliation:

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

2-FEPAGRO Sanidade Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS, Brasil

3-Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil

4-Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil

Corresponding author: H.B.C.R. Batista. E-mail: hrutner@yahoo.com.br

***ACEITO:***

***JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS***

**Abstract**

An immunoperoxidase inhibition assay (IIA) for detection of rabies antibodies in human sera is reported. Diluted test sera were added to microplates with paraformaldehyde-fixed, rabies virus infected CER cells; antibodies present in sera compete with a rabies polyclonal antiserum (prepared in rabbits) which was added subsequently. The reaction was labelled by the addition of anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate and then developed by the addition of the substrate 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC). The performance of the assay was compared to that of the “simplified fluorescence inhibition microtest” (SFIMT), an established virus neutralization assay, by testing 422 human serum samples. The IIA was able to detect rabies antibodies in human sera with high sensitivity (97.6%) and specificity (98 %), with an accuracy of 97.6 % and a Kappa correlation coefficient equal to 0.9. The IIA results are easily read by eye due to the clearly identifiable specific staining in antibody-negative sera and the absence of staining in antibody-positive samples. In addition, IIA does not employ monoclonal antibodies and does not require the production of large volumes of virus nor purification of recombinant or native proteins or specialized equipment for its performance. It is concluded that the IIA is suitable for detection of rabies antibodies in human sera, with sensitivity, specificity and accuracy comparable to those of a neutralization-based assay. Moreover, it may be advantageous over other similar methods that detect binding antibodies, in that it can be easily introduced into laboratories, provided basic cell culture facilities are available.

**Keywords:** antibody detection, rabies serology, immunoperoxidase inhibition assay

## 1. Introduction

Antibodies to rabies virus can be detected by a variety of methods. The first serological assay developed for detection of rabies antibodies was the mouse neutralization test (MNT) (Webster and Dawson, 1935). The WHO Expert Committee on Rabies still recommends neutralization-based tests for rabies serology, since these were shown to correlate positively with protective responses (Cox, 1982; Wiktor *et al.*, 1973; Wunner *et al.*, 1983).

Neutralization-based assays performed *in vitro* became widely employed for detection of rabies antibodies, in view of its practicability in comparison to the MNT and, particularly, because no animal handling is required. Among such tests, the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) was adopted as “gold standard” by WHO (Smith *et al.*, 1973). Other variations of the RFFIT, such as the fluorescence inhibition microtest (FIMT) (Zalan *et al.*, 1979) and the fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) (Cliquet *et al.*, 1998) were developed. In Brazil, the Ministry of Health (2008) approved the use of a simplified version of the FIMT, called the simplified fluorescence inhibition microtest, or SFIMT (Favoretto *et al.*, 1993). More recently, neutralization assays have been reported that rely on immunoperoxidase for identification of reactive and non-reactive sera (Cardoso *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2008).

Nonetheless, there still remains the need for rapid and practical tests that might be applied in large scale serological studies. In attempting to fulfil such a need several enzyme linked immunoassays (ELISAs) have been developed (Thomas *et al.*, 1963; Gough and Dierks, 1971; Nicholson and Prestage, 1982; Mebatsion *et al.*, 1989; Zanetti *et al.*, 1989; Esterhuysen *et al.*, 1995; Elmgren and Wandeler, 1996; Sugiyama *et al.*, 1997; Cliquet *et al.*, 2004; Bahloul *et al.*, 2005; Servat *et al.*, 2006; Feysaguet *et al.*, 2007; Muhamuda *et al.*, 2007). These ELISAs detect binding antibodies, and do not therefore necessarily correlate with neutralization or protection from challenge. Most of them rely on antigens prepared from infected cell extracts, while others use purified G protein (Barton *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 2009) or transformed cell lines expressing the G protein (Zhang *et al.*, 2009). However, all such ELISAs require either the preparation of large volumes of virus or the purification of viral proteins for antigen preparation. In the present study, an alternative test for detection of rabies antibodies in human sera, the “immunoperoxidase inhibition assay” (IIA) is reported. The IIA is a blocking assay based on the reaction between test sera and rabies virus antigens in infected cells. Positive test sera will inhibit linkage of an anti-rabies polyclonal serum (prepared in

rabbits), which will then be revealed by the addition of an anti-rabbit IgG/peroxidase conjugate. The IIA is described and its performance compared to a neutralization-based assay, the SFIMT.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Serum samples

A total of 422 serum samples from people with different vaccination histories were used in the study. Sera were inactivated at 56°C for 30 minutes and tested in duplicate, in fivefold dilutions (1:5, 1:25, 1:125 and 1:625). An International Reference Serum (Pasteur Institute, São Paulo, Brazil) was diluted to a final concentration of 0.5 International Units of rabies neutralizing antibodies per ml (IU/ml) as described below and was included in all experiments as positive control serum. The antibody-negative control serum was from a non-vaccinated individual and was diluted 1:2 for use as described below.

The IIA results were expressed throughout the study in equivalent units per ml of serum (EU/ml) by calibration against the international reference serum. Antibody titres  $\geq 0.5$  EU/ml were considered positive for rabies antibodies (WHO, 2005), whereas antibody titres  $< 0.5$  EU/ml were considered negative for rabies antibodies. Positive reference serum and negative controls were included in each battery of tests.

### 2.2. Cells

The “chicken embryo related” (CER) lineage (Cardoso *et al.*, 2004) was used for the IIA. Cells were cultured in Eagle’s minimum essential medium (EMEM; Invitrogen, Carlsbad, California, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell, Campinas, Brazil) and antibiotics (penicillin 100 IU/ml; streptomycin 100 µg/ml). Cells were split once or twice weekly.

For the SIMFT (Favoretto *et al.*, 1993), production of virus stocks and testing procedures were all carried out in “baby hamster kidney” (BHK-21) cells, cultured as above.

### 2.3. Viruses

For the IIA, rabies virus (RABV) strain “PV” was grown in CER cells (Cardoso *et al.*, 2004). One hundred, fifty percent tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>) of

RABV in 200 µl volumes were added to semiconfluent monolayers in 25 cm<sup>2</sup> sterile cell culture flasks. After 60 minutes at 37°C for adsorption, 10 ml of EMEM supplemented as above were added and flasks incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 72 hours. Subsequently, cells were frozen and thawed once, centrifuged for 15 min at 3500g to remove cell debris, aliquoted in 300 µl volumes and stored at -70°C until use.

For the SFIMT, the RABV strain “PV” was grown as above in BHK-21 cells (Batista *et al.*, 2009).

For challenge of vaccinated rabbits for production of rabies antisera, the RABV strain CVS-11, obtained from Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis, Martínez, Argentina was multiplied in 3-4 weeks-old mice following standard procedures (Koprowski, 1996).

#### 2.4. Rabies polyclonal serum

All animal handling procedures were performed following the Guidelines for Animal Welfare of the Brazilian College for Experimentation on Animals (COBEA). Rabies polyclonal serum was prepared from rabbits inoculated with three weekly doses of a commercially available rabies vaccine (Raivacel, Vallée, Brazil). Twenty one days after the last immunization, rabbits were challenged with 100 fifty percent lethal doses (LD<sub>50</sub>) of RABV strain CVS-11. Serum was collected three weeks after challenge, titrated and used as secondary antibody in the IIA. The appropriate dilution of the polyclonal rabbit-anti-rabies serum to be used in the IIA was determined by testing serial twofold dilutions of the serum in the test with the positive reference serum (diluted to 0.5 IU/ml) and the antibody-negative control serum as “blocking” antibodies (see 2.6 below). The highest serum dilution capable of binding to antigen-containing cells with a clear positive reaction after staining and a minimal background staining (1:40) was chosen for use in subsequent tests.

#### 2.5. Preparation of plates for the immunoperoxidase inhibition assay (IIA)

CER cells were seeded in 96 well tissue culture plates (3-5 x 10<sup>5</sup> cells per well in 100 µl volume). After overnight growth, monolayers were inoculated with 100 TCID<sub>50</sub> per 0.05 ml of RABV strain PV and incubated at 37°C for 72 hours. Subsequently, the supernatant was removed and the plates frozen at -20°C in sealed bags for 1 hour. Plates were then removed from the freezer and 100 µl/well of 4% paraformaldehyde (8.5g

NaCl, 1.55g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.23g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 litre, pH 7.2) was added for 20 minutes at room temperature. The monolayers were then washed three times (see below) and submitted to the IIA.

## 2.6. IIA procedure

All dilutions of test sera, polyclonal rabbit-anti-rabies serum and the anti-rabbit-IgG-peroxidase conjugate and controls were made in dilution buffer (29.5 g NaCl; 1.55 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.23 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% Tween 80, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 litre). All washes were performed three times with 100 µl/well of wash buffer (0.5% Tween 80 in PBS, pH 7.5). Test sera (diluted as in 2.1. above) were added (in duplicate) to plates with fixed, RABV-infected monolayers and incubated for 1 hour at 37°C. After incubation, plates were washed as above and 50 µl/well of an appropriate dilution (1:40) of polyclonal rabbit-anti-rabies serum were added and plates incubated for 1 hour at 37°C. After incubation and washes, 50 µl of anti-rabbit-IgG-peroxidase conjugate (1:150) were added to each well and incubated for an additional hour. After another round of washes, the substrate 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Sigma) prepared as recommended (Harlow and Lane, 1988) was added to the plates (50µl/well). The reaction was incubated at 37°C for 15 to 40 minutes depending on the visible intensity of the staining, as judged by comparing specifically stained wells (with negative control serum) and unstained wells (with positive reference serum). The reaction was stopped by removal of the substrate and addition of 100 µl of PBS. Plates were read on a standard inverted microscope with a 20X magnification objective. Test sera considered antibody-positive were capable of inhibiting 100 % of the binding of the polyclonal rabbit-anti-rabies serum, thus precluding binding of the conjugate, giving rise to unstained wells. Antibody-negative sera allowed binding of anti-rabies serum and conjugate. The peroxidase conjugate reacts with hydrogen peroxide in the presence of the substrate AEC, which precipitates on the antigen-containing cells, allowing visualization of the characteristic carmine red cytoplasmic staining. The antibody titres of the test sera were calculated on the basis of the last dilution capable of blocking 100% of the specific staining. The test was considered valid if the reference serum (diluted to 0.5 IU/ml) was able to block 100% of the AEC color reaction by competing for antigen with the polyclonal rabies anti-serum. Likewise, polyclonal rabies anti-serum binding should not be inhibited by the negative control serum (diluted 1:2), shown by a colored reaction in the wells.



### 2.7. Simplified fluorescence inhibition microtest (SFIMT) procedure

The SFIMT was performed as reported (Favoretto *et al.*, 1993). Briefly, twofold dilutions (1:10 to 1:320) of test sera were added to 96 well microplates. A viral suspension containing 80 TCID<sub>50</sub> per 0.05 ml of RABV strain PV (in 100 µl volumes) was added to each well. After 1 hour incubation at 37°C, BHK-21 cells (5 x 10<sup>5</sup> cells/well) were added (in 50 µl volumes) and the microplates incubated again for a further 24 hours at 37°C. Subsequently, the supernatant was removed and the plates fixed for 15 minutes in 80% cold acetone. The fixative was removed, the plates dried and an appropriate dilution of fluorescein-conjugated rabies antibodies (1:120 in PBS, pH 8.5) was added to wells (in 50 µl volumes). After 1 hour incubation at 37°C, plates were washed and 50 µl of PBS-buffered glycerol (10% glycerol in PBS, pH 8.5) were added to wells and read on a fluorescence microscope.

### 2.8. Statistical analysis:

The results obtained by IIA were compared with those of SFIMT. For calculation of the test's sensitivity, specificity, accuracy, predictive positive and negative values and Cohen's Kappa correlation coefficient, results from all the sera (n= 422) were entered in the DAG Stat (Diagnostic and Agreement Statistics) spreadsheet in the Microsoft Office Excel program. Serum antibody titres were calculated by the method of Reed and Muench (1938). SFIMT results were expressed in IU/ml, whereas IIA results were expressed in EU/ml. Antibody titres  $\geq 0.5$  EU/ml were considered positive for rabies antibodies, whereas antibody titres  $< 0.5$  EU/ml were considered negative for rabies antibodies.

## 3. Results

From the 422 sera examined, 370 were considered positive ( $\geq 0.5$  EU/ml) as determined by the SFIMT, while 361 were positive in the IIA ( $\geq 0.5$  EU/ml). The 51 samples negative in SFIMT ( $< 0.5$  EU/ml) were also negative in IIA; only one serum sample negative in SFIMT resulted positive in IIA (Table 1). The disagreement between IIA and SFIMT was 2.4% (10/422), represented by nine false negative and one false positive sera. The majority of the unmatched negative results (7/9; 77.8%) were

obtained in sera with low SFIMT antibody titres (range 0.53-0.8 EU/ml, mean = 0.65, SD = 0.19). The comparison between results obtained in IIA and SFIMT is shown in Table 1.

#### 4. Discussion

The WHO guidelines recommend tests capable of detecting neutralizing antibodies for rabies serology, since the amount of neutralizing antibodies has been shown to correlate with protection to challenge (Smith *et al.*, 1973; Smith *et al.*, 1996; Cliquet *et al.*, 1998). Such tests, however, may still be tedious and complicated to perform, making them unsuitable for large-scale sero-epidemiological surveys. In such cases, the plethora of ELISAs available for rabies serology becomes rather attractive (Bahloul *et al.*, 2005; Cliquet *et al.*, 2004; Elmgren and Wandeler, 1996; Esterhuysen *et al.*, 1995; Feysaguet *et al.*, 2007; Mebatsion *et al.*, 1989; Nicholson and Prestage, 1982; Servat *et al.*, 2006; Sugiyama *et al.*, 1997; Muhamuda *et al.*, 2007) since these are easy to perform and fairly adaptable to large screening studies.

However, in contrast to neutralization-based tests, ELISAs detect antibodies that bind to viral antigens, regardless of the neutralizing capacity of such antibodies. In consequence, binding antibodies do not necessarily correlate with protection, which is essentially the main reason for performing serology in vaccinated individuals. In view of that, ELISAs, have to be compared with the “gold standard” represented by virus neutralization assays, such as the RFFIT (Smith *et al.*, 1973). On this basis, it has been assumed that the closer the correlation of ELISAs or other binding assays with neutralization-based assays, the more suitable these might be for rabies serology. In such comparisons, many of the above mentioned ELISAs, including some commercial kits, performed poorly (Bahloul *et al.*, 2005; Servat *et al.*, 2006; Niederhauser *et al.*, 2008). Some authors attempted to overcome this problem by developing ELISAs with neutralizing monoclonal antibodies to viral glycoprotein G (the major protein responsible for the induction of neutralizing antibodies), or the N protein, which elicits some neutralizing activity (Sugiyama *et al.*, 1997; Muhamuda *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). However, these may be difficult to obtain or purchase and are not widely available.

In the present study, the IIA was compared with the SFIMT, an established virus neutralization assay currently in use in Brazil and previously validated against the

RFFIT (Favoretto *et al.*, 1993). The SFIMT is performed routinely at the rabies national reference laboratory (Pasteur Institute, São Paulo, Brazil), where it was adopted for monitoring rabies antibodies in vaccinated persons (Ministry of Health, 2008). In the comparison, the IIA displayed a strong correlation with the SFIMT (Cohen's Kappa correlation coefficient: 0.9), with excellent sensitivity (97.6%) and specificity (98.1%). Only ten out of the 422 sera (2.4%) examined in this study presented discrepant results, These sera had low neutralizing antibody titres (between 0.5 and 0.8 EU/ml) at SFIMT, except 2 sera had antibody titres >1 EU/ml.

The IIA introduced in the present study is a simple blocking assay that relies on the ability of antibodies in the test sera to block binding of a polyclonal rabies serum produced in rabbits. It does not utilize competing monoclonal antibodies. The polyclonal rabies serum required can be prepared locally with relative ease, a straightforward task for most laboratories dealing with rabies virus. The IIA does not require preparation of large volumes of virus nor purification of viral proteins for antigen preparation. In addition, it does not require expensive equipment for antigen preparation, such as high-speed or ultracentrifuges. In addition, it does not require ELISA plate readers, since it does not rely on a soluble color reaction for its reading. As the substrate AEC is insoluble, it remains attached to antigen-containing cells, so labelled infected cells can be easily identified by the distinctive carmine red color. Therefore, readings can be performed with the aid of a regular optical microscope with a 20X or 40X objective magnification. In addition, the staining profile - or absence of staining in antibody positive wells - serves as an additional indicator of the specificity of the reaction, which decreases the chances of misinterpretation of results. This advantage provided by AEC has also been explored in recent neutralization assays revealed by immunoperoxidase (Cardoso *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2008). Moreover, rather than relying on the inhibition of 50% or 70% of fluorescent foci, as in RFFIT or FAVN, the test is read as either antibody-positive, when no stained cells are visible in a well, or "antibody-negative" when any focus of stained cells in a well is scored as virus positive. This makes interpretation simple and less dependent on operator subjectivity.

Another advantage of the IIA is that, as a blocking assay, it may be potentially useful for the detection of antibodies in different animal species. This can be particularly useful when screening for rabies antibodies in exotic or wild species, where anti-species conjugates are not readily available.

In conclusion, the IIA performance was highly satisfactory for detection of rabies antibodies in human sera. The test is of relatively low cost and does not require expensive equipment or reagents; only basic cell culture facilities are required. The results are easily read in an ordinary optical microscope and interpretation is straightforward, with reading based on an “all or nothing” principle. When compared to the SFIMT, it revealed a strong positive correlation. As the IIA is based on a blocking reaction, it might also be potentially useful for detecting rabies antibodies in other species. Studies are on the way to evaluate such use for the IIA.

### **Acknowledgements**

H.B.C.R.B. is a doctorate fellow at the Post Graduate Program in Veterinary Sciences (PPGCV), UFRGS. P.M.Roehe is a CNPq researcher 1B. The present work was supported by FEPAGRO, CNPq, CAPES and FAPERGS. We thank Dr S. Edwards for comments and criticism.

## References

- Bahloul, C., Taieb, D., Kaabi, B., Diouani, MF., Ben Hadjahmed, S., Chtourou, Y., Imen B'Chir, B., Dellagi, K.. 2005. Comparative evaluation of specific ELISA and RFFIT antibody assays in the assessment of dog immunity against rabies. *Epidemiol. Infect.* 133, 749-757.
- Barton, L.D., Campbell, J.B., 1988. Measurement of rabies-specific antibodies in carnivores by an enzyme linked immunosorbent assay. *J. Wildl. Dis.* 24, 246-258.
- Batista, A.M., Cruz, P.S., Almeida, E., Costa, A.E.B., Scheffer, K.C., Chaves, L.B., Silva, A.C.R., Caporale, G.M.M., 2009. Infection of BHK-21 cells cultivated in stationary monolayers by PV and CVS strains. *Bol. Epidemiol. Paul.* 6, 4-11.
- Cardoso, T.C., Queiroz da Silva, L.H., Albas, A., Ferreira, H.L., Perri, S.H.V., 2004. Rabies neutralizing antibody detection by indirect immunoperoxidase serum neutralization assay performed on chicken embryo related cell line Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99, 531-534.
- Cliquet, F., Aubert, M., Sagné, L., 1998. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods.* 212, 79-87.
- Cliquet, F., McElhinney, L.M., Servat, A., Boucher, J.M., Lowings, J.P., Goddard, T., Mansfield, K.L., Fooks, A.R., 2004. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J. Virol. Methods.* 117, 1-8.
- Cox, J.H., 1982. The structural proteins of rabies virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 21-25.
- Elmgren, L.D., Wandeler, A.I., 1996. Competitive ELISA for the detection of rabies virus-neutralizing antibodies. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Eds). 4th edn. Geneva: World Health Organization, 200-208.
- Esterhuysen, J. J., Prehaud, C., Thomson, G.R., 1995. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *J. Virol. Methods.* 51, 31-42.
- Favoretto, S.R., Carrieri, M.L., Tino, M.S., Zanetti, C.R., Pereira, O.A.C., 1993. Simplified fluorescent inhibition microtest for the titration of rabies neutralizing antibodies. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 35, 171-175.

- Feyssaguet, M., Dacheux, L., Audry, L., Compoint, A., Morize, J.L., Blanchard, I., Bourhy, H., 2007. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine*. 25, 2244-2251.
- Gough, P.M., Dierks, R.E. 1971. Passive hemagglutination test for antibodies against rabies virus. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 45, 741-745.
- Harlow, E., Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour.
- Koprowski, H., 1996. The mouse inoculation test. In: Meslin, F.-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization, Geneva, pp. 80–86.
- Mebatsion, T., Frost, J.W., Krauss, H., 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using staphylococcal protein for the measurement of rabies in various species. *J. Vet. Med. Ser.* 36, 532–536.
- Ministry of Health, Secretaria da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiologica. 2008. 1º edição. *Manual de Diagnóstico Laboratorial da raiva*, Brasilia- DF, Brasil.
- Muhamuda, K., Madhusudana, S.N., Ravi, V.,2007. Development and evaluation of a competitive ELISA for estimation of rabies neutralizing antibodies after post-exposure rabies vaccination in humans. *Int J Infect Dis.* 11, 441-445.
- Nicholson, K. G., Prestage, H., 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay: a rapid reproducible test for the measurement of rabies antibody. *J. Med. Virol.* 9, 43–45.
- Niederhauser, S., Bruegger, D., Zahno, M., Vogt, H.R., Peterhans, E., Zanoni, R., Bertoni, G., 2008. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. *Vaccine* 26, 6749–6753.
- Ogawa, T., Gamoh, K., Aoki, H., Kobayashi, R., Etoh, M., Senda, M., Hirayama, N., Nishimura, M., Shiraishi, R., Servat, A., Cliquet, F., 2008. Validation and standardization of virus neutralizing test using indirect immunoperoxidase technique for the quantification of antibodies to rabies virus. *Zoonoses Public Health.* 55, 323-327.
- Reed, L.J., Muench, H.A., 1938. A simple method of estimating fifty per cent end-points. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 493-497.

- Servat, A., Cliquet, F., 2006. OIE Reference Laboratory for Rabies, WHO. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. *Virus Res.* 120, 17-27.
- Smith, J.S., Yager, P.A., Baer, G.M., 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. World Health Organ.* 535-541.
- Smith, J.S., Yager, P.A., Baer, G.M., 1996. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Eds). 4th edn. Geneva: World Health Organization..181-189.
- Sugiyama, M., Yoshiki, R., Tatsuno, Y., Hiraga, S., Itoh, O., Gamoh, K., Minamoto, N., 1997. A New Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Demonstrates Adequate Immune Levels to Rabies Virus in Compulsorily Vaccinated Japanese Domestic Dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 727-730.
- Thomas, J.B., Sikes, R.K., Ricke, A.S., 1963. Evaluation of indirect fluorescent antibody technique for detection of rabies antibody in human sera. *J. Immunol.* 91, 721-723.
- Webster, L.T., Dawson, J.R., 1935. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation: measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Biol. Med.* 32, 570-573.
- WHO Expert Consultation on rabies, 2005. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 931, 1-88.
- Wiktor, T.J., György, E., Schlumberger, D., Sokol, F., Koprowski, H., 1973. Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.* 110, 269-276.
- Wunner, W.H., Dietzschold, B., Curtis, P.J., Wiktor, T.J., 1983. Rabies subunit vaccines. *J. Gen. Virol.* 64, 1649-1656.
- Zalan, E., Wilson, C., Pukitis, D., 1979. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Stand.* 7, 213-220.
- Zanetti, C.R., Tino, M.S., Chamelet, E.L.B., Ishizuka, M.M., Pereira O.A.C., 1989. Simplification of immune adherence hemagglutination test for detection of rabies antibodies in human serum. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 31, 341-345.
- Zhang, S., Liu, Y., Zhang, F., Hu, R. 2009. Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing antibodies in dogs. *Vaccine* 27, 2108-2113.

Table 1: Comparison between the immunoperoxidase inhibition assay (IIA) and the simplified fluorescence inhibition microtest (SIMFT) for detection of rabies antibodies in human sera (n= 422).

	IIA +	IIA -	Total
SFIMT +	361	9 <sup>a</sup>	370
SFIMT -	1 <sup>b</sup>	51	52
Total	362	60	422

Footnotes for table:

Results for SFIMT expressed in International Units/ml (IU/ml) as positive ( $\geq 0.5$  IU/ml) or negative ( $<0.5$  IU/ml).

IIA results expressed in equivalent units/ml (EU/ml) as positive ( $\geq 0.5$  EU/ml) or negative ( $<0.5$  EU/ml).

Accuracy: 97.6%; Sensitivity: 97.6%; Specificity: 98.1%; Positive predictive value: 99.7%; Negative predictive value 85%. Cohen's correlation coefficient  $\kappa = 0.9$ .

<sup>a</sup> SFIMT antibody titres (range 0.53-1.85 IU/ml, mean = 0.87; SD=1.28);

<sup>b</sup> SFIMT antibody titre = 0.06 IU/ml, IIA titre = 1.15 IU/ml;



**4.2.2. A sandwich enzyme linked immunosorbent assay to detect rabies antibodies in sera of different species.**

Batista, H.B.C.R.<sup>1</sup>; Petzhold, S.A.<sup>4</sup>. Lima, F.E.S.<sup>1</sup>; Kunert, H.<sup>1</sup>; Roehe, L.R.<sup>1</sup>; Santos, T.B.<sup>4</sup>; Gigoletti, R.<sup>4</sup>; Pacheco, S.M.<sup>3</sup>; Rolim, N.<sup>5</sup>; Franco, A.C<sup>1</sup>; Roehe,P.M.<sup>1,2</sup>

1-Virology Laboratory, DEMIP-ICBS / Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

2-FEPAGRO Animal Health - Veterinary Research Institute “Desidério Finamor”, Eldorado do Sul, RS, Brazil

3- SAUVER Institute, Porto Alegre, RS, Brazil

4- Labovet Laboratory, Eldorado do Sul, RS, Brazil

5- Universidade Estadual do Ceará

***MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO***

**Abstract:**

A sandwich ELISA (S-ELISA) was developed to detect antibodies to rabies virus in sera of different species. The test was performed as follows: ELISA plates were coated with polyclonal mouse/anti-rabies antibodies for 2 hours at 37°C. After adsorption, plates were washed and non-specific binding blocked with 2% powdered milk. In a separate plate, serial threefold dilutions of test sera were incubated with inactivated rabies virus antigen. The mixtures were then placed on the rabies antibody-coated plates and incubated. These were then washed and incubated with polyclonal rabbit/anti-rabies antibodies. Subsequently, a rabbit/IgG-peroxidase conjugate was added and plates incubated. After washing, the chromogen (ABTS with 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was added to plates and after incubation for 30 min were read in a spectrophotometer (OD<sub>405</sub>). To validate the S-ELISA, 128 serum samples including humans, cattle, hematophagous and non-haematophagous bats, mice, marmosets, ocelots - *Leopardus pardalis*, raccoons - *Procyon lotor*, jaguarondi - *Herpailurus yaguarondi*, fox - *Cerdocyon thous* and coati - *Nasua nasua*, were tested and compared to a standard fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN). In comparison to FAVN, the S-ELISA showed good sensitivity (82.98%) and specificity (100%), with an accuracy of 87.5%. Subsequently, 738 serum samples from different species were tested in the S-ELISA. Antibodies to rabies were detected by S-ELISA in all species tested, with the exception of the three serum samples from raccoons. The S-ELISA was shown to be a serological test of low cost that can be easily implemented in diagnostic laboratories. In addition, no live animals, infectious virus, cell culture or fluorescence microscopy are required for performance of the test. This is an additional advantage of the S-ELISA over other methods of rabies antibody detection.

**Key words:** rabies virus; antibody, different species and S-ELISA

## Introduction

Rabies virus (RABV), a member of the *Lyssavirus* genus within the family *Rhabdoviridae* (Tordo, 1996), is a negative strand RNA virus, the causative agent of rabies, a terrifying disease responsible for approximately 50 000 humans deaths/year, apart from causing major economic losses and becoming a burden not only to public health but also to farming, particularly cattle production. Rabies is maintained in nature by different cycles, which reflect the adaptation of the virus to one or more animal species in a particular region (Wiktor and Koprowski, 1982). Therefore, RABV reservoirs may vary in function of the virus' adaptation to new hosts in distinct environments. In Latin America, for instance, in the “sylvatic cycle”, the main RABV reservoir is the haematophagous bat *Desmodus rotundus* (Baer,1975). However, still little is known about the role for other wild species on the biology of the virus in that region.

To search for new potential reservoirs and to investigate the participation of other species in RABV biology, tools that allow antibody detection in different species are essential. To date, most serological tests designed to detect rabies antibodies are species-specific (Cliquet, *et al.*, 2000) or use monoclonal antibodies (Sugiyama, *et al.*, 1997). The c-ELISA developed by Sugiyama *et al* (1997) and the IIA developed by Batista *et al* (2011) could be used for antibodies detection in different species, but were tested with only one specie. In addition, most available tests require large volumes of sera for its performance, what sometimes may represent a major inconvenience when dealing with species of small size.

To bypass such drawbacks, a sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) was developed to detect rabies antibodies in sera of different species. The present article reports the comparison of the S-ELISA test with a neutralization-based assay, the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN).

## Materials and Methods

Serum samples: A total of 738 serum samples from different species were tested for antibodies to rabies. The species of origin of the sera under test are listed on Table 1.

Bat sera were obtained from free-living bats, whereas serum samples from other wild species were collected from animals kept in captivity. The sera from humans and from cattle included samples from individuals with different vaccine histories. Some serum samples were also collected from experimentally infected mice.

Serum samples were separated in two groups; the first (group one) consisted of sera considered of poor quality and, as judged by the appearance of the specimens, the sera were hemolysed, including the presence of visually detectable sediments. The second (group 2) consisted of serum samples of good quality as judged by visual inspection. All samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

Table 1: Species of origin of serum samples used in the comparison between the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) and the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN).

	<i>Number of sera examined by S-ELISA</i>		<i>Number of sera examined by FAVN</i>	
	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2
Haematophagous bat ( <i>Desmodus rotundus</i> )	21	13	10	7
Non haematophagous bat ( <i>Tadarida brasiliensis</i> )	42	40	4	1
Marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> )	26	6	2	2
Fox ( <i>Cerdocyon thous</i> )	-	1	-	1
Ocelot ( <i>Leopardus pardalis</i> )	-	4	-	3
Jaguarondi ( <i>Herpailurus yaguarondi</i> )	-	1	-	1
Raccoon ( <i>Procyon lotor</i> )	-	3	-	2
Coati ( <i>Nasua nasua</i> )	-	1	-	1
Bovine ( <i>Bos Taurus</i> )	-	148	-	26
Mice ( <i>Mus musculus</i> )	-	50	-	4
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	-	382	-	80
Total	89	642	16	128

Footnote for table: - = not tested

Cells: The “baby hamster kidney” (BHK) cell lineage (originally from ATCC CCL-10) was used in the FAVN and for S-ELISA antigen preparation. Cell cultures were cultivated in Eagle’s minimal essential medium (EMEM, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell, Campinas, Brazil) and antibiotics (penicillin 100 IU/ml; streptomycin 100 µg/ml). Cells were split at least once a week following usual procedures (Bussereau *et al.* 1982).

Virus: The rabies virus (RABV) strain “PV” (“Pasteur virus”) was multiplied in BHK cells. A virus suspension (200µl in MEM) was added to semiconfluent, overnight grown BHK monolayers and after 60 min for adsorption, EMEM (supplemented as above) was added and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 72 hours. Virus stocks were aliquoted, titrated and stored at -70°C until use.

Preparation of antigen for ELISA: Rabies virus strain PV was multiplied in BHK-21 cells for 72 hours and inactivated for 6 hours at 37°C with binary ethyleneimine (BEI) as recommended (Bahnmann H.G., 1975)

Sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) procedure: ELISA plates were coated with 50 µl/well of a previously determined dilution of polyclonal mouse/anti-rabies serum (1:2000 in bicarbonate buffer: 1.59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93 g NaHCO<sub>3</sub>, dH<sub>2</sub>O q.s.p. 1 l, pH 9.6), for 2 hours at 37°C. After coating, plates were washed three times with wash buffer (8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 ml Tween 20, dH<sub>2</sub>O q.s.p. 1 l, pH 7.2). Non-specific reactions were blocked with 2% powdered milk in dilution buffer (1 ml Tween 20, 40 g NaCl, 60 g bovine serum albumin fraction V, 80 ml of 1% Phenol Red, double distilled H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 l, pH 7.4) for 30 minutes at 37°C. Serial threefold dilutions of test sera were previously incubated with an appropriate dilution of the antigen (1:10 in dilution buffer, as determined by previous titration) in the microplate wells and incubated for 1 hour at 37°C. Next, plates were washed as above and incubated with 50 µl/well of an appropriate dilution (1:500 in dilution buffer) of polyclonal rabbit/ anti-rabies serum for 1 hour at 37°C. After incubation, plates were washed again and 50 µl of rabbit/IgG-peroxidase conjugate (1:2000 in dilution buffer) were added to each well. After another round of three washes, the chromogen ABTS (2,2'- Azinobis, 3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt in citric acid solution: 6.4g Citric acid monohydrate, double distilled H<sub>2</sub>O q.s.p. 500 ml, pH 4) plus

0.15% hydrogen peroxide was added to the wells. The plates were incubated in the dark for 30 min at room temperature. Absorbance at 405 nm was read in an ELISA plate reader (Multiskan). An international reference serum (Pasteur Institute, São Paulo, Brazil), diluted to a final concentration of 0.5 IU/ml was included in each battery of tests. By comparison with the international reference serum, the results of test sera are expressed in EU/ml (equivalent units per ml of serum).

Fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN): The FAVN was performed by as recommended (WHO, 2005). Briefly, sera were tested in serial threefold dilution (1/3 to 1/81), in quadruplicate. One hundred, fifty per cent tissue culture infective doses (TCID<sub>50</sub>) of RV strain PV were mixed with sera and incubated at 37°C for 1 hour in a moist 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After incubation, BHK-21 cells (4 x 10<sup>5</sup> cells/ml) were added to each well (50 µl/well). The plates were then incubated at 37°C for 48 hours in a moist 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After incubation, the supernatant medium was removed and monolayers fixed with 80% cold acetone solution for 30 min at room temperature. Once fixed, the monolayers were stained by the addition of anti-rabies/fluorescein conjugate (1:160 in PBS; 50 µl/well) and incubated at 37 °C for 30 min. Following washes, the glycerin was added and the plates were examined on an epifluorescence microscope (Axiolab, Carl Zeiss). The total area of each well was examined. The reference serum (0.5 IU/ml) was included in each battery of tests and results of test sera expressed in EU/ml by comparison with the reference serum.

Statistical analyses: The results obtained with ELISA were compared with the results of FAVN. Serum antibody titres were calculated by the Reed and Muench method (1938), and expressed in EU/ml by comparison with the results of the reference serum (Smith, 1996). Antibody titres  $\geq 0.5$  EU/ml were considered positive for rabies antibodies (WHO, 2005), whereas antibody titres  $< 0.5$  EU/ml were considered negative for rabies antibodies. A total of 128 sera were used for calculation of the test's sensitivity, specificity, accuracy, predictive positive and negative values and Cohen's Kappa correlation coefficient. Calculations were performed with aid of the DAG Stat (Diagnostic and Agreement Statistics) spreadsheet in the Microsoft Office Excel program.

## Results

The comparison between results obtained at S-ELISA and FAVN is shown in tables 2 and 3. From the 128 sera examined by S-ELISA and FAVN, 78 (60.94%) were positive in both tests, whereas 94 (73.44 %) were positive at FAVN. All 34 negative samples in FAVN (< 0.5 EU/ml) were negative for rabies antibodies at the S-ELISA. The disagreement between S-ELISA and FAVN was 12.5% (16/128), represented by sixteen false negative sera in S-ELISA. The comparison between results obtained at S-ELISA and FAVN is shown in Table 4. As the S-ELISA displayed adequate sensitivity and specificity, we proceeded onto testing the 738 serum samples collected from different species (Table 4). From these 49.9% (368/738) were positive at S-ELISA. Table 3 shows S-ELISA positive results and the species of origin of each serum sample. Rabies antibodies were detected in at least one of the samples from every species tested with the exception of raccoons, from which the only three serum samples available resulted negative at the S-ELISA.

Table 2: Comparison between results obtained with the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) and the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) at detection of rabies antibodies in 128 sera from different species.

	S-ELISA + <sup>a</sup>	S-ELISA - <sup>b</sup>	Total
FAVN +	78	16	94
FAVN -	0	34	34
Total	78	50	128

Footnotes for table:

<sup>a</sup> Positive (+) refers to sera with titers  $\geq 0.5$  EU/ml in comparison to the reference serum. <sup>b</sup> Negative (-) refers to sera with titers <0.5 EU/ml.

Comparison evaluation of tests:

Accuracy: 87.5%,

Sensitivity: 82.98%,

Specificity: 100%,

Positive predictive value: 100%,

Negative predictive value: 68%

Cohen's Kappa correlation coefficient= 0.72.

Table 3: Positive results obtained with the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) and the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) at detection of rabies antibodies in each tested specie.

	<i>Number of sera examined at FAVN and S-ELISA</i>	<i>Number of positive sera at FAVN</i>	<i>Number of positive sera at S-ELISA</i>
Haematophagous bat ( <i>Desmodus rotundus</i> )	7	0	0
Non haematophagous bat ( <i>Tadarida brasiliensis</i> )	1	1	1
Marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> )	2	1	1
Fox ( <i>Cerdocyon thous</i> )	1	1	1
Ocelot ( <i>Leopardus pardalis</i> )	3	2	1
Jaguarondi ( <i>Herpailurus yaguarondi</i> )	1	1	1
Raccoon ( <i>Procyon lotor</i> )	2	0	0
Coati ( <i>Nasua nasua</i> )	1	1	1
Bovine ( <i>Bos Taurus</i> )	26	10	8
Mice ( <i>Mus musculus</i> )	4	2	2
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	80	75	62
Total	128	94	78



Table 4: Species of origin and number of serum samples tested for rabies antibodies by the sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA); n= 738.

	<i>Number of examined sera</i>	<i>Number of antibody-positive sera n (%)</i>
Haematophagous bat ( <i>Desmodus rotundus</i> )	34	0 (0)
Non haematophagous bat ( <i>Tadarida brasiliensis</i> )	82	4 (4.88)
Marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> )	32	11 (34.38)
Fox ( <i>Cerdocyon thous</i> )	1	1 (100)
Ocelot ( <i>Leopardus pardalis</i> )	4	2 (50)
Jaguarondi ( <i>Herpailurus yaguarondi</i> )	1	1 (100)
Raccoon ( <i>Procyon lotor</i> )	3	0 (0)
Coati ( <i>Nasua nasua</i> )	1	1 (100)
Bovine ( <i>Bos Taurus</i> )	148	5 (3.38)
Mice ( <i>Mus musculus</i> )	50	5 (10)
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	382	338 (88.5)

## Discussion

Rabies is maintained in nature by different cycles, reflecting the degree of adaptation of the virus to different animal species in each region (Wiktor and Koprowski, 1982). In Latin America, the haematophagous bat *Desmodus rotundus* is the main RABV reservoir in the “sylvatic cycle”. However, many non-haematophagous bats were found infected with RABV. Recent studies demonstrate the immunological response to rabies in bats and suggested that frequent contact to sublethal doses of RABV may result in immunity. The potential transmission of rabies between the non-haematophagous bats and other rabies vectors, was proven, as described by Schaefer, *et al.* (2002) and Batista *et al.* (2009).

The epidemiological role of the non-haematophagous bats and other wild species in the rabies maintenance in nature is still unknown. The serology will be so important to study new rabies reservoirs or to identify the epidemiological importance of these species in the maintenance of the virus in nature.

The S-ELISA introduced in the present study was compared with the FAVN, a gold standard test. The S-ELISA displayed a strong correlation with the FAVN

(Accuracy= 87.5% and Cohen's Kappa correlation coefficient= 0.72), with good specificity (100%) and sensitivity (82.98%).

The S-ELISA was efficient to detect rabies antibodies in sera from many animal species and humans. Such species may be easily tested for the presence of rabies antibodies without the need of rare conjugates (such as "anti-bat IgG conjugate", or "anti-marmoset"), not as easily available as the anti-rabbit IgG conjugate employed in the S-ELISA. In addition, the S-ELISA does not require large volumes of high quality test serum, it does not require expensive equipment for antigen preparation or fluorescence microscopy for the results reading and no live animals, infectious virus, cell culture are required for performance of the test.

The S-ELISA has many additional advantages over other methods of rabies antibody detection. In conclusion, the results of this study demonstrate that the S-ELISA is practical and efficient assay to detect and measure antibodies to rabies virus in many different animal species and humans.

## References

- Baer, G.M., 1975. Bovine paralytic rabies and rabies in vampire bat. In: Baer, G.M. (Ed.), *Natural History of Rabies*. Academic Press, London, pp. 155–175. Bourhy, H., Kissi, B., Tordo, N., 1993.
- Batista, H.B.C.R.; Lima, F.E.S.; Maletich, D., Silva, A.C.R.; Vicentini, F.K.V; Roehe, L.R.; Spilki, F.R.; Franco, A.C; Roehe,P.M. 2011. Immunoperoxidase inhibition assay (IIA) for rabies antibody detection. *Aceito Journal of virological methods*
- 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., 2009. Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant. *Acta Scient. Vet.* 37: 391-394.
- Bahnemann, H.G., 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol.* 47(1):47-56.
- Carnieli Jr, P., Fahl, W.O., Brandão, P.E., Oliveira, R.N., Macedo, C.I., Durymanova, E., Castilho, J.G., 2010. Comparative analysis of rabies virus isolates from Brazilian canids and bats based on the G gene and G-L intergenic region. *Arch. Virol.* 941-948.
- Cisterna, D., Bonaventura, R., Caillou, S., Pozo, O., Andreau, M.I., Fontana, L.D., Echegoyen, C., Mattos, C., Mattos, C., Russo, S., Novaro, L., Elberger, D., Freire, M.C., 2005. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. *Virus Res.* 109: 139-147.
- Cliquet, F., Sagne, L., Schereßer, A.J.L., Aubert, M.F.A., 2000. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine.* 3272-3279
- Favi, M., de Mattos, C.A., Yung, V., Chala, E., López, L.R., de Mattos, C., 2002. First Case of Human Rabies in Chile Caused by an Insectivorous Bat Virus Variant. *Emerg. Infect. Dis.* 79-81.

Favoretto, S.R., de Mattos, C.C, Morais, N.B., Araújo, F.A.A., de Mattos, C.A., 2001. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 1062-1065

Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha EM, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. 2007. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Arch Virol.* 152: 1995-2004.

Reed, L.J., Muench, H.A., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 493-497.

Schaefer R., Caldas E., Schmidt E., King A.A., Roehe P.M. 2002. First case of cat rabies in Southern Brazil for 11 years. *Vet. Record.* 150(7): 216-217.

Schaefer R., Batista H.B.C.R., Franco A.C., Rijsewijk F.A., Roehe P.M. 2005. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Vet. Microbiol.* 107(3): 161-170.

Sodré, M.M., Gama, A.R., de Almeida, M.F., 2010. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 52:75-81.

Sugiyama, M., Yoshiki. R., Tatsuno, Y., Hiraga, S., Itoh, O., Gamoh, K., Minamoto, N., 1997. A New Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Demonstrates Adequate Immune Levels to Rabies Virus in Compulsorily Vaccinated Japanese Domestic Dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 727-730.

Tordo, N., 1996. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin, F.-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization, Geneva, pp. 28–51.

Wiktor, T.J., Koprowski, H., 1982. Does the existence of rabies antigenic variants warrant re-evaluation of rabies vaccine? In: *Primeira Conferência Internacional sobre o impacto das Doenças Virais no Desenvolvimento dos Países Latino-Americanos e da Região do Caribe*, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 94–112.

**5. CAPÍTULO 3:  
DISCUSSÃO GERAL**

O vírus da raiva é considerado, dentre os vírus com genoma de RNA, um daqueles mais estáveis antigênicamente e genômicamente (TORDO, 1996). Entretanto, a possibilidade de transmissão do mesmo entre diferentes espécies e a necessidade de adaptação a uma nova espécie hospedeira contribui para aumentar as chances de geração de novas variantes. Estas variantes são bastante estáveis, uma vez que são mantidas suas características antigênicas e genômicas mesmo após algumas passagens do vírus em um hospedeiro distinto. Como é o caso de amostras de morcegos hematófagos, cujos perfis antigênico e genômico ainda podem ser identificados em bovinos (BATISTA, *et al* 2007).

Em vista disso, a análise de tais variantes, isoladas a partir de diferentes relações com os hospedeiros, ajuda a entender a dinâmica da manutenção do vírus na natureza. O primeiro capítulo desta tese reporta um caso de um canino infectado por uma amostra de vírus rábico com características de amostras isoladas de morcegos insetívoros da espécie *Tadarida brasiliensis* (BATISTA, *et al.*, 2009). O caso ocorrido no Município de Tapes, leste do Rio Grande do sul, foi o primeiro registro de raiva canina no Estado, após 19 anos. Caso semelhante já havia sido reportado no Município de São Lourenço do sul (SCHAEFER, *et al.*, 2002), a 125 km de Tapes, onde um felino fora infectado também com uma amostra com características semelhantes às amostras de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*. O isolamento do RABV em morcegos insetívoros no Brasil, ocorreu pela primeira vez no Rio Grande do sul no Município de São Leopoldo e foi descrito por Bauer em 1965. Posteriormente a este relato, diversos outros estudos descrevem o isolamento do RABV em morcegos não hematófagos de diferentes espécies no Brasil (SCHAEFER, *et al.*, 2005; KOBAYASHI, *et al.*, 2007; CARNIELI, *et al.*, 2010). Recentemente foi publicada uma lista com todas as espécies de morcegos já identificadas com o RABV no Brasil, a lista inclui 41 espécies de 25 gêneros e três famílias (SODRÉ, *et al.*, 2010).

No Brasil ainda não foram identificados casos de raiva humana transmitida por morcegos não hematófagos, como já ocorreu no Chile, que registrou em 1996 o primeiro caso de raiva humana transmitida por um morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* (FAVI, *et al.*, 2002). Evidentemente a ocorrência de raiva em morcegos não hematófagos aumenta o risco aos seres humanos, uma vez que diversas espécies infectadas têm hábitos sinantrópicos, co-habitando os centros urbanos com os seres humanos (KOBAYASHI, *et al.*, 2007). Cabe o alerta para a necessidade de uma abordagem voltada ao controle da raiva em morcegos não hematófagos, uma vez que

aumentou significativamente o relato de casos de raiva nestes morcegos. Este é um fato, porém, que deve ser avaliado com cautela, já que não há dados suficientes para determinar se houve um aumento da infecção nas colônias destes morcegos ou se houve apenas um aumento no relato destes casos.

Já o segundo trabalho que compõem o primeiro capítulo desta tese (1.2) descreve o primeiro registro do vírus da raiva em morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus* no RS (PACHECO, *et al.*, 2010). A amostra de vírus rábico isolada do morcego encontrado na região urbana do Município de Dois Irmãos, apresentou características antigênicas e genômicas semelhantes às características de amostras isoladas de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*. Este resultado não surpreende uma vez que eventos de transmissão inter-espécie entre morcegos hematófagos e morcegos frugívoros têm sido descritos (KOBAYASHI, *et al.*, 2005 e 2007; SHOJI, *et al.*, 2004).

Devido a semelhanças nos hábitos de morcegos frugívoros e hematófagos, geralmente a variante de vírus rábico isolada em morcegos frugívoros, apresenta características antigênicas e genômicas semelhantes às características da variante identificada em morcegos hematófagos. O trabalho de KOBAYASHI, *et al.*, (2007), inclui 10 amostras de vírus rábico isoladas de diferentes espécies de morcegos frugívoros, tais amostras foram todas agrupadas com as amostras isoladas de morcegos hematófagos, por apresentarem características semelhantes entre si. O trabalho de VELASCO-VILLA *et al* (2006) descreve a ocorrência de raiva em um morcego frugívoro (*Artibeus jamaicensis*) no México, infectado com uma variante do vírus rábico com características semelhantes às amostras de vírus rábico isoladas de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*.

A detecção do vírus rábico em um morcego frugívoro, não representa fato novo na história recente da raiva, uma vez que já em 1977 DELPRIETRO, *et al* descreveram a ocorrência de raiva em diferentes espécies morcegos frugívoros. A descrição do caso no RS, porém, ilustra que o ciclo aéreo da raiva mantido por morcegos frugívoros no Estado apresenta características semelhantes ao ciclo mantido por morcegos frugívoros de outras regiões do Brasil.

A identificação do RABV em espécies insetívoras de morcegos alerta para a identificação de novos reservatórios da raiva. Já a identificação de espécies frugívoras de morcegos alerta para a inter-relação entre os ciclos epidemiológicos da raiva. Uma vez que se pretenda manter a raiva urbana controlada é fundamental que se conheça o

papel desempenhado por estes morcegos na manutenção do vírus (ALMEIDA, *et al.*, 1994). Uma vez que a associação entre fatores genéticos do vírus, fatores ambientais e o desmatamento podem auxiliar no desequilíbrio das populações de morcegos, gerando o aumento no risco de raiva aos seres humanos.

Estudos complementares devem ser realizados a fim de investigar a relação entre morcegos de diferentes espécies e a manutenção do vírus rábico em variadas situações epidemiológicas. Além da análise das variantes de vírus rábico envolvida em cada ocorrência de raiva, a detecção de anticorpos contra o vírus da raiva pode também auxiliar no entendimento da manutenção deste vírus na natureza. Diversos estudos já demonstraram a presença de anticorpos contra o vírus da raiva em diferentes espécies de morcegos. A dinâmica da manutenção do vírus em colônias naturalmente infectadas, porém, ainda é pouco conhecida. Com objetivo de colaborar com o conhecimento sobre a raiva, foram desenvolvidos durante este trabalho dois testes sorológicos para detecção de anticorpos contra raiva.

O desenvolvimento e a aplicação destes testes sorológicos compõem o segundo capítulo desta tese. Inicialmente foi desenvolvida o ensaio de inibição da imunoperoxidase (Immunoperoxidase inhibition assay/IIA). A IIA foi testada frente a 422 amostras de soros de origem humana e comparada com o microteste simplificado de inibição da imunofluorescência (Simplified fluorescence inhibition microtest/SFIMT), teste sorológico desenvolvido por FAVORETTO, *et al.*, em 1993, reconhecido pelo Ministério da Saúde do Brasil. Os resultados demonstraram que a IIA foi altamente eficaz em comparação com o SFIMT, quando foram utilizados soros humanos.

Em busca de comprovar a possibilidade de identificação de anticorpos contra raiva em amostras de soro de diferentes espécies, foi desenvolvido o ensaio imunoenzimático do tipo sandwich (Sandwich enzyme linked immunosorbent assay/S-ELISA). O teste de S-ELISA foi inicialmente comparado com o teste padrão para detecção de anticorpos contra raiva: Fluorescent Antibody Vírus Neutralization (FAVN) e foram utilizadas amostras de soros de diferentes espécies, incluindo morcegos, sagüis, raposas, felinos silvestres, guaxinis, quatis, bovinos, camundongos e humanos. A comparação entre o S-ELISA e a FAVN, demonstrou ser o teste desenvolvido neste trabalho eficaz na identificação de anticorpos contra diferentes espécies.

Estudos recentes sugerem que o contato freqüente de morcegos com doses subletais de vírus pode resultar em imunidade, possibilitando a proteção frente a uma



infecção subsequente. A avaliação da resposta imunológica contra raiva em colônias de morcegos naturalmente infectados é fundamental para a compreensão da dinâmica de manutenção do vírus rábico na natureza.

Dentro dos limites do experimento a IIA e o S-ELISA, são capazes de detectar anticorpos contra raiva em diferentes espécies. Esta é a grande vantagem dos testes sorológicos aqui descritos e assim possibilitando além do estudo sobre a imunologia da raiva em morcegos e a identificação de novos reservatórios da raiva.

A associação das duas ferramentas descritas neste trabalho (caracterização de amostras de vírus rábico e identificação de anticorpos contra raiva em diferentes espécies) pode auxiliar no maior conhecimento sobre a raiva no Brasil. Tais ferramentas podem ainda possibilitar um controle racional e mais eficaz da raiva no Brasil, evitando assim o desperdício de recursos financeiros e a matança indiscriminada de espécies silvestres da fauna brasileira, principalmente morcegos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M.F.; Aguiar, E.A.C.; Martorelli, L.F.A. & Silva, M.M.S. 1994. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. *Revista de saúde Pública*. 341-344.

Almeida, M.F.; Martorelli, L.F.A.; Aires, C.C., Barros; R.F. & Massada, E., 2008. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. *Virus research*. 137:275-277.

Atanasiu, P.; Savy, V. & Perrin P. 1977. Rapid detection of rabies antibodies by immunoenzymatic assay. *Annales de Microbiologia*. 128:489-498.

Baer, G.M. 1975. Bovine paralytic rabies and rabies in vampire bat. In: Baer, G.M. (Ed.), *Natural History of Rabies*. Academic Press, London, pp. 155–175. Bourhy, H., Kissi, B., Tordo, N., 1993.

Bahloul, C.; Taieb, D.; Kaabi, B.; Diouani, M.F.; Ben Hadjahmed, S.; Chtourou, Y.; Imen B'Chir, B. & Dellagi, K. 2005. Comparative evaluation of specific ELISA and RFFIT antibody assays in the assessment of dog immunity against rabies. *Epidemiology and Infection*. 133:749-757.

Bahnemann, H.G. 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Archives of Virology*. 47(1):47-56.

Banerjee, A.K. 1987. Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiology Reviews*. 52:66-87.

Barton, L.D. & Campbell, J.B. 1988. Measurement of rabies-specific antibodies in carnivores by an enzyme linked immunosorbent assay. *Journal of Wildlife Disease*. 24:246-258.

Batista, A.M.; Cruz, P.S.; Almeida, E.; Costa, A.E.B.; Scheffer, K.C.; Chaves, L.B.; Silva, A.C.R. & Caporale, G.M.M., 2009. Infection of BHK-21 cells cultivated in stationary monolayers by PV and CVS strains. *Boletim Epidemiológico Paulista*. 6:4-11.

Batista, H.B.C.R.; Lima, F.E.S.; Maletich, D., Silva, A.C.R.; Vicentini, F.K.V; Roehe, L.R.; Spilki, F.R.; Franco, A.C. & Roehe, P.M. 2011. Immunoperoxidase inhibition assay (IIA) for rabies antibody detection. *Aceito Journal of virological methods*.

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. 2009. Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant. *Acta Scientiae Veterinariae* 37:391-394.

Batista, H.B.C.R.; Roehe, P.M. & Franco, A.C. 2007. Rabies: a brief review. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35:125-144.

Batista, H.B.C.R.; Schmidt, E.; Teixeira, T.F.; Schaefer, R. & Roehe, P.M. 2008. Caracterização antigênica de amostras do vírus da raiva isoladas nas regiões Norte e Centro Oeste do Brasil com anticorpos monoclonais anti-lissavírus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60:260-262.

Bauer, A.G. & Crusius, V. A. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro na cidade de São Leopoldo no Rio Grande do Sul. In: Conferência Anual da Sociedade Veterinária do Rio Grande do Sul, 4. Porto Alegre, 1965. p. 95.

Bernardi, F.; Nadin-Davis, S.A.; Wandeler, A.I.; Armstrong, J.; Gomes, A.A.B.; Lima, F.S.; Nogueira, F.R.B. & Ito, F.H. 2005. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *Journal of General Virology*. 86:3153-3162.

Bordignon, J.; Brasil-dos-Anjos, G.; Bueno C.R.; Salvatiera-Oporto, J.; Dávila, A.M. R.; Grisard, E.C. & Zanetti, C.R. 2005. Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. *Archives of Virology*. 150:695-708.

Bordignon, J.; Comin, F.; Ferreira, S.C.P.; Caporale, G.M.M.; Lima Filho, J.H.C. & Zanetti, C.R. 2002. Calculating rabies virus neutralizing antibodies titres by flow cytometry. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 44:151-154.

Bordignon, J.; Grisard, E.C. & Zanetti, C.R. 2005. Molecular detection and characterization of rabies virus in Brazil: new approaches for epidemiology and surveillance. *Virus Reviews and Research*. 10:14-22.

Bourhy, H.; Kissi, B. & Tordo, N. 1993. Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*. 194:70-81.

Cardoso, T.C.; Queiroz da Silva, L.H.; Albas, A.; Ferreira, H.L. & Perri, S.H.V. 2004. Rabies neutralizing antibody detection by indirect immunoperoxidase serum neutralization assay performed on chicken embryo related cell line. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99:531-534.

Carnieli, Jr, P.; Fahl, W.O.; Brandão, P.E.; Oliveira, R.N.; Macedo, C.I.; Durymanova, E. & Castilho, J.G. 2010. Comparative analysis of rabies virus isolates from Brazilian canids and bats based on the G gene and G-L intergenic region. *Archives of Virology*. 155(6):941-948.

Castilho, J.G.; Canello, F.M.; Scheffer, K.C.; Achar, S.M.; Carrieri, M.L. & Kotait, I. 2008. Antigenic and genetic characterization of the first rabies virus isolated from the *Eumops perotis* in Brazil. *Revista do Insituto Medicina Tropical de São Paulo*. 50(2): 95-99.

Charlton, K.M. 1988. The pathogenesis of rabies. In: Rabies. Campbell J.B & Charlton K.M. (Eds.). Boston: Kluwer Academic Publishers, pp.101-150.

Cisterna, D.; Bonaventura, R.; Caillou, S.; Pozo, O.; Andreau, M.I.; Fontana, L.D.; Echegoyen, C.; Mattos, C.; Mattos, C.; Russo, S.; Novaro, L.; Elberger, D. & Freire, M.C., 2005. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. *Virus Research*. 109:139-147.

Cliquet, F.; Aubert, M. & Sagné, L. 1998. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *Journal of Immunological Methods*. 212:79-87.

Cliquet, F.; Sagne, L.; Schere€er, A.J.L. & Aubert, M.F.A. 2000. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*. 1-18(28):3272-3279.

Cliquet, F.; McElhinney, L.M.; Servat, A.; Boucher, J.M.; Lowings, J.P.; Goddard, T.; Mansfield, K.L. & Fooks, A.R. 2004. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *Journal of Virological Methods*. 117:1-8.

Coll, J.M. 1995. The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Archives of Virology*. 140:827-851.

Cox, J.H.; Dietzschold, B. & Schneider, L.G. 1977. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infection and Immunity*. 16:754-759.

Cox, J.H. 1982. The structural proteins of rabies virus. *Comparative Immunological Microbiology Infectious Diseases*. 5:21-25.

Cunha, E.M.S.; Lara, M.C.; Nassar, A.F.; Sodré, M.M. & Amaral, L.F. 2005. Isolation of rabies virus in *Artibeus fimbriatus* bat in state of Sao Paulo. *Revista de Saúde Pública*. 39:683-684.

David, D.; Hughes, G.J.; Yakobson, B.A.; Davidson, I.; Un, H.; Aylan, O.; Kuzmin, I.V. & Rupprecht, C.E. 2007. Identification of novel canine rabies virus clades in the Middle East and North Africa. *Journal of General Virology*. 88:967-980.

Davies, M.C.; Englert, M.E.; Sharpless, G.R. & Cabasso, V.J. 1963. The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. *Virology*. 21:642-651.

Dean, D.J.; Ableseth, M.K. & Atanasiu, P. 1996. The fluorescent antibody test. In: *Laboratory techniques in rabies*. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski (Eds). 4th edn. Geneva: World Health Organization, pp.88-95.

Delpietro, H. A.; Gury-Dhomen, F.; Larghi, O. P.; Mena-Segura, C. & Abramo, L. 1997. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*. 44:477-483.

Deus, G.T.; Becer, M. & Navarro, I.T. 2003. Diagnóstico da raiva em morcegos não hematófagos na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Centro Oeste do Brasil: Descrição de casos. *Semina: Ciências Agrárias*. 24(1):171-176.

Díaz, A.M.; Arispe, E.; Bruneí, C.; Cavándoli, C.; Dellepiane, N. & Miranda, A. 1986. La tecnica de contrainmunolectroforesis para la determinacion de anticuerpos antirrabicos. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 101:255-262.

Dietzschold, B.; Wunner, W.H.; Wiktor, T.J.; Lopes, A.D.; Lafon, M.; Smith, C.L. & Koprowski, H. 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with the pathogenicity of rabies virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 80:70-74.

Dietzschold, B.; Lafon, M.; Wang, H.; Otvos, L. Jr.; Celis, E.; Wunner, W.H. & Koprowski, H. 1987. Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus Research*. 8:103-125.

Doc. Eletrônico (internet) Manual Técnico do Instituto Pasteur. (Kotait I., org.) número 1 – Controle da raiva dos herbívoros Instituto Pasteur São Paulo. 23p. Disponível em: [http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes\\_publicacoes.htm](http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_publicacoes.htm)  
Acessado em 26/01/2011.

East M.L.; Hofer H.; Cox J.H.; Wulle U.; Wiik H. & Pitra C. 2001. Regular exposure to rabies virus and lack of symptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 98:15026-15031.

Eisenberg, J.F. & Redford, K.H. 1999. *Mammals of the Neotropics*. Vol. 3, The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. Chicago: University of Chicago. 609 pp.

Elmgren, L.D. & Wandeler, A.I. 1996. Competitive ELISA for the detection of rabies virus-neutralizing antibodies. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Eds). 4th edn. Geneva: World Health Organization, 200-208.

Esbérard, C.E.L.; Nogueira, T.J.; Luz, J.L.; Melo, G.G.S.; Mangolin, R.; Juca, N.; Raices, D.S.L.; Enrici, M.C. & Bergallo, H.G. 2006. Morcegos da Ilha Grande, Angra dos Reis, Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecias*. 8:147-153.

Esterhuysen, J. J.; Prehaud, C. & Thomson, G.R. 1995. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *Journal of Virological Methods*. 51:31-42.

Favi, M.; de Mattos, C.A.; Yung, V.; Chala, E.; López, L.R. & de Mattos, C. 2002. First Case of Human Rabies in Chile Caused by an Insectivorous Bat Virus Variant. *Emerging Infectious Diseases*. 8(1):79-81.

Favoretto, S.R.; de Mattos, C.C.; Morais, N.B.; Araújo, F.A.A. & de Mattos, C.A., 2001. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 7(6):1062-1065.

Favoretto, S.R.; Carrieri, M.L.; Tino, M.S.; Zanetti, C.R. & Pereira, O.A.C. 1993. Simplified fluorescent inhibition microtest for the titration of rabies neutralizing antibodies. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 35:171-175.

Fekadu, M. 1972. Atypical rabies in dogs in Ethiopia. *Ethiopian Medical Journal*. 10:79-86.

Feyssaguet, M.; Dacheux, L.; Audry, L.; Compoin, A.; Morize, J.L.; Blanchard, I. & Bourhy, H. 2007. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine*. 25:2244-2251.

Fuenzalida, E. & Palacios, R. 1955. Un método mejorado para la preparación de la vacuna antirrábica. *Boletín del Instituto de Bacteriología*. 8:3-10.

Gold, A.R.; Hyatt, A.D.; Lunt, R.; Kattenbelt, J.A.; Hengstberger, S. & Blacksell, S.D. 1998. Characterization of a novel lyssavirus isolated from pteropid bats in Australia. *Virus Research*. 54:165-187.

Gough, P.M. & Dierks, R.E. 1971. Passive hemagglutination test for antibodies against rabies virus. *Bulletin of the World Health Organization*. 45:741-745.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour.

Iseni, F.; Barge, A.; Baudin, F.; Blondell, D. & Ruigrok, R.W.H. 1998. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *Journal of General Virology*. 79:2909-2919.



Ito, M.; Arai, Y. T.; Itou, T.; Sazai, T.; Ito, F.H.; Takasaki, T. & Kurane 2001. Genetic characterization and geografic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology*. 284:214-222.

Ito, M.; Itou, T.; Shoji, Y.; Sazai, T.; Ito, F.H.; Arai, Y. T.; 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 polimorphism analysis. *Journal of Clinical Virology*. 26:317-330.

Iverson, L.E. & Rose, J.K. 1981. Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell*. 23:477-484.

Iwasaki, Y. 1991. Spread of virus within the central nervous system. In: *The Natural History of Rabies*. Boca Raton: CRC Press, pp.121-132.

Kawano, H.; Mifune, K.; Ohuchi, M.; Mannen, K.; Cho, S.; Hiramatsu, K. & Shichijo, A. 1990. Protection against rabies in mice by a cytotoxic T cell clone recognizing the glycoprotein of rabies virus. *Journal of General Virology*. 71:281-287.

King, A.A. 1991. Studies on the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. 371fl. PhD Tese. University of Surrey, Guildford, UK.

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. 2005. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *Journal of Veterinary Medical Science*. 67:647-652.

Kobayashi, Y.; Ogawa, A.; Sato, G.; Sato, T.; Itou, T.; Samara, S.I.; Carvalho, A.B.; Nociti, D.P.; Ito, F.H. & Sakai, T. 2006. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *Journal of Veterinary Medical Science*. 68:1097-1100.

Kobayashi, Y.; Sato, G.; Kato, M.; Itou, T.; Cunha, E.M.; Silva, M.V.; Mota, C.S.; Ito, F.H. & Sakai, T. 2007. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Archives of Virology*. 152:1995-2004.

Koprowski, H., 1996. The mouse inoculation test. In: Meslin, F.-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization, Geneva, pp. 80-86.

Koprowski, H. 2006. Raiva transmitida por morcegos hematófagos na região amazônica: Consulta de Expertos, Brasília, Organização Pan-Americana da Saúde.

Kotait, I.; Carrieri, M.L.; Carnieli, J.R.P.; Castilho, J.G.; Oliveira, R.N.; Macedo, C.I.; Ferreira, K.C.S. & Achkar, S.M. 2007. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Boletim de Epidemiologia Paulista*. 4(40):1-10.

Lodmell, D.L.; Espósito, J.J. & Ewalt L.C. 1993. Rabies virus anti-nucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro. *Journal of Virology*. 67:6080-6086.

Macedo, C. I.; Carnieli, P.J.; Brandão, P.E.; Rosa, E.S.T.; Oliveira, R.N.; Castilho, J.G.; Medeiros, R.; Machado, R.R.; Oliveira, R.C.; Carrieri, M.L. & Kotait, I. 2006. Diagnosis of human rabie cases by polimerase chain reaction of neck-skin samples. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 10:341-345.

Manual técnico do Instituto Pasteur. 2006. Raiva dos quirópteros. [Online]. Disponível em: <[http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes\\_02.htm](http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_02.htm)> Acessado em 12 de janeiro de 2011.

Marston, D.A.; McElhinney, L.M.; Johnson, N.; Muller, T., Conzelmann, K.K.; Tordo, N. & Fooks, A.R. 2007. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadeylation motif in the G-L 3' non-translated region. *Journal of General Virology*. 88:1302-1314.

Martorelli, L.F.; Aguiar, E. A.; Almeida, M.F.; Silva, M.M. & Novaes E.C. 1995. Isolation of rabies virus from the insectivorous bat *Myotis nigricans* Revista de Saúde Pública. 29:140-141.

Mebatsion, T.; Frost, J.W. & Krauss, H. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using staphylococcal protein for the measurement of rabies in various species. Journal of Veterinary Medicine B. 36:532-536.

Mebatsion, T.; Konig, M. & Conzelmann, K.K. 1996. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. Cell. 84:941-951.

Ministry of Health, Secretaria da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008. 1º edição. Manual de Diagnóstico Laboratorial da raiva, Brasilia- DF, Brasil.

Morimoto, K.; Hooper, D.C.; Spitsin, S.; Koprowski, H. & Dietzschold, B. 1999. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. Journal of Virology. 73:510-518.

Muhamuda, K.; Madhusudana, S.N. & Ravi, V. 2007. Development and evaluation of a competitive ELISA for estimation of rabies neutralizing antibodies after post-exposure rabies vaccination in humans. Internacional Journal of Infectious Diseases. 11:441-445.

Nicholson, K. G.; & Prestage, H. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay: a rapid reproducible test for the measurement of rabies antibody. Journal of Medical Virology. 9:43-45.

Niederhauser, S.; Bruegger, D.; Zahno, M.; Vogt, H.R.; Peterhans, E.; Zanoni, R. & Bertoni, G. 2008. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. Vaccine. 26:6749–6753.

Ogawa, T.; Gamoh, K.; Aoki, H.; Kobayashi, R.; Etoh, M.; Senda, M.; Hirayama, N.; Nishimura, M.; Shiraishi, R.; Servat, A. & Cliquet, F. 2008. Validation and standardization of virus neutralizing test using indirect immunoperoxidase technique for the quantification of antibodies to rabies virus. *Zoonoses Public Health*. 55:323-327.

OIE. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 9p.

Pacheco, S.M.; Sekiama, M.L.; Oliveira, K.P.A.; Quintela, F.; Weber, M.M.; Marques, R.V.; Geiger, D. & Silveira, D.D. 2007. Biogeografia de Quirópteros da Região Sul. *Ciência & Ambiente*. 35:181-202.

Pacheco, S.M.; Marques, R.V.; Grillo, H.C.Z.; Marder, E.; Bianconi, G.V.; Miretzki, M.; Lima, I.P. & Rosa, V.A. 2008. Morcegos em áreas urbanas da Região Sul do Brasil. In: *Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação*. Pacheco, S.M.; Marques, R.V.; Esbérard, C.E.L. (Org). Porto Alegre: Armazém Digital, 574 p.

Piza, A.S.; Santos, J.L.; Chaves, L.B. & Zanetti, C.R. 1999. An ELISA suitable for the detection of rabies virus antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell-culture vaccine or suckling-mouse-brain vaccine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 41:39-43.

Pompei, J.C.A. 2009. Avaliação do vampiricida gel 1% no controle seletivo direto em colônias de *Desmodus rotundus*. 44fl. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Brasil.

Rebhun W.C. 2000. Doenças do gado leiteiro. São Paulo. 1ª ed. Editora Roca, 642 p.

Reed, L.J. & Muench, H.A. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end-points. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 27:493-497.

Ridrigues, F.M.; Nagata, C.A.; Peixoto, Z.M. & Nilsson, M.R. 1975. Isolation of rabies virus from an insectivorous bat *Molossus obscurus* (Geoffroy, 1805), in the state of Sao Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*. 42:193-196.

Sambrook, J.; Fritsch, E. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. Ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory.

Sazima, I.; Fischer, W.A.; Sazima, M. & Fischer, E.A. 1994. The fruit bat *Artibeus lituratus* as a forest and city dweller. *Ciência & Cultura*. 46(3):164-168.

Schaefer, R.; Caldas, E.; Schmidt, E.; King, A.A. & Roehe, P.M. 2002. First case of cat rabies in Southern Brazil for 11 years. *Veterinary Record*. 150:216-217.

Schaefer, R.; Batista, H.B.C.R.; Franco, A.C.; Rijsewijk, F.A. & Roehe, P.M. 2005. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Veterinary Microbiology*. 107:161-170.

Scheffer, K.C.; Carrieri, M.L.; Albas, A.; Santos, H.C.P.; Kotait, O. & Ito, F.H. 2007. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 41(3):389-395.

Schneider, L.G. 1991. Spread of virus within the central nervous system. In Baer, G.M. *The Natural History of Rabies*. 2nd ed. Boca Raton, USA. RCR Press. p. 199-216.

Servat, A. & Cliquet, F. 2006. OIE Reference Laboratory for Rabies, WHO. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. *Virus Research*. 120:17-27.

Shankar, V.; Dietzschold B. & Koprowski H. 1991. Direct entry of rabies virus into central nervous system without prior local replication. *Journal of Virology*. 65:2736-2738.

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. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 66: 1271-1273.

Silva, L.P.; Ramos, O.S.; Xavier, S.M. & Reis, J.R. 2008. Vírus da raiva em quirópteros no município de Anajás, Estado do Pará, Brasil. [online]. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/combravet/2008/anais/cd>> Acessado em: 01 de junho de 2009.

Smith, J.S.; Yager, P.A. & Baer, G.M. 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bulletin World Health Organization*. 535-541.

Smith, J.S.; Yager, P.A. & Baer, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody In: Meslin, F-X.; Kaplan, M.M. & Koprowiski, H. (Eds). *Laboratory Techniques in rabies*. 4ed. World Health Organization Geneva: p. 181-192, 1996.

Sodré, M.M. & Esberard, C.E.L. 2008. Morcegos urbanos do Sudeste do Brasil. In: *Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação*. Pacheco, S.M.; Marques, R.V.; Esberard, C.E.L. (Org). Porto Alegre: Armazém Digital, 574 p.

Sodré, M.M.; Gama, A.R. & de Almeida, M.F. 2010. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 52:75-81.

Sugamata, M.; Miyazawa, M.; Mori, S.; Spangrude, G.J.; Ewalt, L.C. & Lodmell, D.L. 1992. Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. *Journal of Virology*. 66:1252-1260.

Sugiyama, M.; Yoshiki, R.; Tatsuno, Y.; Hiraga, S.; Itoh, O.; Gamoh, K. & Minamoto, N. 1997. A New Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Demonstrates

Adequate Immune Levels to Rabies Virus in Compulsorily Vaccinated Japanese Domestic Dogs. *Clinical and Diagnosis Laboratory Immunology*. 6:727-730.

Thomas, J.B.; Sikes, R.K. & Ricke, A.S., 1963. Evaluation of indirect fluorescent antibody technique for detection of rabies antibody in human sera. *Journal of Immunology*. 91:721-723.

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

Tordo, N.; Poch, O.; Ermine, A.; Keith, G. & Rougeon, F. 1986. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 83:3914-3918.

Tordo, N. & Poch, O. 1988. Structure of rabies virus. In: *Rabies*. Campbell J.B. & Charlton K.M. (Eds). Boston: Kluwer Academic Publishers, pp.25-45.

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

Thoulouze, M.I.; Lafage, M.; Schachner, M.; Hartmann, U.; Cremer, H. & Lafon, M. 1998. The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. *Journal of Virology*. 72:7181-7190.

Uieda, W. 1998. Rabies in the insectivorous bat *Tadarida brasiliensis* in Southeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*. 32(5):484-485.

Uieda, W.; Santos, N.M. & Silva, M.M.S. 1995. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 29(5):393-397.

Uieda, W.; Brecht, A. & Pinto, P.P. 2008. Dieta, abrigos e comportamento do morcego fitófago *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae) em Brasília, Distrito Federal, e sua relação

com as plantas usadas na arborização urbana. In: Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação. Pacheco, S.M.; Marques, R.V.; Esberard, C.E.L. (Org). Porto Alegre: Armazém Digital, 574 p.

Velasco-Villa, A.; Orciari, L.A.; Juarez-Islas, V.; Gomez-Sierra, M.; Padilla-Medina, I.; Flisser, A.; Souza, V.; Castillo, A.; Franka, R.; Escalante-Mane, M.; Sauri-Gonzalez, I. & Rupprecht C.E. 2006. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:1697-1710.

Webster, G.A. & Casey, G.A. 1996. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Eds). 4th edn. Geneva: World Health Organization, 96-103.

Webster, L.T. & Dawson, J.R. 1935. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation: measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 32:570-573.

WHO Expert Consultation on rabies, 2005. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 931, 1-88.

Wiktor, T.J.; György, E.; Schlumberger, D.; Sokol, F. & Koprowski, H. 1973. Antigenic properties of rabies virus components. *Journal of Immunology*. 110:269-276.

Wiktor, T.J. & Koprowski, H. 1982. Does the existence of rabies antigenic variants warrant re-evaluation of rabies vaccine? In: *Primeira Conferência Internacional sobre o impacto das Doenças Virais no Desenvolvimento dos Países Latino-Americanos e da Região do Caribe*, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 94-112.

Wiktor, T.J. & Koprowski, H. 1978. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 75:3938-3942.



Wunner, W.H.; Dietzschold, B.; Curtis, P.J. & Wiktor, T.J. 1983. Rabies subunit vaccines. *Journal of General Virology*. 64:1649-1656.

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

Yang, L.; Zhao, L.; Hu, R.; Shi, Z. & Liu, W. 2006. A Novel Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Antibodies against Rabies Virus. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13:966-968.

Zalan, E.; Wilson, C. & Pukitis, D. 1979. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *Journal of Biological Standartization*. 7:213-220.

Zanetti, C.R.; Tino, M.S.; Chamelet, E.L.B.; Ishizuka, M.M. & Pereira O.A.C. 1989. Simplification of immune adherence hemagglutination test for detection of rabies antibodies in human serum. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 31:341-345.

Zhang, S.; Liu, Y.; Zhang, F. & Hu, R. 2009. Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing antibodies in dogs. *Vaccine*. 27:2108-2113.

Zortea, M. & Chiarello, AG. 1994. Observations on the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus*, in an urban reserve southeast Brazil. *Mammalia*. 58(4):665-670.

## **7. ANEXOS**

### **OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO**



## Raiva: uma breve revisão

### Rabies: a brief review

Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista<sup>1</sup>, Ana Cláudia Franco<sup>1</sup> & Paulo Michel Rocha<sup>1,2</sup>

#### RESUMO

Provavelmente todas as espécies animais de sangue quente são suscetíveis de serem infectadas pelo vírus da raiva (VR). No entanto, a maioria dessas espécies, quando infectadas, tornam-se hospedeiros finais do agente, pois a infecção resulta em morte e não ocorre disseminação do mesmo para novos hospedeiros. Para garantir sua perpetuação na natureza, o VR adaptou-se a determinadas espécies, denominadas "hospedeiros naturais", as quais servem como reservatórios do vírus. Durante esse processo de adaptação, modificações genômicas e antigênicas são geradas, originando as chamadas "variantes" do VR. Estas por vezes apresentam alterações que podem ser utilizadas como marcadores epidemiológicos, permitindo, por exemplo, a identificação da espécie fonte de infecção ou de variantes associadas a determinados nichos ecológicos. Nesta breve revisão são apresentados dados sobre o VR e sobre a ocorrência de variantes no Brasil, com ênfase nos achados de uma parcela dos inúmeros estudos realizados sobre o tema. São também apresentados e discutidos dados epidemiológicos sobre a situação da raiva no País nos últimos dez anos (1997-2006), salientando-se a marcante redução no número de casos de raiva urbana em cães e em humanos, este último infelizmente compensado por um aumento no número de casos humanos associados a contatos com morcegos hematófagos no triênio 2004-2006.

Descritores: Raiva, Brasil, revisão, variantes, epidemiologia.

#### ABSTRACT

Probably all warm blooded animals are susceptible to rabies virus (RV) infections. However, most of these species will end up as terminal hosts for the virus, since a fatal outcome is the rule and usually no virus dissemination from such hosts occur. Nevertheless, in nature, RV has become adapted to certain species, referred to as "natural hosts", which act as reservoir for the virus. During the process of virus adaptation to such hosts, genomic and eventually antigenic modifications are generated that can be used as markers which may help to identify the natural host which acted as source of infection, along with other characteristics peculiar to such modified viruses, denominated RV "variants". Such variants may bear alterations that can be used as epidemiological markers, allowing for instance the identification of the source of infection or the establishment of associations between a particular variant and a defined ecological niche. In this brief review, some of the recent data on the virus and the occurrence of variants are presented, with emphasis on the findings of a parcel of the various studies on the subject that have been carried out in Brazil. Epidemiologic data on reported cases of rabies in the country in the last ten years (1997-2006) are presented and discussed, highlighting the marked decrease in the numbers of urban cases of rabies in dogs and humans, what was unfortunately compensated by an increase in the number of human cases associated to vampire bat transmission in the triennium 2004-2006.

Key words: rabies, Brazil, review, variants, epidemiology.

## Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul

[*Bovine herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-1.2b) in infectious form in brains of cattle submitted to rabies diagnosis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil*]

H.B.C.R. Batista<sup>1</sup>, E. Schmidt<sup>2</sup>, F.R. Spilki<sup>3</sup>, A.C. Franco<sup>1</sup>, P.M. Roehle<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia - ICBS-UFRGS – Porto Alegre, RS,

<sup>2</sup>IPVDF-FEPAGRO - Saúde Animal – Eldorado do Sul, RS

<sup>3</sup>Instituto de Ciências da Saúde - FEEVALE – Novo Hamburgo, RS

### RESUMO

Verificou-se a incidência de herpesvírus bovinos (BoHVs) em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul. Para tanto, amostras coletadas durante dois anos (n=70) foram submetidas ao isolamento viral em cultivos celulares. Os BoHVs foram isolados em dois (2,9%) encéfalos. Após serem submetidas à caracterização antigênica e molecular, as amostras foram subtipadas como BoHV-1.1 e BoHV-1.2b. A BoHV-1.1 foi isolada de um encéfalo que foi também positivo para raiva. O vírus da raiva foi identificado em 11 amostras (15,7%). Estes achados revelam que a incidência de BoHVs em forma infecciosa em bovinos com encefalite foi baixa, embora represente 16,7% (2/12) dos encéfalos nos quais um agente viral foi identificado. Tal fato confirma a já reportada associação entre BoHV-1 e encefalites. Esse é o primeiro relato da ocorrência de BoHV-1.2b, um subtipo considerado menos patogênico, em um caso de doença neurológica em bovinos.

Palavras-chave: herpesvírus bovino-1, BoHV-1, BoHV-1.2b, raiva, encefalite

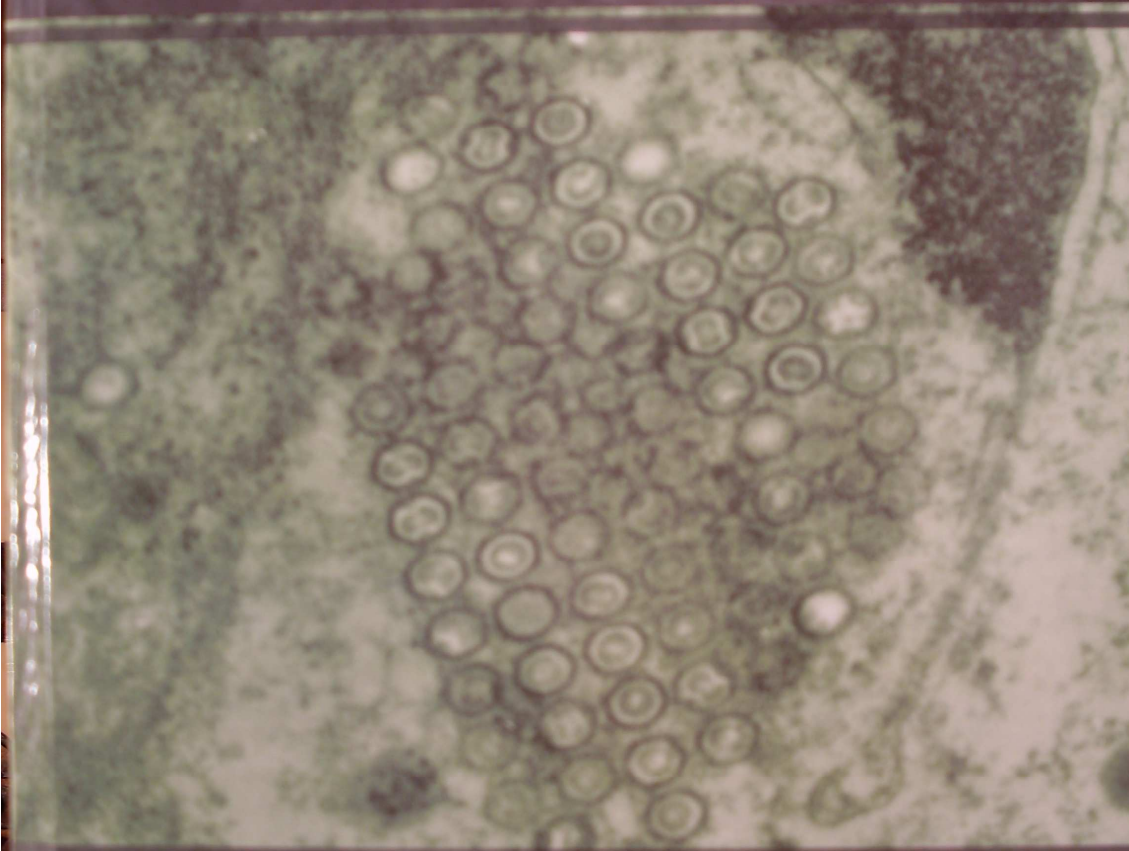
### ABSTRACT

*The incidence of bovine herpesviruses (BoHVs) was determined in brains of cattle submitted to rabies diagnosis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Brain samples collected in a two-year interval (n=70) were submitted to virus isolation in cell culture. The BoHVs were isolated from two (2.9%) of the brains. After the antigenic and molecular characterization, the isolated strains were subtyped as BoHV-1.1 and BoHV-1.2b. The BoHV-1.1 isolate was recovered from a brain sample that was also positive for rabies. Rabies virus was identified in 11 (15.7%) samples. These findings reveal that the incidence of infectious BoHVs in brains of cattle with encephalitis was low, although these represented 16.7% (2/12) of samples from which at least one viral agent was identified. This confirms the previously reported link between BoHV-1 and bovine encephalitis. However, it is the first report on the association of BoHV-1.2b, a putatively less pathogenic BoHV subtype, with neurological disease in cattle.*

Keywords: bovine herpesvirus type 1, BoHV-1, BoHV-1.2b, rabies, encephalitis

EDUARDO FURTADO FLORES  
(ORG.)

# VIROLOGIA VETERINÁRIA



editoraufsm

**RHABDOVIRIDAE**Luis L. Rodríguez<sup>1</sup>, Paulo Michel Roehle,  
Helena Batista & Gael Kurath<sup>1</sup>**27**

<b>1 Introdução</b> .....	<b>691</b>
<b>2 Classificação e taxonomia</b> .....	<b>691</b>
<b>3 Estrutura do vírion e do genoma</b> .....	<b>692</b>
<b>4 O ciclo replicativo</b> .....	<b>693</b>
<b>5 Rabdovírus de interesse veterinário</b> .....	<b>695</b>
<b>5.1 Vírus da estomatite vesicular</b> .....	<b>695</b>
5.1.1 Epidemiologia .....	696
5.1.2 Patogenia e sinais clínicos .....	699
5.1.3 Imunidade .....	699
5.1.4 Diagnóstico .....	700
5.1.5 Controle e profilaxia .....	700
<b>5.2 Vírus da raiva e lissavírus relacionados</b> .....	<b>700</b>
5.2.1 O agente .....	701
5.2.2 Estrutura do vírion .....	702
5.2.3 Replicação viral .....	703
5.2.4 Variações antigênicas .....	704
5.2.5 Epidemiologia .....	705
5.2.6 Patogenia, sinais clínicos e patologia .....	708
5.2.7 Diagnóstico .....	709
5.2.8 Prevenção e controle .....	711
5.2.9 Tratamento .....	711
<b>5.3 Rabdovírus de peixes</b> .....	<b>713</b>
5.3.1 Histórico e classificação .....	713
5.3.2 Epidemiologia .....	714
5.3.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia .....	715
5.3.4 Imunidade .....	716
5.3.5 Diagnóstico .....	717
5.3.6 Controle e profilaxia .....	717
<b>6 Bibliografia consultada</b> .....	<b>718</b>

<sup>1</sup> Seção geral da família e VSV (LLR); raiva (PMR e HB); rabdovírus de peixes (GK). Tradução da parte geral VSV e rabdovírus de peixes: Renata Dezengrini.