

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

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS DO VÍRUS DA RAIVA E CONSTRUÇÃO DE UM HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 1 (BHV-1) CONTENDO O GENE QUE CODIFICA A
GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA**

Rejane Schaefer

PORTO ALEGRE

2004

**UFRGS
FAC. DE VET.
BIBLIOTECA**

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

CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS DO VÍRUS DA RAIVA E CONSTRUÇÃO DE UM HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 1 (BHV-1) CONTENDO O GENE QUE CODIFICA A
GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA

Rejane Schaefer*

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 Roehé

PORTO ALEGRE

2004

***Médica Veterinária, MsC, UFRGS**

S293c Schaefer, Rejane

Caracterização antigênica e molecular de amostras brasileiras do vírus da raiva e construção de um herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) contendo o gene que codifica a glicoproteína do vírus da raiva. / Rejane Schaefer - Porto Alegre: UFRGS, 2004.

96 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2004. Paulo Michel Roehe, Orient.

1. Virologia veterinária : bovinos 2. Vírus rábico : anticorpos monoclonais : bovinos 3. Herpesvírus bovino tipo 1 (bhv-1) I. Roehe, Paulo Michel, Orient. II. Título

CDD 616.019

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

APROVADO POR:

Prof. Dr. EDUARDO FURTADO FLORES,
Membro da Banca.

Prof. Dr. ODIR ANTONIO DALLAGOSTIN
Membro da Banca.

Prof. Dr. CLÁUDIO WAGECK CANAL
Membro da Banca.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores,

Paulo Roehe, com o qual convivo há pelo menos 10 anos, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e entusiasmo demonstrado, pela relação desafiadora e pela amizade.

Ao Frans Rijsewijk, que supervisionou o meu trabalho na Holanda, agradeço a acolhida, os conselhos e a oportunidade de conhecer não só uma outra realidade de pesquisa, mas também uma outra cultura.

Aos meus pais, Cleo e Jorge, por me apoiarem em todos os desafios da minha vida, com amor e dedicação.

Ao Marcus, mais uma vez meu companheiro nesta jornada, resistindo bravamente aos contratempos e ao meu "stress".

Aos meus manos, Ricardo, Monica e Andre, pelo carinho e amor dedicados a mim,

À Ana Claudia Franco, misto de amiga, colega e co-orientadora, pelas palavras de estímulo e troca de idéias.

Aos meus queridos colegas e amigos do CPVDF, Paulinho, Alessandra, Fernando, Helena, Silvia, Tamahine, Anna Paula, Mauro, Eduardo, Diocela, Eber, Tamir e tantos outros que tive a oportunidade de conhecer e conviver durante estes últimos anos.

Ao diretor do CPVDF, Augusto Cunha, por apoiar a realização deste trabalho nas dependências do Instituto.

À Capes, CNPq, PRONEX e FAPERGS, por proporcionarem os meios para a realização deste trabalho.

À toda minha família e amigos por estarem sempre presentes.

SUMÁRIO

RESUMO	06
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	08
CAPÍTULO 2 - Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates	26
CAPÍTULO 3 - First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years ...	50
CAPÍTULO 4 - Construção de um herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) recombinante contendo o gene que codifica a glicoproteína (G) do vírus da Raiva	56
CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO GERAL	81
REFERÊNCIAS	85

RESUMO

O vírus da Raiva foi considerado durante muito tempo como sendo muito estável antígenicamente. Entretanto, nos últimos anos, diversos trabalhos de caracterização de isolados do vírus da Raiva, realizados em várias partes do mundo, demonstraram diferenças entre as amostras de vírus isoladas de diferentes espécies animais. Estas diferenças ocorrem principalmente entre amostras do vírus isoladas de hospedeiros terrestres e aéreos (morcegos). Este trabalho teve como objetivos o estudo de características antigênicas e genômicas de amostras brasileiras do vírus da Raiva e o desenvolvimento de uma vacina contra a Raiva, produzida a partir de um vetor viral. Setenta e oito amostras de vírus rábico, obtidas de diferentes espécies e oriundas de vários estados brasileiros foram submetidas a um perfil de reatividade com um painel de anticorpos monoclonais (Mabs) dirigidos contra antígenos dos *Lyssavirus*. Posteriormente, essas amostras foram submetidas a análise genômica, envolvendo a análise de restrição genômica (REA) da seqüência inteira do gene que codifica a nucleoproteína viral (N; 1,5 kb) amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A combinação da caracterização antigênica e REAs permitiu a diferenciação das amostras de acordo com a espécie de origem, independente da distribuição geográfica. O seqüenciamento de 225 nucleotídeos do gene N (nucleotídeos 140-364), de sete amostras do vírus, consideradas representativas das amostras analisadas, confirmou as diferenças identificadas através da análise antigênica e REA. O seqüenciamento também permitiu um refinamento na caracterização de amostras isoladas de morcegos, revelando diferenças entre amostras isoladas de espécies hematófagas e não hematófagas, sugerindo que as amostras virais de morcegos não hematófagos vem apresentando evolução adaptativa distinta das amostras de morcegos hematófagos. A segunda parte deste estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um antígeno com potencial para o desenvolvimento de uma vacina bivalente contra a Raiva e contra o Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BHV-1). Para isto, foi construído um vírus recombinante utilizando como vetor uma amostra autóctone de BHV-1, onde foi inserido, no locus do gene que codifica a glicoproteína E (gE) viral, o gene que codifica a glicoproteína (G) do vírus rábico. A estratégia escolhida para a construção do recombinante incluiu a remoção de potenciais sítios de *splicing* do gene G, com o objetivo de propiciar a transcrição e tradução adequada do mesmo nas células infectadas pelo recombinante. A expressão da proteína G do vírus da Raiva foi detectada em células eucarióticas transfectadas com DNA plasmideal contendo o gene G do vírus da Raiva e também após a co-transfecção, em células EBTr, do DNA do BHV-1 *wild-type* e do fragmento de recombinação contendo o gene G do vírus da Raiva. O vírus recombinante (BHV-gE / Raiva G) produzido está sendo isolado para posteriormente ser caracterizado e avaliado experimentalmente.

ABSTRACT

Rabies virus has been considered very stable antigenically. However, in last years, differences among isolates from different species have been found in many regions of the world. These differences have been mainly found among rabies virus isolates from terrestrial and aerial hosts (bats). This present work focused on the study of antigenic and genomic characteristics of Brazilian rabies virus isolates and the development of a vaccine against rabies virus using a viral vector. For this purpose, seventy-eight rabies virus isolates from distinct host species and from different geographic areas were analysed. Samples were submitted to antigenic analysis with a panel of monoclonal antibodies (Mabs) directed to Lyssavirus antigens, to restriction endonuclease analysis of RT-PCR products and partial sequencing of 225 bp on the terminal region of the N gene of rabies virus. The combination of these techniques allowed to differentiate rabies isolates according to species of origin and not according to geographic distribution of isolates. Moreover, sequencing of the N gene fragment allowed to distinguish rabies virus isolates of haematophagous bat origin from those of non-haematophagous bats. Such findings suggest that the variants isolated from non-haematophagous bats have evolved independently of vampire bat viruses.

Another part of the study aimed the development of an antigen with potential to be used as a bivalent vaccine against rabies virus as well as against bovine herpesvirus type 1 (BHV-1). For that, a recombinant virus was constructed using, as a vector, an autochthonous strain of BHV-1 in which a gene coding for the glycoprotein (G) of rabies virus was inserted on gE locus of BHV-1. The strategy for the construction of such recombinant includes the design of a synthetic glycoprotein gene, based on a sequence from rabies virus isolate of haematophagous bat origin, from which, as many as possible, splicing sites were removed in order to avoid the cleavage of the rabies G gene within the nucleus of recombinant BHV-1 infected cells. The G protein expression was detected in eucariotic cells transfected with plasmid DNA containing rabies G gene and after co-transfection of EBTR cells with the wild-type BHV-1 DNA and the recombination fragment containing rabies G gene.

The recombinant virus (BHV-gE/rabies G) was constructed and is now in process of isolation, in order to proceed its experimental evaluation.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O vírus da Raiva pertencente à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (Tordo, 1996) é conhecido por causar uma encefalomielite quase sempre fatal em humanos e outros mamíferos (King, 1993). A Raiva é um importante problema de saúde pública, uma vez que, anualmente, milhares de pessoas no Brasil são submetidas a tratamento pós-exposição em decorrência de agressões sofridas pelo contato com animais suspeitos de infecção pelo vírus. Do ponto de vista econômico, perdas consideráveis são registradas devido à mortalidade de animais de produção que desenvolvem a doença. No Brasil, estima-se que cerca de 30.000 bovinos morram anualmente devido à infecção pelo vírus da Raiva (da Silva et al., 2000).

Embora seja relativamente bem controlada nos centros urbanos por meio das campanhas de vacinação, a infecção se mantém em animais silvestres. No Estado do Rio Grande do Sul, a situação atual mostra a ausência de casos de Raiva urbana (isto é, transmitida por cães; Caldas & Anjos, 1997). Todavia, todos os anos são registrados casos de Raiva bovina transmitida por morcegos (Baer, 1975; Germano, 1994). Embora o sangue de bovinos seja o alimento preferencial de morcegos da espécie hematófaga *Desmodus rotundus*, casos de Raiva em outras espécies animais infectadas por morcegos são possíveis de ocorrer.

Os métodos usuais de diagnóstico (imunofluorescência direta; Dean, 1996 e inoculação em camundongos; Koprowski, 1996) não permitem a diferenciação de variantes do vírus, nem tampouco permitem a diferenciação entre amostras de campo e amostras vacinais. Em vista disso, outros métodos vem sendo desenvolvidos e adaptados visando a obtenção de um conhecimento mais profundo acerca de diferenças entre amostras do vírus. O emprego de anticorpos monoclonais (Mabs), específicos contra antígenos do vírus rábico, tem sido de grande valor na caracterização antigênica de amostras. Os Mabs tem permitido comparações antigênicas e possibilitam diferenciações entre amostras de acordo com seus perfis de reatividade frente a painéis de Mabs (King, 1991; Loza-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997). Muitos dos Mabs avaliados até o presente foram obtidos contra a glicoproteína (G) do vírus rábico (Flamand et al., 1980b; Schneider et al., 1982; Dietzschold et al., 1988). Entretanto, a variabilidade encontrada nos perfis antigênicos revelados por Mabs anti-G se mostrava tão ampla que, inevitavelmente, conduziram à busca de antígenos mais conservados,

desta forma viabilizando estudos de caracterização antigênica. Assim, Mabs contra a proteína do nucleocapsídeo (N) têm sido utilizados para diferenciar o vírus da Raiva de outros lissavírus correlatos (Wiktor et al., 1980; Flamand et al., 1980a; Dietzschold et al., 1988). Mabs anti-N também têm sido utilizados em estudos epidemiológicos, permitindo análises sobre a distribuição geográfica de amostras de vírus e suas associações com determinados hospedeiros, fornecendo informações sobre a estabilidade genética de amostras de vírus *in vivo* (Sureau et al., 1983) e sugerindo fontes potenciais de exposição para o homem e os animais domésticos (Rupprecht et al., 1987; Smith et al., 1991; Delpietro et al., 1997). Mais recentemente, o emprego de técnicas moleculares mais sensíveis, como a transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e o seqüenciamento, na caracterização de amostras do vírus da Raiva, tem facilitado a identificação da origem da infecção em surtos de Raiva, de forma mais rápida e precisa do que os métodos usuais de diagnóstico.

É importante salientar a importância da caracterização antigênica e molecular de amostras do vírus na implementação de programas de controle, uma vez que a escolha da estratégia que será utilizada no controle de surtos depende da identificação do hospedeiro transmissor (vetor terrestre ou aéreo; Ministério da Saúde, 1998; Romijn et al., 2003). O reconhecimento da fonte de infecção e das espécies envolvidas na manutenção dos ciclos do vírus rábico possibilitam uma melhor otimização do uso de recursos financeiros em programas de controle da infecção.

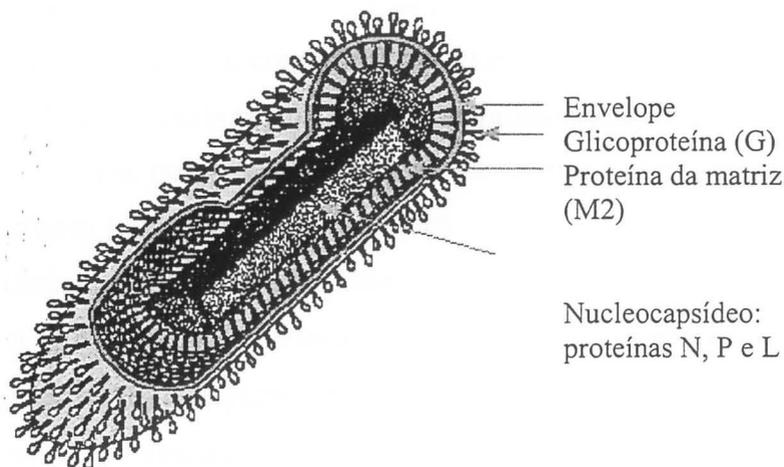
As estratégias de controle das infecções pelo vírus da Raiva incluem a vacinação de animais suscetíveis. Tendo em vista que, por muito tempo, o vírus da Raiva foi considerado como um único tipo antigênico (Shope, 1975; Smith et al., 1986), a maioria das vacinas em uso no mundo derivam de uma só amostra viral (Sureau, 1983). Diferenças entre amostras do vírus demonstradas, primeiramente, com o uso de Mabs (Wiktor & Koprowski, 1978; Smith et al., 1986; Dietzschold et al., 1988; Loza-Rubio et al., 1996) e depois, através de estudos sobre a estrutura molecular do vírus (Sacramento et al., 1992; Bourhy et al., 1993b; Amengual et al., 1997), questionaram a capacidade das vacinas existentes em proteger contra variantes. Em vista disso, um número significativo de trabalhos de caracterização e proteção cruzada passaram a ser realizados (Fuenzalida & Palacios, 1955; Wiktor & Koprowski, 1978; Smith et al., 1986; Dietzschold et al., 1988; Loza-Rubio et al., 1996; Roehle et al., 1997; Schaefer, 1999). No Brasil, Hayashi (1984) testou a vacina contra a raiva empregada na vacinação de cães e demonstrou que doses desta vacina que protegeram 100% dos camundongos

contra 10.000 doses letais 50% (DL₅₀), conferiram graus variados de proteção contra 24 amostras de vírus de campo isolados de diferentes espécies. Os níveis mais baixos de proteção (15 a 20%) foram observados quando vírus rábico isolado de bovinos foram utilizados no desafio dos camundongos (Hayashi et al., 1984).

Taxonomia e estrutura viral

A família *Rhabdoviridae* é formada pelos gêneros *Vesiculovirus*, que inclui o vírus da Estomatite Vesicular e outros vírus a este relacionados antigenicamente, *Lyssavirus*, que engloba um grupo de sete vírus relacionados (incluindo o vírus rábico) e *Ephemerovirus*, agente etiológico da Febre Efêmera Bovina (Calisher et al., 1989). Os membros da família possuem um genoma composto por RNA fita simples e de polaridade negativa, apresentando um formato de projétil com diâmetro de 75 nanômetros (nm) e comprimento de 100 a 300 nm (Tordo, 1996). O RNA genômico do vírus da Raiva amostra Pasteur (PV) é constituído por 11932 nucleotídeos (Wunner, 1991; Smith et al., 1996).

Os vírions são compostos por duas estruturas principais: um cilindro central e denso formado pelo ribonucleocapsídeo helicoidal ou ribonucleoproteína (RNP) e um envelope glicoproteico (8 nm de largura) coberto por projeções de superfície espiculares (peplômeros) de 10 nm de comprimento, distribuídos a intervalos de 5nm.



Fonte: <http://fiona.umsmmed.edu/~yar/zoo.html>

Figura 1. Esquema representativo do vírus rábico: as projeções da glicoproteína G aparecem estendendo-se do envelope lipídico que envolve o nucleocapsídeo. A proteína da matriz M2 acompanha o envelope viral e interage com a glicoproteína.

Organização genômica e proteínas virais

Os *Lyssavirus* apresentam um genoma que codifica 5 fases abertas de leitura (ORFs). Cada uma dessas codifica uma proteína; a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (M1 ou P), a proteína de preenchimento ou matriz (M2), a glicoproteína (G) e a polimerase viral (L) (Tordo, 1996). Entre os genes estruturais, encontram-se sequências intergênicas com diferentes tamanhos. O genoma apresenta ainda uma região não codificante situada entre os genes G e L, conhecida como região intergênica G-L ou pseudogene, a qual tem sido representada pela letra grega psi (ψ ; Tordo et al., 1986; Wunner, 1991).

A nucleoproteína (N) é um polipeptídeo com 450 aminoácidos (50,5 kDa), fosforilado na serina da posição 389 (Dietzschold et al., 1987b) e está intimamente associada ao RNA viral, protegendo-o da ação de ribonucleases (Tordo et al., 1986). A proteína N um papel fundamental na regulação da transcrição do RNA viral e da replicação através da encapsidação do RNA viral genômico recém sintetizado (Wagner et al., 1996).

A fosfoproteína (P ou M1) é uma proteína fosforilada com 297 aminoácidos (38 ou 41 kDa) e encontra-se em células infectadas, associada com a RNP mas não faz parte da estrutura viral. Antigamente, esta proteína era denominada de proteína não estrutural (NS). A fosfoproteína é um importante cofator para a polimerase viral (Tordo, 1996).

A proteína da matriz (M2) está presente na superfície interna do envelope (202 aminoácidos; 23 kDa), interagindo com o domínio citoplasmático de G e com a RNP. A proteína M2 é responsável pela ligação das proteínas associadas às membranas (P e G) a RNP. Isto ocorre, possivelmente, através da interação com a nucleoproteína. A proteína M2 é também importante na incorporação de G aos vírions por ocasião do brotamento das partículas virais na superfície das células infectadas (Mebatsion et al., 1999).

A glicoproteína (G) é uma proteína transmembrana com 524 aminoácidos (65 ou 70 kDa) formando as espículas presentes no envelope viral. A proteína G é responsável pela ligação do vírus a componentes da membrana celular, que agem como receptores para o vírus (Lentz et al., 1982; Superti et al., 1984; Superti et al., 1986; Broughan et al., 1995; Thoulouze et al., 1998; Tuffereau et al., 1998). Após a internalização, a proteína G media a fusão do envelope viral com a membrana endossomal (Whitt et al., 1991). A glicoproteína é a proteína imunodominante contra a qual a maior parte dos anticorpos neutralizantes são gerados (Wiktor et al., 1973). A proteína G também tem papel

importante na indução de imunidade celular no hospedeiro (Drings et al., 1999). Em amostras do genotipo 1, a neurovirulência parece estar diretamente relacionada à presença do aminoácido arginina (ou lisina) na posição 333 da glicoproteína G (Dietzschold et al., 1983; Tuffereau et al., 1989). Mutantes com outros aminoácidos nesta posição não infectam certos tipos de neurônios, presumivelmente porque são incapazes de reconhecer os receptores celulares (Tordo, 1996). Recentemente, foi demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, o papel da proteína G na disseminação trans-sináptica do vírus da Raiva. Mutantes onde a proteína G foi deletada resultam em vírus não patogênicos (Etessami et al., 2000).

A polimerase viral (L) é a maior proteína com 2142 aminoácidos (244 kDa) estando presente em menor quantidade na partícula viral (25 moléculas por vírion). A polimerase viral é considerada um complexo enzimático apresentando atividade de RNA-polimerase RNA-dependente, guanilil transferase e poly (a) sintetase (Tordo, 1996).

Penetração viral na célula hospedeira, transcrição, replicação e brotamento

A fixação do vírus rábico à célula hospedeira é mediada pela glicoproteína G a receptores da superfície celular (Tordo, 1996). Vários candidatos a receptor para o vírus da Raiva e sua glicoproteína têm sido sugeridos, como fosfolipídeos (Superti et al., 1984), gangliosídeos (Superti et al., 1986) e proteínas (Broughan et al., 1995). Receptores neuronais mais específicos incluem o receptor nicotínico acetilcolina (Lentz et al., 1982), as moléculas de adesão celular neuronal (NCAM; Thoulouze et al., 1998) e o receptor do fator de crescimento neuronal de baixa afinidade p75^{NTR} (Tuffereau et al., 1998). Após a adsorção à célula hospedeira e posterior internalização, a entrada do vírus na célula ocorre por fusão do envelope viral com a membrana endossomal liberando o genoma viral no citoplasma, onde ocorre a transcrição e a replicação (Whitt et al., 1991; Tsiang, 1993).

Os mecanismos de transcrição, replicação e expressão de genomas RNA de polaridade negativa não segmentados foram originalmente estabelecidos através de estudos com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) (Tordo et al., 1988). A transcrição do vírus rábico ocorre no citoplasma sendo conhecido como transcrição *stop-start* ou seqüencial (Figura 2). Acredita-se que um único promotor para a polimerização é reconhecido pela polimerase viral perto da extremidade 3' do genoma (Tordo et al.,

1986). Inicialmente, ocorre a transcrição de uma sequência líder com 50 nucleotídeos, seguida da síntese de 5 mRNAs monocistrônicos codificando sucessivamente as proteínas N, P, M2, G e L (Tordo et al., 1986). Para controlar esta progressão sequencial, o complexo da transcrição reconhece sinais de início (S) e de parada da transcrição ou poliadenilação (P) flanqueando os cístrons. Estas sequências consenso possuem aproximadamente 10 nucleotídeos. Acredita-se que ocorra a dissociação do complexo a cada sinal de parada da transcrição, e reinício de forma precária no próximo sinal de início da transcrição. Isto apresenta como consequência um progressivo decréscimo na taxa de transcrição viral da extremidade 3' em direção à extremidade 5' do genoma, sugerindo que a localização do gene diretamente afeta sua taxa de transcrição. Assim, o gene que codifica a nucleoproteína viral é o mais frequentemente traduzido.

A tradução e a síntese das proteínas N, P, M2, L e G a partir de seus respectivos mRNAs, ocorre em ribossomos livres no citoplasma (Wunner, 1991). Embora a tradução da proteína G inicie nos ribossomos livres, a finalização de sua síntese e glicosilação, ocorre no retículo endoplasmático rugoso (ER) e no complexo de Golgi (Wunner, 1991). A proteína N encapsula o RNA nascente simultaneamente à transcrição. Esta encapsidação parece induzir a mudança da transcrição para a replicação. Acredita-se que a proteína N recém sintetizada se ligue a sequência líder no RNA e de alguma maneira impede que a polimerase viral reconheça os sinais de terminação da transcrição (Wagner et al., 1996). Tem início então a replicação do genoma viral com síntese de cópias do RNA de fita positiva. A fita positiva serve com molde para a síntese de novas cópias do RNA de fita negativa (Wunner, 1991). Durante o processo de montagem, o complexo N-P-L faz a encapsulação do RNA genômico fita negativa para formar o complexo RNP, e a proteína M2 forma uma cápsula, ou matriz, ao redor do RNP. O complexo RNP-M2 migra até uma área da membrana plasmática contendo insertos de glicoproteína, onde tem início o enrolamento do ribonucleocapsídeo (Wagner et al., 1996). O complexo M2-RNP se liga com a glicoproteína e o vírus completo brota da membrana plasmática. Dentro do SNC, existe brotamento viral preferencialmente a partir de membranas plasmáticas. Diferentemente, os vírions presentes nas glândulas salivares, brotam da membrana celular para dentro do lúmen acinar. O brotamento viral na glândula salivar e a agressividade induzida pela infecção no animal hospedeiro, maximizam as chances de disseminação viral a outros animais suscetíveis.

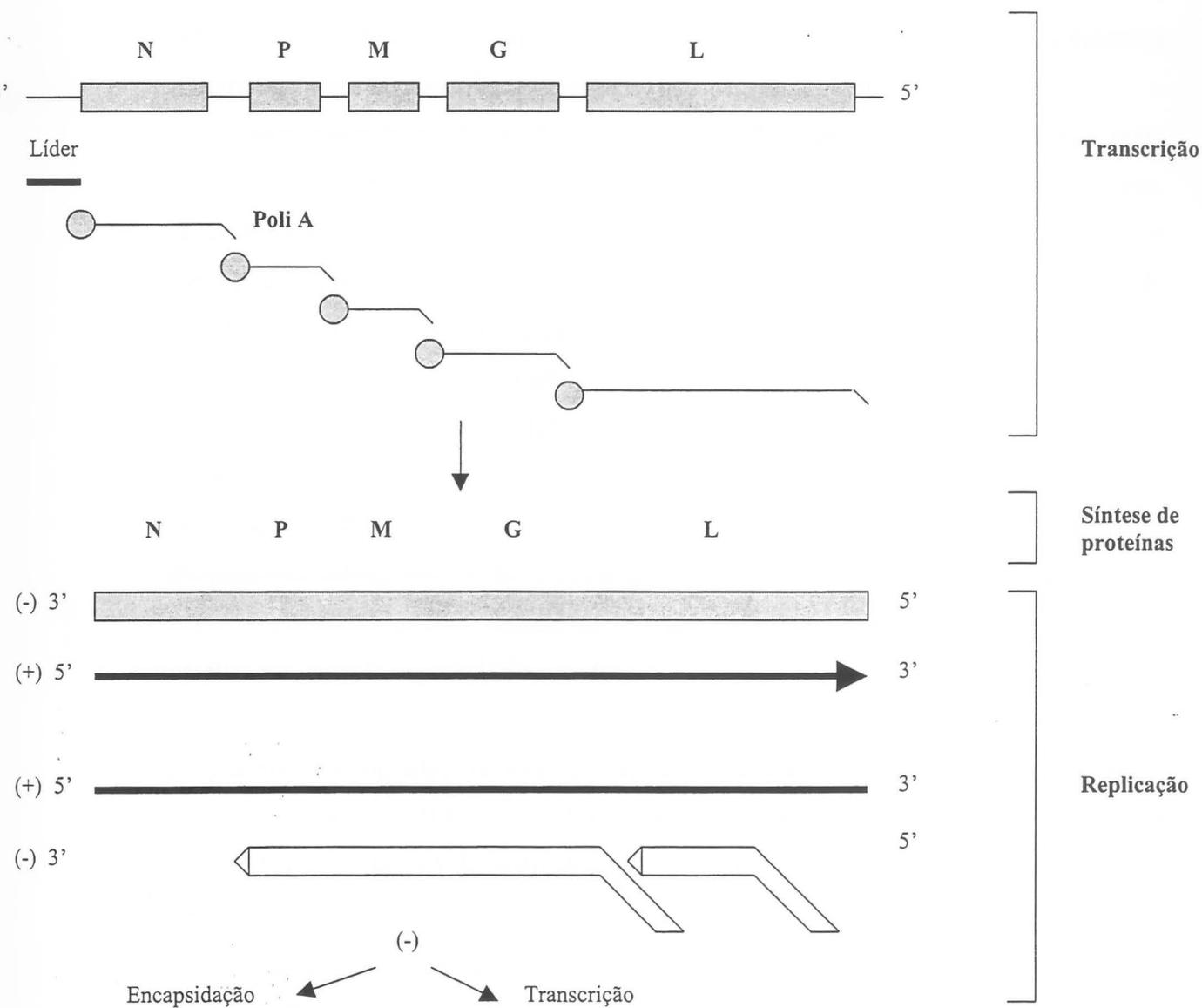


Figura 2. Esquemática das fases de replicação do vírus da Raiva

Patogenia

A maioria das infecções pelo vírus rábico é causada pela mordida de animais infectados ou pelo contato com ferimentos abertos e, raramente, através de membranas mucosas intactas ou transplante de órgãos (córnea) (King, 1993).

O período de incubação da doença, a partir de amostras de vírus de campo, pode variar de 2 a 12 semanas. Entretanto, períodos extremamente longos, superiores a 1 ano, já foram relatados (Smith et al., 1991). Após a infecção natural, foi demonstrado que 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 de multiplicação necessário à invasão do sistema nervoso (Tsiang, 1993). Contudo, em outras ocasiões pode ocorrer a entrada direta do vírus no SNC sem replicação prévia no músculo (Shankar et al., 1991). Desta forma, o vírus pode ser conduzido, via terminações nervosas motoras, aos nervos periféricos e, através de transporte axoplásmico retrógrado, ao SNC (Tsiang, 1993). Os vírions existentes fora do sistema nervoso periférico podem replicar-se nos gânglios espinhais e a partir daí atingir o cérebro via medula espinhal (Baer, 1991).

No sistema nervoso, a disseminação viral resulta da combinação de fluxo axoplásmico retrógrado, transmissão célula-célula via junções sinápticas e passagem livre do vírus através de ligações intercelulares (Iwasaki, 1991).

Após a infecção do sistema nervoso central, o vírus se distribui pelos nervos periféricos de forma centrífuga para os tecidos não nervosos, já tendo sido detectado em células da epiderme, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosa gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais, tecidos neuroepiteliais dos ureteres, bexiga e uretra (Charlton, 1988). A replicação do vírus rábico nas glândulas salivares e posterior excreção através da saliva representa o principal mecanismo de perpetuação do vírus na natureza (Schneider, 1991).

Os sinais clínicos aparecem somente após o envolvimento do SNC e a morte ocorre devido ao comprometimento de centros nervosos vitais (Iwasaki, 1991).

Vírus da Raiva clássica e vírus relacionados

Estudos filogenéticos permitiram a divisão do gênero *Lyssavirus* em 7 genótipos distintos (Bourhy et al., 1993a; Amengual et al., 1997; Gold et al., 1998). O principal genótipo do gênero é o vírus da Raiva clássica (genótipo 1), o qual está presente em várias regiões do mundo, formando ciclos endêmicos em mamíferos terrestres e em quirópteros (Smith et al., 1995). O genótipo 1 é o único até o momento isolado nas Américas. Os demais membros do gênero formam um grupo de vírus denominados “vírus relacionados com a Raiva”, os quais apresentam uma distribuição geográfica mais restrita e comumente estão associados a hospedeiros específicos.

Os vírus Lagos Bat (genótipo 2), Mokola (genótipo 3) e Duvenhage (genótipo 4) foram isolados exclusivamente na África a partir de megaquirópteros frugívoros, pequenos mamíferos e microquirópteros insetívoros (King et al., 1988; King et al., 1994). Os lissavírus de morcegos europeus EBL1 e EBL2 (“European bat lyssaviruses”; genótipos 5 e 6, respectivamente) são considerados endêmicos em espécies distintas de morcegos insetívoros (*Eptesicus* e *Myotis sp.*, respectivamente) e encontram-se distribuídos na Europa, da Rússia à Espanha, principalmente em regiões costeiras (Bourhy et al., 1993b; Schneider et al., 1994). Os lissavírus de morcegos Australianos (“Australian bat lyssaviruses”; ABL), isolados pela primeira vez em 1996 a partir de um caso de Raiva humana (Fraser et al., 1996), apesar de serem antígenicamente muito similares a amostras do genótipo 1 são considerados suficientemente distintos, em sua sequência de nucleotídeos, para integrarem um grupo separado dentro do gênero *Lyssavirus*, constituindo o genótipo 7 (Gould et al., 1998).

Todos os *Lyssavirus* são capazes de causar encefalomielite fatal após a infecção de mamíferos e, com exceção do genótipo 2, já foram isolados em humanos (King, 1993). Todos os lissavírus, com exceção do vírus Mokola, já foram isolados a partir de morcegos, demonstrando a importância desta espécie, considerada como reservatório mais antigo do vírus da Raiva, na infecção e adaptação do vírus rábico a espécies terrestres (Badrane et al., 2001).

Imunidade contra o vírus da raiva

A resistência inespecífica contra o vírus da Raiva é mediada por macrófagos, interferons e células "natural killer" (NK) (Abbas et al., 1991; Hooper et al., 1998). Os macrófagos possuem um papel importante porque eliminam o vírus através da fagocitose e promovem o processamento do antígeno para a indução de uma resposta imune específica.

O estabelecimento de imunidade contra infecções virais é mediada por uma combinação de mecanismos imunes humorais e celulares (Abbas et al., 1991). Após a captura dos antígenos do vírus rábico por macrófagos e por outras células apresentadoras de antígenos (APCs), os mesmos são processados e apresentados aos linfócitos CD4 e CD8 (Abbas et al., 1991). A estimulação dos linfócitos CD4 e CD8 induz a produção de citocinas, como as interleucinas 2 (IL-2), 4 (IL-4) e interferon gama (IFN γ). As células CD4 estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos neutralizantes (Abbas et al., 1991). Foi demonstrada a importância dos processos inflamatórios, aliados à resposta imune humoral e celular, nos estágios iniciais de infecção pelo vírus da Raiva, na eliminação do vírus do SNC (Hooper et al., 1998).

A estimulação de linfócitos T em animais imunizados com vírus rábico inativado produz uma resposta do tipo Th1, com produção de IL-2 e IFN γ (Celis et al., 1986). A importância das células T no estabelecimento de imunidade contra o vírus rábico foi demonstrada em camundongos "knockout", apresentando depleção de linfócitos CD4, os quais, frente a um desafio, apresentaram um decréscimo na produção de anticorpos e, conseqüentemente, uma redução na proteção contra a Raiva (Hooper et al., 1998). A produção de linfócitos T citotóxicos (CD8) após vacinação com vírus atenuado é importante. Porém, a presença de somente linfócitos T CD8 nos animais imunizados não é suficiente para proteger estes animais frente um desafio. Animais apresentando uma depleção de células CD8, mas ainda produzindo anticorpos anti-rábicos, são protegidos frente a uma infecção, enquanto que animais apresentando linfócitos T citotóxicos específicos mas sem produção de anticorpos, sucumbem à infecção (Celis et al., 1986).

Papel das proteínas virais na imunidade contra a Raiva

As proteínas virais mais importantes envolvidas na proteção contra a Raiva são as proteínas G e N. A proteína G é a única proteína viral capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (Wiktor et al., 1973) e estabelecer proteção total contra um desafio por via intracerebral (Perrin et al., 1985). A ribonucleoproteína viral (RNP) e a proteína N induzem proteção parcial contra um desafio periférico, sendo que não foi observada proteção quando o vírus de desafio foi injetado via intracerebral (Dietzschold et al., 1987a). Resultados similares têm sido encontrados na imunização de camundongos com a proteína N purificada de baculovírus recombinante (Fu et al., 1991) e de poxvírus recombinante (Lodmell et al., 1991). Ainda que a imunização com a RNP e proteína N não induzam a produção de anticorpos neutralizantes, acredita-se que ocorra ativação de linfócitos B (Dietzschold et al., 1991). A inclusão da proteína N em vacinas de subunidades tem sido sugerida por alguns grupos devido à sua capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T CD4 e também pelo seu alto nível de conservação entre os diferentes genótipos do vírus da raiva (Dietzschold et al., 1987a). Enquanto alguns estudos sustentam a importância da inclusão da proteína N em vacinas de subunidades (Dietzschold et al., 1987a), outros estudos demonstraram que a glicoproteína é o antígeno mais importante para a imunização de animais, não sendo necessária a inclusão da nucleoproteína para indução de imunidade protetora nos animais vacinados (Drings et al., 1999).

Vacinas

Amostras virais presentes na composição de vacinas contra a Raiva

As vacinas contra a raiva atualmente utilizadas nos animais, em tratamento pré-exposição, possuem em sua composição amostras do vírus da raiva "*Challenge Virus Standard*" (CVS) ou "*Evelyn-Rokitnicki-Abelseth*" (ERA), originárias de amostras isoladas de um bovino em 1882 na França (Kissling, 1958), e de um cão em 1935 nos EUA (Abelseth, 1964), respectivamente. Desde que foram descobertas variantes antigênicas do vírus da raiva, a partir de trabalhos desenvolvidos no mundo inteiro (Kubes & Gallia, 1942; Fuenzalida & Palacios, 1955; Wiktor et al., 1982; Hayashi et al., 1984; Dietzschold et al., 1988; Sacramento et al., 1992; Bourhy, et al., 1993b; Loza-

Rubio et al., 1996), a questão das vacinas contra a raiva disponíveis serem capazes de proteger contra a infecção causada por diferentes amostras do vírus começou a ser questionada. Muito embora assumam-se que as vacinas disponíveis promovam proteção contra amostras do genotipo 1 (vírus da raiva clássica) prevalentes em nosso meio, alguns autores relatam graus variados de proteção conferidos por estas devido a diferenças antigênicas existentes entre amostras isoladas de animais silvestres e a amostra utilizada na vacina (Kubes & Gallia, 1942; Fuenzalida & Palacios, 1955; Hayashi, 1984; Zanetti, et al., 1998).

Vacinas preparadas a partir de tecido nervoso

A primeira geração de vacinas contra a raiva eram preparadas a partir de tecido nervoso de mamíferos adultos e inativadas pelo calor, com fenol ou com betapropiolactona (β PL). Apesar dos severos efeitos colaterais causados, devido a presença de mielina originária do tecido nervoso de animais adultos, esta vacina ainda é utilizada em muitos países em desenvolvimento devido ao seu baixo custo (King, 1993). Para reduzir este problema, foi desenvolvida uma vacina preparada a partir de cérebro de camundongos neonatos, inativada com luz ultravioleta ou β PL (Fuenzalida & Palacios, 1955). Esta vacina, muito utilizada na América Latina, é considerada livre de mielina, desde que a coleta dos cérebros dos camundongos seja realizada em animais com 1 dia de vida (Díaz, 1996).

Vacinas preparadas em cultivos celulares

Tendo em vista a minimização dos riscos apresentados pelas vacinas preparadas a partir de tecido nervoso, foram desenvolvidas vacinas preparadas em cultivos celulares, como as preparadas em células de rim de hamster, fibroblastos humanos, células Vero e células de fibroblastos de pulmão de feto de macaco Rhesus (Montagnon, 1996). Experimentos realizados com estas vacinas demonstraram sua superioridade em relação às vacinas preparadas em tecido nervoso e ovos embrionados, em termos de nível de anticorpos neutralizantes apresentados pelos indivíduos vacinados, precocidade da resposta imune em praticamente 100% dos indivíduos imunizados e aparecimento de somente reações locais moderadas. A maior desvantagem deste tipo de vacina é o seu alto custo de produção (Wiktor et al., 1964; Nicholson, 1996).



Vacinas preparadas em ovos embrionados

As vacinas preparadas em ovos embrionados (embrião de pato e de pinto) oferecem a mesma imunogenicidade e segurança que as outras vacinas, incluindo a vacina preparada em célula diplóide humana, e também apresentam baixo custo de produção. O produto final não contém traços de mielina e somente vestígios de antígenos aviários (Glück, 1996).

Vacinas de subunidades

As vacinas de subunidades são compostas por apenas componentes específicos dos vírus, como por exemplo, determinadas glicoproteínas do envelope viral (van Oirschot, 1999). Não contém o agente infeccioso íntegro, nem tampouco proteínas de origem celular ou séricas (Crick et al., 1969; Wunner et al., 1983).

Para o vírus da Raiva foram desenvolvidas vacinas de subunidade para a proteína G (antígeno imunodominante do vírus). Foi demonstrado que quando G é extraída do vírion, solubilizada e purificada, ela torna-se pobremente imunogênica. Isto indica que a mesma precisa estar ancorada em membranas lipídicas (Sureau et al., 1989). Assim, para restituir sua imunogenicidade, as moléculas G precisam estar ancoradas em lipossomos pré-formados ou associadas a membranas lipídicas virais (virossomos) (Sureau et al., 1989; Perrin et al., 1988). Nestas apresentações, as propriedades estruturais e imunológicas da glicoproteína são muito similares àquelas apresentadas pela partícula viral (Sureau et al., 1989). Quando testadas em experimentos de pré e pós-exposição ao vírus rábico, foi detectada atividade protetora com desencadeamento de resposta imune humoral e celular (Sureau et al., 1989).

Outro sistema de expressão para produção de proteínas virais (G e RNP) para uso em diagnóstico, estudos estruturais e produção de vacinas (King, 1993) é baseado em baculovírus. Este sistema, em tese, apresenta como vantagem a produção de grandes quantidades da proteína viral purificada. Drings et al. (1999) utilizaram o sistema de expressão em baculovírus para produzir as proteínas G e N do vírus rábico e avaliar a resposta imune de animais imunizados com estes antígenos recombinantes contra outros vírus do gênero *Lyssavirus*. As proteínas foram produzidas em uma forma antigênica e imunologicamente ativa. A proteína G demonstrou alta imunogenicidade. Foi demonstrado que a associação entre as proteínas recombinantes G e N foi a mais

imunogênica mas não aumentou o espectro de proteção contra amostras do vírus da raiva do genotipo 5 (EBL-1; Drings et al., 1999).

Vacinas com vetores virais

Com o objetivo de desenvolver vacinas mais eficazes e seguras, amostras virais geneticamente atenuadas têm sido utilizadas como vetores para a expressão de uma ou mais proteínas heterólogas, contra a(s) qual(is) o sistema imune potencialmente geraria uma resposta (Cavanagh, 1985; Fujii et al., 1994; Wang et al., 1997). Células nas quais o vírus vetor se replica *in vivo*, expressarão a proteína exógena havendo a produção tanto de uma resposta imune humoral como também de uma resposta mediada por células (Sheppard, 1999). Apresentam como vantagem a expressão da proteína heteróloga na sua forma nativa, ou seja, da mesma forma em que é expressa pelo vírion (Xuan et al., 1998). Uma outra vantagem é a segurança, uma vez que o vetor somente expressará os antígenos de interesse para a indução de uma resposta imune protetora. Assim, é reduzida ou eliminada a possibilidade de ocorrência da doença por exposição ao vírus vacinal, como pode ocorrer com vacinas vivas modificadas ou com vírus não adequadamente inativado (Sheppard, 1999). Entre os vetores virais utilizados para a produção de vacinas veterinárias, os mais comuns são os poxvírus (Wiktor et al., 1984; Fujii et al., 1994) adenovírus (Wang et al., 1997; Tims et al., 2000), herpesvírus (Xuan et al., 1998; Schmitt et al., 1999) e retrovírus (Wei et al., 1981).

Nos últimos anos, diferentes vetores têm sido utilizados para a expressão de proteínas imunodominantes do vírus da Raiva, dentre eles, o adenovírus (Wang et al., 1997; Tims et al., 2000), avipoxvírus (Taylor et al., 1991), herpesvírus (Xuan et al., 1998), vaccinia (Wiktor et al., 1984; Brochier et al., 1990; Fujii et al., 1994) e baculovírus (Fu et al., 1991; Drings et al., 1999). Em camundongos e em outras espécies-alvo (caninos e felinos) imunizados com a proteína G recombinante ou com vírus recombinante expressando a proteína G, houve a indução da produção de anticorpos neutralizantes e proteção dos animais desafiados com o vírus da raiva inoculado via intracerebral (Wiktor et al., 1984; Taylor et al., 1991; Wang et al., 1997). Experimentos realizados por Fujii et al. (1994) demonstraram a eficácia do vírus vaccinia contendo a proteína G do vírus da raiva em conferir proteção em camundongos imunizados em até 24 horas após desafio com este último. Por questões de segurança, foram desenvolvidos vetores a partir de vírus de aves, não replicativos em células de

mamíferos, expressando a proteína G do vírus da raiva (Taylor et al., 1988; Taylor et al., 1991). Um exemplo dessa estratégia foi a utilização do vírus canarypox como vetor expressando a proteína G. A eficácia deste recombinante utilizado como antígeno vacinal foi comparável à apresentada pelo vírus vaccinia recombinante (Taylor et al., 1991). Camundongos, cães e gatos imunizados com este vírus recombinante ficaram protegidos após o desafio.

Vacinas diferenciais para herpesvírus

Para o controle das infecções causadas pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) tem sido utilizada a vacinação dos rebanhos visando reduzir os sinais clínicos e diminuir a disseminação do vírus nos rebanhos. Entretanto, as vacinas convencionais, vivas atenuadas (modificadas) ou inativadas, utilizadas para o controle destas infecções induzem uma resposta por anticorpos que não pode ser diferenciada da resposta imune apresentada por animais naturalmente infectados (van Oirschot et al., 1990; van Oirschot, 1999). Como animais soropositivos são potencialmente infectantes em função da infecção latente, a impossibilidade de diferenciar animais vacinados de infectados compromete a identificação de potenciais portadores do vírus e, conseqüentemente, o controle dessas infecções (Van Oirschot et al., 1990; Van Oirschot, 1999). Para resolver este problema, foram desenvolvidas as chamadas "vacinas diferenciais" (*Differentiating infected from vaccinated; DIVA*) (van Oirschot et al., 1990; van Oirschot et al., 1999). Nestas vacinas, a atenuação do vírus utilizado ocorre a partir da deleção de genes estruturais considerados não essenciais à replicação viral (Flores et al., 1993; Kaashoek et al., 1994; van Engelenburg et al., 1994; Kaashoek et al., 1998). São alvos potenciais quaisquer proteínas que quando ausentes resultem em atenuação viral e que também sejam alvo dos anticorpos do hospedeiro após infecções naturais. Desta forma, animais que tenham anticorpos contra a proteína ausente no vírus vacinal são identificados como infectados. Assim, animais vacinados podem ser diferenciados de animais infectados permitindo o uso de vacinas concomitante com o delineamento de estratégias de controle ou erradicação (van Oirschot et al., 1990; van Oirschot et al., 1999).

A primeira vacina diferencial desenvolvida contra herpesvírus de animais foi a vacina contra a pseudorraiva, doença causada pelo herpesvírus de suínos (SHV-1; van Oirschot et al., 1986; Quint et al., 1987). Esta vacina contém uma deleção no gene que codifica a gE do SHV-1. Sua utilização em plantéis de suínos reduziu

significativamente a circulação de vírus de campo e, conseqüentemente, as perdas econômicas decorrentes da infecção (Kimman et al., 1992; De Jong et al., 1994).

Atualmente, o controle de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em países europeus onde a infecção é endêmica têm incluído a vacinação compulsória de rebanhos com uma DIVA, preparada a partir de uma amostra da qual a glicoproteína E (gE) foi removida ou deletada (Kaashoek et al., 1994). Esta vacina foi extensivamente avaliada no que diz respeito à segurança e eficácia (Kaashoek et al., 1994; Kaashoek et al., 1995; Strube et al., 1996; Bosch et al., 1998; Mars et al., 2000; Mars et al., 2001). Estudos similares realizados no Brasil com uma amostra gE negativa construída a partir de uma amostra autóctone de BHV-1, levaram a resultados similares (Franco et al., 2002a; Franco et al., 2002b).

O BHV-1 como vetor

Os herpesvírus apresentam diversas vantagens potenciais para o desenvolvimento de vacinas. Inicialmente, apresentam uma capacidade de inserção gênica de até 30 kilobases (kb; Sheppard, 1999). O seu uso induz não só uma resposta imune contra a (s) proteína (s) heteróloga (s), mas contra o próprio vetor, possibilitando o desenvolvimento de vacinas multivalentes (Sheppard, 1999). Além disso, foi demonstrado que a presença de imunidade prévia ao herpesvírus vetor não impede a replicação do mesmo, ao contrário de outros vírus, como o vaccínia, onde uma imunidade prévia ao vetor pode inativar uma segunda imunização com o vírus recombinante (Kundig et al., 1993). Já foram expressadas em um vetor BHV-1 as proteínas gB e gC do herpesvírus suíno tipo 1 (Takashima et al., 2002), a proteína G do vírus respiratório sincicial bovino (Kuhnle et al., 1998; Taylor et al., 1998) e a glicoproteína E2 do vírus da diarreia viral bovina (Schmitt, 1999).

OBJETIVOS

Caracterizar antigênica e molecularmente amostras brasileiras do vírus da Raiva isoladas de diferentes espécies animais e oriundas de diferentes regiões brasileiras.

Caracterizar antigênica e geneticamente uma amostra do vírus da Raiva isolada de um felino na região sul do estado do Rio Grande do Sul, merecendo destaque por tratar-se do primeiro caso de Raiva em felinos em uma área livre de raiva urbana por pelo menos 11 anos.

Construir, a partir de um vetor BHV-1, um recombinante contendo o gene que codifica a glicoproteína do vírus da Raiva, visando a expressão dessa proteína.

CAPÍTULO 2

Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates *

Schaefer, R¹, Batista, H.B.R², Franco, A.C², Rijsewijk, F.A.M³, Roehle, P.M^{2,4}.

¹ Embrapa Suínos e Aves, BR 153, Km 110, Vila Tamanduá, Caixa Postal 21, Concórdia, SC, Brasil 89700-000.

² Virologia, Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF / FEPAGRO), Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brasil 90001-970.

³ Animal Sciences Group of Wageningen University (WUR), Virus Discovery Unit, Edelhertweg, 15. P.O Box 65 NL-8200 AB Lelystad, The Netherlands.

⁴ Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brasil 90050-170.

* Aceito pela Veterinary Microbiology.

Abstract

Despite the recognized stability of rabies virus, differences among isolates from different species have been found. This work was carried out with the aim to identify antigenic and genomic differences in Brazilian rabies virus isolates and to verify whether such alterations would bear any relationship with the different hosts for the virus in nature. For that, seventy-nine Brazilian rabies viruses isolated from different host species and from distinct regions within Brazil were submitted to antigenic characterization with a panel of eleven monoclonal antibodies (Mabs) directed to lyssavirus antigens and to genomic analyses by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of the N gene followed by restriction endonuclease analysis (REA). In addition, the nucleotide sequences of part of the N gene (225 bp) of seven isolates, taken as representative of the majority of the viruses under study, were determined. The analyses with the Mabs and RT-PCR/REA allowed the identification of two major groups of variants, the first formed by most isolates of cattle and bats and the second formed by viruses of dog origin. Partial sequencing of the N gene confirmed the similarity among isolates from cattle origin and those of vampire bats. However, viruses from non-haematophagous bats exhibited consistent differences from those of vampire bat isolates. Such findings suggest that the variants have evolved fairly stable modifications which are not altered after passage in a dead-end host of a distinct species. No association could be established between antigenic or genomic alterations and geographic distribution of the isolates, which suggests that evolution of the virus has been directed to adaptation to the host species.

Keywords: Rabies, RT-PCR, REA, monoclonal antibodies, sequencing

Introduction

Rabies virus is a member of the Lyssavirus genus within the Rhabdoviridae family (Tordo, 1996). The Lyssavirus genus is presently divided into seven genotypes based on nucleotide and amino acid sequence analyses (Bourhy et al., 1993; Amengual et al., 1997; Gould et al., 1998). Genotype 1 (GT 1; classical rabies virus) has worldwide distribution and is so far the only genotype isolated in the Americas. The virus causes rabies in humans and other mammals, being transmitted predominantly by the bite of an infected vector species (King, 1993). In Brazil, the infection is maintained in two main cycles; the urban rabies, where dogs are the main reservoirs and the sylvatic cycle, where the main reservoirs are haematophagous bats (Wiktor & Koprowski 1982; Dietzschold et al., 1988), particularly the species Desmodus rotundus (Baer, 1975), which is the main source of infection for cattle. In addition, vampire bats are second only to dogs as cause of contamination of humans in Brazil (Anonymous, 1996). Nevertheless, other bats may occasionally be infected, although their role in the transmission and perpetuation of the infection disease remains uncertain (Germano, 1994). Despite the recognized antigenic stability of rabies virus, differences among isolates from different species have been found (Roehe et al., 1997; Loza-Rubio et al., 1999; Ito et al., 2001; Páez et al., 2003; Ito et al., 2003; Romijn et al., 2003). Such studies have usually relied on antigenic analyses with monoclonal antibodies (Mabs; Wiktor & Koprowski, 1978; Wiktor et al., 1980; Flamand et al., 1980; Dietzschold et al., 1988). The application of genomic methods of analysis revealed that apart from such antigenic differences, rabies virus isolates adapted to different species have conserved gene alterations which can also be used as epidemiological markers (Arai et al., 1997; Ito et al., 2001; Páez et al., 2003; Ito et al., 2003). In Brazil, the two main "natural" cycles of infection involving either haematophagous bats or domestic dogs as hosts had

already been identified in previous studies by both antigenic and genomic methods (Roehe et al., 1997; Ito et al., 2001; Schaefer et al., 2002; Ito et al., 2003; Romijn et al., 2003). Here, we report the identification of another possible natural cycle involving non-haematophagous bats and isolates with genomic adaptations to these hosts. Such modifications were made evident by nucleotide sequencing of a fragment of the N gene.

Material and methods

Viruses

Seventy-nine rabies virus isolates from calves (forty-seven), dogs (thirteen), nine from non-haematophagous bats (four from Tadarida brasiliensis, one from Molossus molossus and four from bats with no species identification), wild-dogs (Cerdocyon thous; three), two from cats, two from horses, two from unidentified hosts and one from a human case were obtained from different Brazilian states (Rondônia, RO; Paraíba, PB; Alagoas, AL; Pernambuco, PE; Mato Grosso, MT; Mato Grosso do Sul, MS; Minas Gerais, MG; Bahia, BA; São Paulo, SP; Rio de Janeiro, RJ and Rio Grande do Sul, RS; Figure 1) and analysed in the present study. Standard strains Challenge Virus Standard (CVS) and Pasteur Virus (PV) were included as controls (Table 1).

Rabies virus identification and multiplication

Initial rabies virus detection was carried out by a direct fluorescence antibody test (DFAT; Dean, 1996). Viruses were then multiplied by intracerebral inoculation of 3-4 week old mice with infected brain suspensions (10% in PBS, pH 7.4), as described by Koprowski (1996). Mice were observed daily and brains collected in extremis.



Figure 1. Geographic origin of rabies virus isolates in Brazil (circles refers to states of origin of isolates).

Table 1. Origin of rabies virus isolates examined in the present study.

Species	Origin of isolates	Year of isolation	Identification number
Human	Bahia	unknown	022
Cat	Bahia	unknown	570
Dog	Bahia	unknown	028,068,085, 556,564,568,571,572,577,585
Dog	Pernambuco	2001	3558, 3576, 3578
Wild dog ¹	Paraíba	2001	2217, 2263, 3354
Cattle	Pernambuco	2001	3544
Cattle	Rio Grande do Sul	1991	1151
Cattle	Rio Grande do Sul	1997-2000	069, 139, 166, 205, 207, 075, 083, 117,148, 158,168, 187, 189,201, 062, 086, 116, 014, 033, 071
Cat	Rio Grande do Sul	2001	97
Bat ²	Rio Grande do Sul	2001-2003	686, 576, 78, 129, 231, 244
Cattle	São Paulo	1997-1998	M40, M69, M96, M170, M173, M447, M1169, M745, M441, M808, M1190
Unknown ³	São Paulo	1997-1998	M1768, M420
Bat ⁴	São Paulo	unknown	545, 1024, 2138
Cattle	Rio de Janeiro	unknown	64, 116, 131
Horse	Rio de Janeiro	unknown	85
Cattle	Minas Gerais	1998	M928, M1033
Horse	Minas Gerais	1998	M1501
Cattle	Rondônia	1997	M03
Cattle	Mato Grosso	1998	M173
Cattle	Alagoas	2001	3462
Cattle	Mato Grosso do Sul	2001	16,17,18,19,20,21

¹Cerdocyon thous.

²one bat species not identified, one Molossus molossus and four Tadarida brasiliensis.

³There is no reliable information.

⁴Non-haematophagous bats (species unknown).

Monoclonal antibodies

A panel of eight monoclonal antibodies (Mabs), produced by the immunization of BALB/C mice with rabies-related members of the *Lyssavirus* genus (Mabs L3 and L18 from Lagos Bat virus; DB1, DB3, DB4 and DB9 from European Bat Lyssaviruses, previously denominated "Denmark bat"; D3 from Duvenhage virus and M11 from Mokola virus) was prepared elsewhere (King, 1991). Three additional Mabs, one prepared with the CVS strain (Mab CVS-2; Roehe et al., 1997) and two other prepared with a Brazilian rabies virus isolate of bovine origin (Mabs 5A3 and 5G2; Schaefer, 1999) were also included in the panel. The determination of the profiles of reactivity with the Mabs was performed by indirect immunofluorescence as described (Roehe et al., 1997). Briefly, acetone fixed smears of infected mouse brains were incubated with appropriate dilutions of each Mab (prepared in PBS, pH 7.4) for 30 min at 37°C, washed to remove unbound antibody and stained with a rabbit anti-mouse IgG/fluorescein conjugate (Dako, Denmark). Slides were examined on an epifluorescence microscope (Axiolab, Carl Zeiss).

RNA isolation, cDNA synthesis and PCR amplification

Total viral RNA was extracted from infected brain tissues with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to manufacturer's instructions. cDNA synthesis of the genomic RNA and PCR amplification were performed with primers that target the entire rabies N gene: Sense primer PVN7 (5' ATGTAACACCTGTACAATG 3'), corresponding to positions 55 to 73 on the PV rabies virus genome, and antisense primer PVN8 (5' AGTTTCTTCAGCCATCTC 3'; 1585 to 1565) (Tordo et al., 1986). Viral RNA (3 to 5 µg) was reverse-transcribed using 15 units of ThermoScript reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and amplified by PCR using Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 5 units/µl) in PCR buffer (1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl, 20mM Tris-HCl

pH 8, 200 μ M each dNTP) in a final volume of 50 μ l. Thermal cycling conditions were: one cycle at 94 °C for 1 minute; 35 cycles at 94 °C for 1 minute, 50 °C for 1 minute and 72 °C for 1 minute, followed by one final incubation at 72 °C for 5 minutes.

Restriction endonuclease analysis (REA)

Restriction enzymes Pvu II and Bgl II (Promega, Madison, USA) were chosen because they allowed the differentiation among rabies samples isolated from different animal species. PCR products (5 μ l) were digested with both enzymes at 37 °C for 1 hour. The products obtained were examined by electrophoresis in 0.7 % agarose gels and visualized under a UV light after ethidium bromide staining.

Sequence analysis

Seven isolates taken as representative of all possible variants detected in this study by antigenic analyses and/or by RT-PCR/REA (97, 189, 576, 585, 686, 2217 and 2263) had part of the N gene submitted to nucleotide sequence analysis. RT-PCR products were cloned into plasmid pCR 2.1, according to the manufacture's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced using a set of internal primers within the N gene (Sense primer 5' CTACAATGGATGCCGAC 3', at positions 66-82 of PV rabies virus genome and anti-sense primer 5' TGGGGTGATCTT(A/G)TCTCCTTT 3', at positions 365-385; Arai et al., 1997). The sequences of both sense and anti-sense strands of 225 bp corresponding to nucleotides 140-364 on the N gene were determined using a Beckman CEQTM 8000 eight-channel capillary DNA Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Protein sequences were predicted from nucleotide sequence data. A Phylogenetic analysis of the seven rabies virus isolates was performed by the neighbour-joining method using the ClustalW multiple alignment package (Thompson et al., 1994). Three other sequences available at GenBank

database (Accession numbers AF070449, AF070450 and rvu22862) were included in the analyses for comparisons.

Results

Antigenic analysis

From the total seventy-nine samples examined, sixty-six (83.5 %) rabies virus isolates were submitted to antigenic analyses. The analyses could not be performed on the other thirteen isolates in view that samples were in advanced state of decomposition and infectious virus could not be recovered from those. Nevertheless, such deteriorated samples still allowed RT-PCR/REA analysis, as below). The patterns of antigenic reactivity of rabies virus isolates with the anti-Lyssavirus Mabs is shown in Table 2. The majority of the isolates could be separated into two major antigenic groups, one including viruses from cattle and haematophagous bats as well as three other isolates, one from a cat (number 97), one from an unidentified host and the standard strain CVS. The second major group consisted of isolates from domestic dogs, one from a wild-dog (Cerdocyon thous) and one from a human case of rabies. Apart from these, two other groups of reactivity could be visualized by Mab analysis, one represented by three samples isolated from non-haematophagous bats, and another which comprised the standard strain PV plus two isolates (one from a dog and one from a wild-dog).

Restriction endonuclease analysis (REA)

RT-PCR products with the expected molecular size (1.5 kb) were obtained from 77 (97.4 %) out of 79 isolates under study. The isolates were submitted to REA with Pvu II and Bgl II. The following patterns of REA could be observed (Table 2). The majority of isolates were divided into two groups; for bat-related variants, including isolates from cattle, a cat (number 97) and from horses, Pvu II gives two fragments of 1100 and 430 bp, Bgl II gives two

fragments of 1000 and 530 bp. For dog-related variants, Pvu II gives two fragments of 830 and 700 bp, Bgl II gives no fragments (Table 2, Figure 2).

Two bat isolates (numbers 1024 and 686) displayed a distinct REA profile with Pvu II when compared to other cattle-bat viruses (Figure 2). One dog isolate (number 568) was not cleaved with Pvu II. Isolates from wild-dogs (Cerdocyon thous; numbers 2217, 2263 and 3354) gave rise to Pvu II fragments equal to those of urban dogs. However, those could be distinguished from urban dogs isolates when digested with Bgl II (Figure 2).

Phylogenetic analysis of representative Brazilian rabies virus isolates

Alignments of the amino acid (AA) sequences predicted from the nucleotide sequence data of seven Brazilian rabies virus isolates (97, 189, 576, 585, 686, 2217, 2263) and three other sequences obtained from GenBank (Figure 3) revealed homologies of at least 88.5 % between the sequences examined, confirming that isolates were all genotype 1 viruses. Two main groups of rabies virus variants could be identified, associated to the two main known rabies virus reservoirs in Brazil: dogs and vampire bats. Amino acid sequence homology among dog-related viruses (585, 2217, 2263 and rvu22862) was between 97.3 % and 98.6 %, whereas on bat-related viruses (97, 189, 576, 686, AF070449 and AF070450) homologies between 90.4 % and 100 % were detected. However, some viruses obtained from non-haematophagous bats revealed significant differences in AA sequences. Two isolates, one obtained from a cat (number 97) and one from a non-haematophagous bat Molossus molossus showed a homology of 99.3 % and 100 %, respectively, with rabies virus isolated from Tadarida brasiliensis. Sample 686 obtained from a non-haematophagous bat with no identification showed the lowest homology when compared to other isolates of bat origin.

Table 2. Results of the reactivity patterns of Brazilian rabies virus isolates against monoclonal antibodies to *Lyssavirus* antigens and restriction endonuclease analysis (REA) (Only the relevant monoclonal antibody reactivity patterns are shown).

Monoclonal antibodies					REA		
Isolates	CVS-2	L18	DB3	DB4	Isolates	PvuII	Bgl II
Cattle (43) ¹					Cattle (47)		
Bat (06)					Bat (07)		
Cat ² (01)					Cat ² (01)	1100 and 430 bp	1000 and 530 bp
Unknown ³ (01)					Unknown (02)		
CVS					Horse (02)		
Bat (03)					Bat (02)	930, 430 and 170 bp	1000 and 530 bp
Wild dog ⁴ (01)					Wild dog (03)	830 and 700 bp	1000 and 530 bp
PV					PV	830 and 700 bp	no fragments
Dog (08)					Dog (10)	830 and 700 bp	no fragments
Human (01)					Human (01)		
Wild dog (01)					Cat ⁵ (01)		
Dog (01)					Dog (01)	no fragments	no fragments

Hatched boxes indicate positive reaction; white boxes indicate negative reaction.

¹ Numbers between parenthesis refers to the number of isolates with the same pattern of reaction.

² Refers to cat isolate 97.

³ There is no reliable information.

⁴ Wild dog (*Cerdocyon thous*).

⁵ Refers to cat isolate 570.

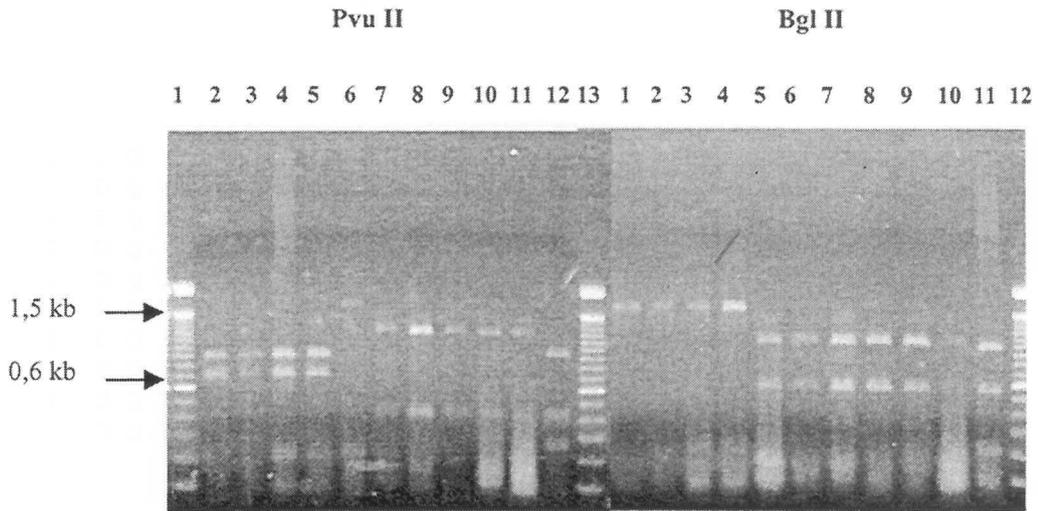


Figure 2. Results of the restriction endonuclease analysis of rabies N gene with representative rabies virus isolates of dog and bat origin using the restriction enzymes Pvu II and Bgl II.

```

D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P S I T L Majority
-----+-----+
                10                20
-----+-----+
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P Y I T L rvu22862
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P C I T L 585
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P C I I L 2217
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P C I T L 2263
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P S I T L AF070449
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P S I T L 189
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P S I T L AF070450
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P S I T L 97
1  D Q Y E Y K Y P A I K D L K K P S I T L 576
1  D Q Y E Y K Y P A I K D S R K P S I T L 686

```

```

G K A P D L N K A Y K S V L S G M N A A Majority
-----+-----+
                30                40
-----+-----+
21 G K A P V L N K A Y K S V L S G M N A A rvu22862
21 G K A P D L N K A Y K S V L S G M N A A 585
21 G K A P D L N K A Y K S V L S G M N A A 2217
21 G K A P D L N K A Y K S V L S G M N A A 2263
21 G K A P D L S K A Y K S I L S G M N A A AF070449
21 G K A P D L N K A Y K S I L S G M N A A 189
21 G K A P D L N K A Y K S V L S G M N A A AF070450
21 G K A P D L N K A Y K S V L S G M N A A 97
21 G K A P D L N K A Y K S V L S G M N A A 576
21 G K A P D L N K A Y K S I L S G M N A A 686

```

```

K L D P D D V C S Y L A A A M Q F F E G Majority
-----+-----+
                50                60
-----+-----+
41 K L D P D D V C S Y L A A A M Q F F E G rvu22862
41 K L D P D D V C S Y L A A A M Q F F E G 585
41 K L D P D D V C S Y L A A A M Q F F E G 2217
41 K L D P D D V C S Y L A A A M Q F F E G 2263
41 K L D P D D V C S Y L A A A M Q F F E G AF070449
41 K L D P D D V C S Y L A A A M Q F F E G 189
41 K L D P E D V C S Y L A A A M Q F F E G AF070450
41 K L D P E D V C S Y L A A A M Q F F E G 97
41 K L D P E D V C S Y L A A A M Q F F E G 576
41 K L D P D D V C S Y L A A A M Q F F E G 686

```

Figure 3. Alignments of the deduced amino acid sequences of a part of the N gene (nt positions 140-364) of seven Brazilian rabies virus isolates and three other rabies viruses (AF070449, AF070450 and rvu22862) obtained from GenBank. The first four alignments are dog related viruses. The latter six alignments are the bat-related viruses.

	T	C	P	E	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	Majority
	-----+-----+															
	70															
	-----+-----+															
61	T	C	A	E	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	rvu22862
61	T	C	P	E	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	585
61	T	C	P	E	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	2217
61	T	C	P	E	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	2263
61	S	C	P	E	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	AF070449
61	S	C	P	E	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	189
61	A	C	P	D	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	AF070450
61	A	C	P	D	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	97
61	A	C	P	D	D	W	T	S	Y	G	I	L	I	A	R	576
61	A	C	P	D	D	W	V	S	Y	G	I	L	I	A	R	686

Figure 3. cont.

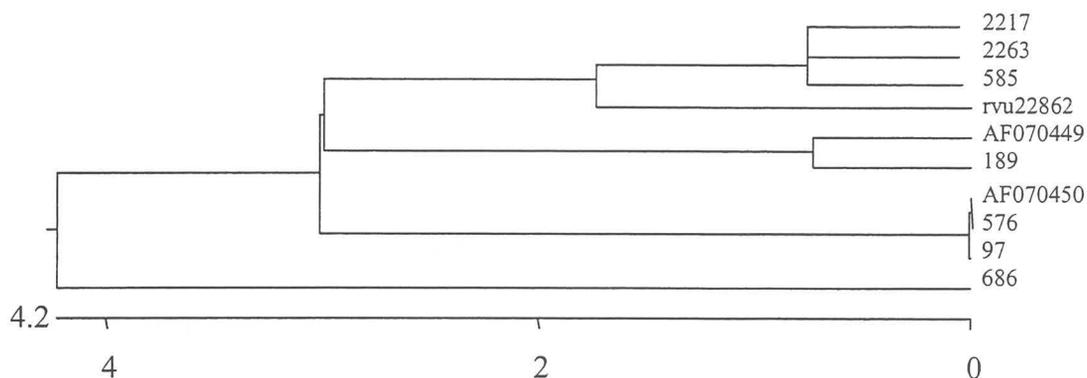


Figure 4. A phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences presented in Fig. 3. Origin of isolates: Samples 2217 and 2263 (wild-dogs; Cerdocyon thous), sample 585 (dog origin), sample 189 (bovine origin), sample 576 (non-haematophagous bat Molossus molossus), sample 97 (feline origin), sample 686 (bat origin, species not identified), rvu22862 (dog origin), AF070449 (haematophagous bat Desmodus rotundus), AF070450 (non-haematophagous bat Tadarida brasiliensis).

Discussion

The majority of isolates under study were associated with the two main known rabies virus reservoirs in Brazil, dogs and vampire bats. These findings had already been pointed out by other researchers (Dietzschold et al., 1988; Ito et al., 2001; Ito et al., 2003; Romijn et al., 2003). In addition, here we have been able to detect a third group of variants represented by three isolates of non-haematophagous bat origin. In view of the different biological reservoirs of the virus, differences in the antigenic makeup of isolates were expected and could be associated to the distinct species of origin of the variants (Table 2). Unlike the findings of others (Smith et al., 1986, Loza-Rubio et al., 1996, Delpietro et al., 1997) no relationship could be established with the occurrence of variants and the geographic origin of isolates, despite the vast distances which separate some of the isolates examined in the present study (Figure 1).

In order to obtain more detailed information about possible variants, samples were submitted to genomic analyses. The N gene was targeted because of its relatively high degree of conservation regardless of the passage history of the viruses (Tordo et al., 1986, Arai et al., 1997). Amplification of the N gene followed by REA largely confirmed the antigenic difference detected by Mab analysis (Table 2). REA with enzymes Pvu II and Bgl II allowed a clear differentiation between isolates from cattle-bat from those related to dog viruses. The source of infection for forty-seven cattle, one cat (number 97), two horses and two samples with no identification could be associated to bats. For two samples, one isolated from a human and one from a cat (number 570) the source of infection was domestic dogs.

RT-PCR/REA presented a significant advantage over Mab antigenic typing in that it was very fast to perform, requiring less than 24 hours to provide results (Schaefer et al., 2002), as opposed to Mab antigenic typing, which requires multiplication of viruses and

further processing of samples, what may take various days to provide results. Another advantage of RT-PCR/REA, is that viral RNA extraction can be performed even on decomposed samples that may cause problems at virus isolation in mice or cell culture, thus hampering antigenic characterization with Mabs (David et al., 2002). Such was the case with 13 isolates in the present study.

To deepen further the characterization of variants, representative isolates of the variants identified with the anti-Lyssavirus panel and by RT-PCR/REA were submitted to nucleotide sequence analysis of part of the N gene (nt 140-364) which has been considered useful to differentiate rabies virus isolates obtained from different species (Arai et al., 1997). The sequences obtained were compared with other rabies virus sequences of the same region available in GenBank. This allowed to confirm that the majority of isolates from cattle were closer to rabies viruses of haematophagous bats, thus confirming the most likely origin of such isolates (Roehle et al., 1997).

The most striking observation of the present study is one bat rabies virus variant (number 686) which displayed a distinct profile when compared to other bat isolates. The differences were made evident by all analytical methods employed here. Unfortunately, the bat species of origin of this isolate was not identified. However, by sequence analysis, a lower homology with rabies N gene obtained from haematophagous bats was detected and the isolate formed a distinct cluster. It is interesting to highlight that such genomic modifications are apparently species-conserved; the changes seem quite stable and are not modified after one or a few passages in a different host. Thus, viruses from haematophagous bat origin conserve their alterations despite passage in cattle. Likewise, at least for one virus passage in mice in laboratory conditions, variants do not seem to modify the species-associated, conserved genomic modifications detected here. This is extremely useful in that the

species of origin of the variant can be detected, regardless of species of the final host from which it was isolated. Such information might be useful for tracing the origin of rabies outbreaks. Indeed, it was the case in a recent episode in São Lourenço do Sul, RS, Brazil, where a cat rabies isolate (number 97), found in an area free of urban rabies since 1990 (Caldas & Anjos, 1997), could be associated to a bat-related virus, since the isolate displayed a bat-like RT-PCR/REA genomic pattern (Schaefer et al., 2002). Although REA suggested a vampire bat-like isolate, sequence analysis revealed higher homology (99.3%) with viruses from the non-haematophagous bat Tadarida brasiliensis (accession number AF070450; Figure 3). The gene alterations found on isolates from non-haematophagous bats probably reflect an independent biological cycle in this species, which seems to have evolved independently of vampire bat viruses. This is in accordance with the observation that haematophagous and non-haematophagous bats live in separate niches, despite sometimes inside a same shelter (Rossatto N, personal communication).

The adaptation of the virus to non-haematophagous bats brings up special concern in view of the possibility of human contact with such species. One of these, a insectivorous bat, named T. brasiliensis, is fairly common in urban environment in Brazil, and has occasionally been found contaminated with rabies despite collected in urban centres of large cities (more than one million inhabitants) (Table 1). A similar situation has been found in Chile and Mexico where insectivorous bats (T. brasiliensis and T. brasiliensis mexicana) have been recognized as the main reservoir for sylvatic rabies, acting as sources of infection for man and domestic animals in urban areas (Favi et al., 1991).

Conclusion

Rabies virus has apparently developed mechanisms of adaptation to the respective host species which can be detected by conserved genetic alterations in the N coding region. Such alterations seem conserved for isolates circulating within a particular host species and may be used as epidemiological markers. Occasional "jumps" to a different species (such as viruses from vampire bats in cattle) are not sufficient to induce genetic alterations, what allows for the patterns of the virus to be traced back to its host of origin.

Acknowledgments

The authors would like to thank Drs. E. Aguiar and M. Almeida (CCZ) SP, Brazil; Dr. C. Nagatta (LCSP) BA, Brazil; L. Pantoja (FEPPS) RS, Brazil; D. Pinheiro (LAPA) PE, Brazil; IBSP, SP, Brazil; R. Lemos (UFMS) MS, Brazil; R. M. Souza and P. C. Romijn (PESAGRO) RJ, Brazil, for supplying rabies virus isolates for this study. R. Schaefer is a PhD student from UFRGS, Brazil; P.M. Roehe is a Brazilian National Research board (CNPq) research fellow (level IC). This study was supported by CNPq, CAPES, the Programa de Núcleos de Excelência and the State of Rio Grande do Sul.

References

- Amengual, B., Whitby, J.E., King, A.A, Cobo, J.S., Bourhy, H., 1997. Evolution of European bat lyssavirus. *J. Gen. Virol.* 78, 2319-2328.
- Anonymous, 1996. Manual da Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde, Brazil, pp 30-36.
- Arai, Y.T., Yamada, K., Kameoka, Y., Horimoto, T., Yamamoto, K., Yabe, S., Nakayama, M., Tashiro, M., 1997. Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. *Arch. Virol.* 142, 1787-1796.
- 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. Taxonomy and evolutionary studies on lyssaviruses with special reference to Africa. *Onderstepoort J. Vet.* 60, 277-282.
- Caldas, E., Anjos, C.B., 1997. Programa estadual de controle e profilaxia da raiva. Norma Técnica e Operacional. Secretaria da Saúde. Brazil. pp 5-40.
- David, D., Yakobson, B., Rotenberg, D., Dveres, N., Davidson, I., Stram, Y., 2002. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet. Microbiol.* 87, 111-118.
- Dean, D.J., Abelseth, M.K., Atanasiu, P., 1996. The fluorescent antibody test. In: Meslin, F-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory techniques in rabies*, World Health Organization, Geneva, pp 88-93.
- 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. *J. Vet. Med.* B44, 477-483.
- Dietzschold, B., Rupprecht, C.E., Tollis, M., Lafon, M., Mattei, J., Wiktor, T.J., Koprowski, H., 1988. Antigenic diversity of glycoprotein and nucleocapsid proteins of

- rabies and rabies related viruses: Implications for epidemiology and control of rabies. *Rev. Infect. Dis.* 10, 785-798.
- Favi, C.M., Duran, J.C., 1991. Epidemiología de la rabia en Chile (1929-1988) y perspectivas en mamíferos silvestres. *Avances en Ciencias Veterinarias* 6, 13-21.
- Flamand, A., Wiktor, T.J., Koprowski, H., 1980. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 48, 97-104.
- Germano, P.M.L., 1994. Avanços na pesquisa da raiva. *Rev. Saude Publ.* 28, 86-91.
- Gould, A.R., Hyatt, A.D., Lunt, R., Kattenbelt, J.A, Hengstberger, S., Blacksell, S.D., 1998. Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. *Virus Res.* 54, 165-187.
- Ito, M., Arai, Y.T., Itou, T., Sakai, T., Ito, F.H., Takasaki, T., Kurane, I., 2001. Genetic characterization and geographic 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., Sakai, 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 polymorphism analysis. *J. Clin. Virol.* 26, 317-330.
- King, A.A., 1991. Studies of the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. PhD thesis, University of Surrey, Guilford, U.K.
- King, A.A., Turner, G.S., 1993. Rabies. A review. *J. Comp. Pathol.* 108, 1-39.
- 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.

- Loza-Rubio, E., Vargas, R., Hernandez, E., Batalla, D., Aguillar, A., 1996. Investigation of virus rabies strains in Mexico with a panel of monoclonal antibodies used to classify lyssavirus. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 30, 31-35.
- Loza-Rubio, E., Aguilar-Setién, A., Bahloul, C., Brochier, B., Pastoret, P.P., Tordo, N., 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. Med. Res.* 30, 144-149.
- Páez, A., Nuñez, C., García, C., Bóshell, J., 2003. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. *J. Gen. Virol.* 84, 795-802.
- Roehe, P.M., Pantoja, L.D., Schaefer, R., Nardi, N.B., King, A.A., 1997. Analysis of Brazilian rabies virus isolates with monoclonal antibodies to Lyssavirus antigens. *Rev. Microbiol.* 28, 288-292.
- Romijn, P.C., van Der Heide, R., Cattaneo, C.A.M., Silva, R.C.F., van Der Poel, W.H.M., 2003. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 81-86.
- Schaefer, R., 1999. Produção de anticorpos monoclonais contra vírus rábico de origem bovina e caracterização de amostras. MsC dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. pp 1-70.
- 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, 216-217.
- Smith, J.S., Reid-Sanden, F.L., Roumillat, L.F., Trimarchi, C., Clark, K., Baer, G., Winkler, W.G., 1986. Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. *J. Clin. Microbiol.* 24, 573-580.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

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 Res.* 14, 2671-2683.

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., 1978. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: Detection of antigenic variants. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3938-3942.

Wiktor, T.J., Flamand, A., Koprowski, H., 1980. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses. *J. Virol. Methods* 1, 33-46.

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.

Capítulo 3

First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years *

Schaefer, R¹, Caldas, E³, Schmidt, E¹, King, AA⁴, Roehe, P.M^{1,2}

¹ Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF / FEPAGRO), Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brazil 90001-970

² Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil 90050-170

³ Secretaria Estadual da Saúde, Coordenação de Política de Zoonoses e Vetores. Avenue Borges de Medeiros, 727, Porto Alegre, RS, Brazil 90020-025

⁴ Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Addlestone, Surrey

* Publicado na Veterinary Record, 150: 216-217, Feb 16, 2002.



Rabies virus is a member of the *Lyssavirus* genus within the *Rhabdoviridae* family. The virus has been known to cause rabies in human beings and other mammals for many years, and is transmitted by the bite of an infected vector species. In urban rabies, the virus is transmitted by dogs, with cats being occasionally involved (Vaughn, 1975). In non-urban rabies or sylvatic rabies, the cycle is maintained with different species acting as vectors. In South America, the major reservoir of the virus in the non-urban cycle is the haematophagous (vampire) bat *Desmodus rotundus* (Baer, 1975). This species feeds preferentially on cattle, the main dead-end host for the virus (Montaño and Polack 1988, Preto and Germano, 1990). Vampire bat rabies isolates have been found to be antigenically similar to bovine viruses and distinct from canine rabies isolates (Roehe and others, 1997, Schaefer, 1999).

In the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, urban rabies has not been detected since 1990 (Caldas & Anjos, 1997). This short communication describes the first case of rabies in a cat within the state for 11 years.

A two-year-old female cat, which had not been vaccinated against rabies, was kept as a pet on a farm in a rural area near São Lourenço do Sul. The animal suddenly became aggressive, tried to bite other animals on the farm and attacked its owner. Over the next two to three days the cat became apathetic and developed ataxia, which was soon followed by posterior paralysis. On the sixth day after the attack on the owner, the cat was found dead and it was buried.

Subsequently, the owner sought medical attention in view of local infection of the wound caused by the animal and was alerted to the possibility of rabies. The cat was then exumed and a portion of brain material, despite being in advanced state of decomposition, was sent to the CPVDF laboratory. Rabies infection was diagnosed by the direct fluorescent antibody test (Dean and others 1996). Immediately, the viral genome was extracted from brain tissues and subjected to reverse-transcription/PCR reaction (RT-PCR) amplification of the N gene as described by Bourhy and others (1992). Other viruses included for comparisons were a bat rabies isolate (1024), two isolates of canine origin (577 and 028), three isolates of bovine origin (086/99, 189/98 and 201/98) and a reference strain (CVS-31). Amplicons of the expected size (1531 base pairs) were obtained and subjected to restriction endonuclease analysis (REA) with enzymes *PvuII* and *BglIII*. The REA profiles revealed that the profile obtained from the

feline isolate origin was similar to the cattle and vampire bat isolates, and distinct from the isolates from dog rabies (Fig. 1).

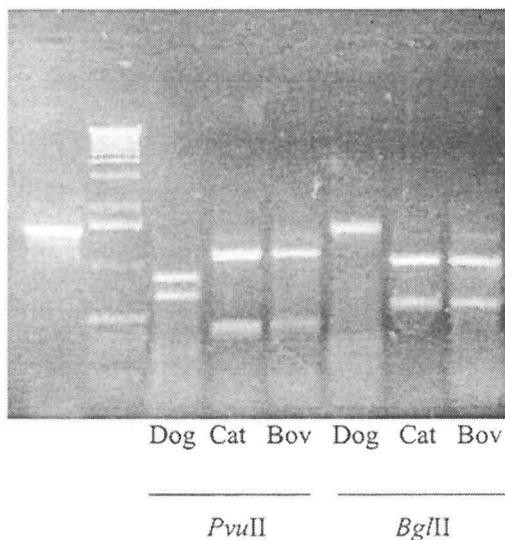


Figure 1: Reverse-transcription PCR and restriction enzyme analysis of the N gene of rabies virus isolates of feline, canine and bovine origin. Lane 1 PCR amplification of the N gene of the feline isolate 97/01 (expected size 1531 base pairs bp), Lane 2 1kb molecular weight marker, lanes 3 to 5 N gene amplicons digested with *PvuII*, Lanes 6 to 8 N gene amplicons digested with *BglII*. Lanes 3 and 6 canine isolate 577, Lanes 4 and 7 feline isolate 97/01, Lanes 5 and 8 bovine isolate 189/98.

In order to examine the antigenic composition of the isolate, a 10 per cent brain suspension was inoculated into six weaned mice by standard methods (Koprowski 1996) and infected brain smears prepared for monoclonal antibody analysis. The determination of patterns of reactivity was performed with a panel of 12 monoclonal antibodies directed to viral nucleocapsid antigens as described by King (1991), Roehle and others (1997) and Schaefer (1999). The pattern obtained confirmed the similarity of the virus to other bat and bovine rabies isolates (Table 1).

Epidemiological analysis of the case indicated that there had been no rabies cases in dogs in the area since 1988. No dogs or other possibly infected animals had been brought close to, or come in contact with the cat. However, no cases of cattle rabies had recently been described in the area, despite frequent reports of cattle being bitten by vampire bats. In view of the epidemiological situation, the most likely route of

transmission of infection to the cat was presumed to be through contact with an infected bat. Although neither the bat nor the vestiges of bat tissues were found, it is possible that the cat somehow caught an infected bat which could have been the source of infection. The RT-PCR followed by REA characterisation made it possible to point towards the likely source of the infection within 24 hours of receipt of the suspect brain tissue at the laboratory. Moreover, there was a positive impact on the town's population, as citizens were assured that the area remained free from urban rabies. The quick characterisation of the isolate also prompted the adoption of adequate control measures. Efforts were directed towards reducing the vampire bat population, although the vaccination of dogs and cats was also carried out to ensure that pets from the community would be adequately immunised. The bitten person remains under observation.

Table 1: Monoclonal antibody profile of reactivity of the cat rabies isolate (feline 97/01) and other representative isolates of bovine and canine origin.

Isolates	Monoclonal antibody*			
	7C1	L18	DB3	DB4
Bat 1024	+	-	+	+
Bovine 086/99	+	-	+	+
Bovine 189/98	+	-	+	+
Bovine 201/98	+	-	+	+
Feline 97/01	+	-	+	+
CVS-31 (control)	+	-	+	+
Canine 577	-	-	-	-
Canine 028	-	-	-	-

*Isolates were tested against a panel of 12 different monoclonal antibodies (King 1991, Roehle and others 1997, Schaefer 1999) but only the relevant profiles are shown.

References

- BAER, G.M. Bovine paralytic rabies and rabies in vampire bat. In: **Natural History of Rabies**. Vol. II Ed G.M.Baer. London, Academic Press: p. 155-175. 1975.
- BOURHY, H., KISSI, B., LAFON, M., SACRAMENTO, D., TORDO, N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2419-2426. 1992.
- CALDAS, E., ANJOS, C.B. Programa estadual de controle e profilaxia da raiva. **Norma Técnica e Operacional**. Secretaria da Saúde. RS, Brazil: p. 5-40. 1997.
- DEAN, D.J., ABELSETH, M.K., ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 88-93. 1996.
- KING, A.A. **Studies of the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies**. Thesis. Guilford, U.K., University of Surrey. 1991.
- KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 80-86. 1996.
- MONTAÑO, J.A.; POLACK, G.W. Characterization of rabies virus isolated from bovines in Paraná (Brazil) by using monoclonal antibodies. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, p. 595-601. 1988.
- PRETO, A A.; GERMANO, P.M.L. Evaluation of the rabies vaccine, PV/ BHK origin, against rabies virus strains of canine and bovine origin. **Arquivos de biologia e Tecnologia**, v. 33, p. 241-245. 1990.
- ROEHE, P.M., PANTOJA, L.D., SCHAEFER, R., NARDI, N.B., KING, A.A. Analysis of Brazilian rabies virus isolates with monoclonal antibodies to Lyssavirus antigens. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 288-292. 1997.
- SCHAEFER, R. **Produção de anticorpos monoclonais contra vírus rábico de origem bovina e caracterização de amostras**. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1999.
- VAUGHN, J.B. Cat rabies. In: **Natural History of Rabies**. Vol. II Ed G.M.Baer. London, Academic Press: pp 139-154. 1975.

ACKNOWLEDGEMENTS

Isolate 1024 was a gift from Dr E. Aguiar and Dr M. Almeida, Center for Control of Zoonosis, São Paulo, SP, Brazil. Isolates 577 and 028 were a gift from Dr C. Nagatta, Central Laboratory for Public Health, Salvador, BA, Brazil. Strain CVS-31 was a gift from L. Pantoja, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil. Isolates 086/99, 189/98 and 201/98 were obtained from the Center for Veterinary Research Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS, Brazil. R. Schaefer is in receipt of a PhD fellowship from Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; P.M. Roehle is a Brazilian National Research Board (CNPq) research fellow (level IC). This study was supported by CNPq, the Programa de núcleos de excelência and the State Government of Rio Grande do Sul.

Capítulo 4

Construção de um herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) recombinante contendo o gene que codifica a glicoproteína (G) do vírus da Raiva *

Schaefer, R¹, Rijsewijk, F.A.M², Franco, A.C³, Roehe, P.M³

¹ Embrapa Suínos e Aves, BR 153, Km 110, Vila Tamanduá, Caixa Postal 21, Concórdia, SC, Brasil 89700-000.

² Animal Sciences Group of Wageningen University (WUR), Virus Discovery Unit, Edelhertweg, 15. P.O Box 65 NL-8200 AB Lelystad, The Netherlands.

³ Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF / FEPAGRO), Caixa Postal 47, Eldorado do Sul, RS, Brasil 92990-000.

* Manuscrito em preparação

RESUMO

O gene G do vírus da Raiva foi sintetizado quimicamente, para remoção dos sítios de *splicing* potenciais do RNA, e inserido no locus do gene que codifica a glicoproteína E (gE) de uma amostra de Herpesvírus Bovino Tipo-1 (BHV-1). O DNA genômico do BHV-1 *wild-type* foi co-transfectado com um fragmento de DNA contendo as regiões flanqueadoras da gE do BHV-1, o promotor do citomegalovírus humano (hCMVie-1) e o gene G sintético. A seleção do vírus recombinante (BHV-1gE⁻ Raiva G) foi realizada pela detecção da expressão da proteína G do vírus rábico na membrana das células infectadas pelo recombinante através do teste de imunoperoxidase utilizando, como anticorpos primários, anticorpos policlonais produzidos contra o vírus da Raiva. Embora tenha sido demonstrada a expressão da glicoproteína do vírus da Raiva em células infectadas pelo recombinante, não foi possível isolá-lo.

PALAVRAS-CHAVE: Raiva, vírus recombinante, BHV-1, bovino.

ABSTRACT

A synthetic gene corresponding to the glycoprotein (G) gene of rabies virus, but from which most potential splicing signals were removed, was inserted into the gE gene locus of a strain of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1). The genomic DNA of the wild-type BHV-1 was co-transfected with a DNA fragment containing the 5' and 3' flanking regions of the gE of BHV-1, the human citomegalovirus promoter (hCMVie) and the synthetic G gene. Selection of the recombinant virus (BHV-1gE⁻rabies G) was carried out by the detection of the rabies G protein expression on membranes of infected cells through immunoperoxidase test with policlonal antibodies against rabies virus. Although rabies G protein expression was demonstrated on cells infected by the recombinant virus, it was not possible to isolate it.

KEY WORDS: Rabies, recombinant virus, BHV-1, bovine.

1. INTRODUÇÃO

A Raiva é causada por um *Lyssavirus* da família *Rhabdoviridae*. A doença afeta o sistema nervoso central de mamíferos terrestres e aéreos (quirópteros), sendo quase que invariavelmente fatal. O vírus rábico é mantido na natureza em dois ciclos inter-relacionados: o ciclo urbano e o ciclo silvestre. No Brasil, o ciclo urbano da Raiva é mantido pelo cão (Germano et al., 1990) e o ciclo silvestre é mantido por morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* (transmitindo a doença aos bovinos e ocasionalmente ao homem). No entanto, outras espécies de quirópteros são também passíveis de transmitir o agente (Germano, 1994).

A espécie que o *D. rotundus* utiliza como fonte de alimento preferencial é a bovina. Logo, esta transforma-se na principal vítima das infecções transmitidas por morcegos hematófagos. Estima-se que, no Brasil, aproximadamente, 30.000 bovinos morram anualmente a infecção causada pelo vírus rábico (da Silva et al., 2000).

As estratégias de controle da doença em bovinos incluem o controle das populações de morcegos hematófagos e a vacinação dos animais suscetíveis (Romijn et al., 2003). Para estes, diferentes tipos de vacinas vem sendo produzidas, incluindo as vacinas preparadas em tecido cerebral, ovos embrionados ou cultivos celulares (Meslin et al., 1996).

Mais recentemente, na busca por imunógenos mais eficazes e seguros, outros tipos de vacinas tem sido desenvolvidas (Sheppard, 1999). Uma destas opções são os imunógenos que utilizam vírus geneticamente modificados. Estas vacinas utilizam amostras virais como vetores para a expressão de uma ou mais proteínas heterólogas, contra a(s) qual(is) o sistema imune geraria uma resposta (Cavanagh, 1985; Taylor et al., 1991; Fujii et al., 1994). Tais vacinas apresentam como potencial vantagem sua segurança em relação às vacinas convencionais, sendo que, idealmente, devem induzir uma resposta imunológica significativa e função da multiplicação do vetor vacinal no hospedeiro (Sheppard, 1999).

Nos últimos anos, esta metodologia tem sido desenvolvida para a expressão de proteínas imunodominantes do vírus da Raiva (Wiktor et al., 1984; Fujii et al., 1994; Tims et al., 2000). O vírus da Raiva possui um genoma de RNA, fita simples, de polaridade negativa, o qual codifica cinco proteínas estruturais denominadas nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M2), glicoproteína (G) e polimerase (L; Tordo, 1996). As proteínas virais imunodominantes do vírus da Raiva

são as proteínas G e N (Koprowski, 1991). A proteína G forma as projeções espiculares no envelope viral e é a única capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (Wiktor et al., 1973) e estabelecer proteção total contra um desafio intracerebral (Perrin et al., 1985). A ribonucleoproteína viral (RNP) e a proteína N induzem proteção parcial contra um desafio periférico, sendo que não foi observada proteção quando o vírus de desafio foi injetado via intracerebral (Dietzschold et al., 1987).

A primeira vacina recombinante desenvolvida contra a Raiva é baseada em um vetor vaccinia sendo, atualmente, utilizada na Europa no controle da Raiva silvestre (Wiktor et al., 1984; Fujii et al., 1994). A imunização de coelhos e camundongos com esta vacina induziu a produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes e proteção contra um desafio por via intracerebral. Nos animais imunizados com o recombinante também houve a indução de uma resposta imune celular específica contra a glicoproteína do vírus rábico, com lise das células infectadas pelo vírus recombinante (Wiktor et al., 1984).

Além dos poxvírus, outros vetores virais tem sido utilizados para a produção de vacinas veterinárias, sendo os mais comuns os adenovírus (Wang et al., 1997; Tims et al., 2000), herpesvírus (Xuan et al., 1998; Schmitt et al., 1999) e retrovírus (Wei et al., 1981). Dentre estes, os herpesvírus bovinos, particularmente o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), apresenta vantagens para o desenvolvimento de vacinas para bovinos pois possui uma capacidade de inserção gênica de até 30 kilobases (kb). O seu uso induz não só uma resposta imune contra a(s) proteína(s) heteróloga(s), mas contra o próprio vetor, possibilitando o desenvolvimento de vacinas contra mais de um agente (Sheppard, 1999).

Na literatura, tem sido descrita a expressão de proteínas imunodominantes do vírus rábico a partir de vetores virais que replicam no citoplasma das células, como o próprio vírus rábico (Wiktor et al., 1984; Taylor et al., 1991; Fujii et al., 1994; Tims et al., 2000). Vários autores descrevem a dificuldade em expressar proteínas codificadas por vírus RNA (cujo ciclo de replicação ocorre no citoplasma celular) por vetores virais que replicam no núcleo das células (Shiu et al., 1997; Kühnle et al., 1998; Schmitt et al., 1999). Isto ocorre devido a presença de sinais de "splicing" na sequência primária do RNA, resultando em um mRNA que não é estável no núcleo das células infectadas e não induz a expressão da proteína viral (Sharp et al., 1997). Para resolver este problema, é sugerido que os nucleotídeos contendo sítios aceptores e doadores de "splicing" típicos sejam modificados. Portanto, tendo como objetivo a construção de um BHV-1

recombinante contendo o gene G do vírus rábico, foi produzido um gene G sintético, do qual foram removidos sítios potenciais de "splicing" do RNA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vírus e células de cultivo

A amostra de campo de BHV-1 SV265 (genotipo 1.2a; D'arce et al., 2002) foi utilizada como amostra parental na construção do mutante BHV-1/ Raiva G. Esta amostra foi isolada de um bovino com sinais de infecção respiratória durante um surto de rinotraqueíte bovina (IBR) em São Borja, Rio Grande do Sul, Brasil (Weiblen et al., resultados não publicados). O vírus foi propagado em células de rim bovino ("Madin-Darby bovine kidney", MDBK) ou em células de traquéia de embrião bovino ("Trachea embryonic bovine", EBTr). As células foram mantidas em meio mínimo essencial de Eagle suplementado com 2 % a 10 % de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina e uma solução de antibiótico (100 U penicilina, 100 µg de estreptomicina e 20 U de micostatina por ml).

2.2 Cepas bacterianas utilizadas

A cepa bacteriana utilizada nas clonagens realizadas foi a cepa de *Escherichia coli* Top 10, a qual apresenta as seguintes características: *hsdR*, *mcrA*, *lacZΔM15*, *endA1*, *recA1*, *supE44*, *relA1* (Invitrogen). O meio de cultivo utilizado foi o meio LB (Luria Bertani) suplementado com os antibióticos apropriados para cada vetor plasmideal utilizado.

2.3 Vetores plasmideais

Os plasmídeos utilizados e construídos neste estudo estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1. Plasmídeos utilizados neste trabalho

	Plasmídeo	Genotipo	Fonte/Referência
Comerciais	pUC19	Amp R	Sambrook, 1989
	pBR322	Amp R	Sambrook, 1989
	pCR2.1	Amp R, Kan R	Invitrogen
	PCRblunt	Kan R	Invitrogen
Recombinantes	pVR1012	Kan R, hCMVie-1	Hartikka et al., 1996
	p1	pCR2.1 + regiões 5'-3' gE BHV-1, Amp R	Franco et al., 2002a
	pVRraiva.gp	pVR1012 + gene G, Kan R	Este estudo
	pCRraiva.gp	pCRblunt + hCMVie-1 + gene G + BGH, Amp R	Este estudo
	pBR322/11	pBR322 + regiões 5'-3' gE BHV-1	Este estudo
	pBR11raiva.gp	pBR322/11 + hCMVie-1 + gene G	Este estudo

2.4 Extração de DNA

Células EBTr ou MDBK foram infectadas com BHV-1 a uma multiplicidade de infecção de 0,1 a 1. Aproximadamente 36 horas após a infecção, quando o efeito citopático (CPE) foi evidente em 90-100 % das células, o sobrenadante foi removido, clarificado a 5.000 x g durante 20 minutos e centrifugado sobre um colchão de sacarose a 25%, a 100.000 x g durante 2 horas a 4°C. O pellet viral foi ressuspensão em TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) e tratado com sódio dodecil sulfato (SDS) e proteinase K (concentrações finais a 1 % e 100 µg/µl, respectivamente) por uma hora a 37°C. O DNA viral foi extraído com fenol equilibrado, precipitado com etanol, ressuspendido em TE pH 7,4 e mantido a 4°C (Sambrook et al., 1989).

2.5 Gene G do vírus da Raiva sintético

O gene G do vírus da Raiva utilizado neste trabalho foi sintetizado quimicamente, por uma firma comercial (BaseClear Labservices, Holanda), tendo como

base a sequência do gene G de uma amostra do vírus rábico isolada de um morcego hematófago (acesso no GenBank AF325490).

2.6. Clonagem da glicoproteína do vírus da Raiva em vetores plasmídeos

Para a clonagem do gene G do vírus da Raiva foram utilizados vetores de expressão e de clonagem descritos na tabela 1. A metodologia de clonagem utilizada seguiu o protocolo descrito por Sambrook (1989).

2.7 Construção e isolamento do BHV-1/Raiva G

As co-transfecções foram realizadas através do método de fosfato de cálcio (Graham & van der Eb, 1973). O DNA do vírus parental SV265 (2 µg) foi co-transfectado, em células EBTr confluentes, preparadas em placas de cultivo com 6 poços, com 2 µg do fragmento de recombinação (contendo o gene G e as regiões flanqueadoras da gE do BHV-1), na presença de DNA carreador (16 µg de DNA de esperma de salmão). Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram congeladas e descongeladas para a liberação de vírions associados às células. Para o isolamento do vírus recombinante, sobrenadantes da reação de co-transfecção foram coletados e utilizados para infectar monocamadas de células EBTr pré-formadas em placas de cultivo com 96 poços. Após a visualização do efeito citopático (CPE) nas células EBTr, as placas foram fixadas com paraformaldeído a 4 % em solução salina tamponada (PBS; 8,5 g NaCl, 1,55 g Na₂HPO₄, 0,23 g NaH₂PO₄, q.s.p 1 litro, pH 7,2) e foi realizado o teste de imunoperoxidase (IPMA), como descrito por Kramps (1994), utilizando como anticorpo primário, anticorpos policlonais produzidos (em camundongos) contra o vírus da Raiva. Poços contendo placas virais coradas foram marcados e os sobrenadantes coletados e utilizados para infectar novas placas de cultivo com células EBTr.

Uma segunda estratégia para o isolamento do vírus recombinante foi a de coletar as placas virais diretamente da placa da co-transfecção, utilizando-as para infectar novas monocamadas de células EBTr. Após o aparecimento de ECP, os sobrenadantes foram coletados e sobre a monocamada foi realizado a técnica de IPMA.

2.8 Expressão transiente da proteína G do vírus da Raiva

A transfecção do vetor de expressão contendo o gene G (pVRraiva.gp) foi realizada em células EBTr utilizando 0,5µg do DNA plasmideal e 5µl de lipofectamina (Invitrogen). O protocolo de transfecção realizado seguiu as recomendações do fabricante do reagente (Invitrogen). Quarenta e oito horas após a transfecção, a placa de cultivo foi fixada, conforme descrito anteriormente, e foi realizado o teste de imunoperoxidase utilizando como anticorpos primários um soro policlonal preparado contra o vírus da Raiva.

3. RESULTADOS

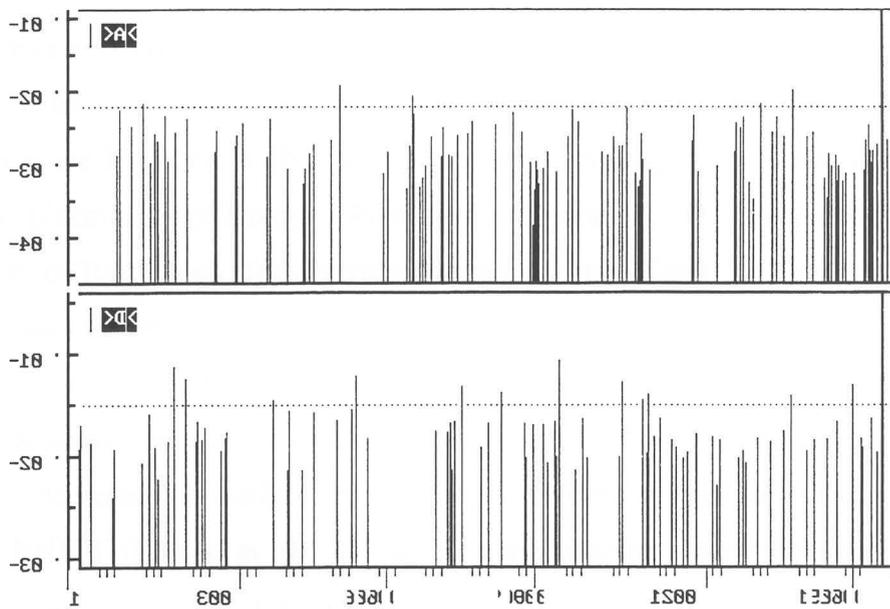
3.1 Gene sintético

O gene G do vírus da Raiva, sintetizado quimicamente, e clonado no vetor plasmideal pGem-T *easy* possui as seguintes alterações introduzidas na sua sequência: remoção de sítios de "splicing" do RNA comuns (Figura 1), introdução de uma sequência consenso Kozak em frente ao ATG (Kozak, 1987), mutação do aminoácido arginina (no resíduo 352) para glutamina e introdução de um sítio de clivagem para *StuI* em cada terminação. Com exceção da alteração induzida no aminoácido arginina, a sequência de aminoácidos resultante é ainda idêntica a amostra original.

3.2 Clonagem da glicoproteína do vírus da Raiva em vetores plasmideais

O plasmídeo pVRraiva.gp foi construído pela clonagem do gene G sintético (1,6 kb), no vetor de expressão eucariótico pVR1012 (Hartikka et al., 1996). Este vetor contém o promotor do citomegalovírus humano (hCMVie-1) seguido de uma região não traduzida (5'UT) do gene hCMVie-1, que inclui um intron. Logo após esta região 5'UT está o sítio de policlonagem seguido de uma região terminadora da transcrição do hormônio do crescimento bovino (BGH Term; Hartikka et al., 1996). O gene G foi

A



B

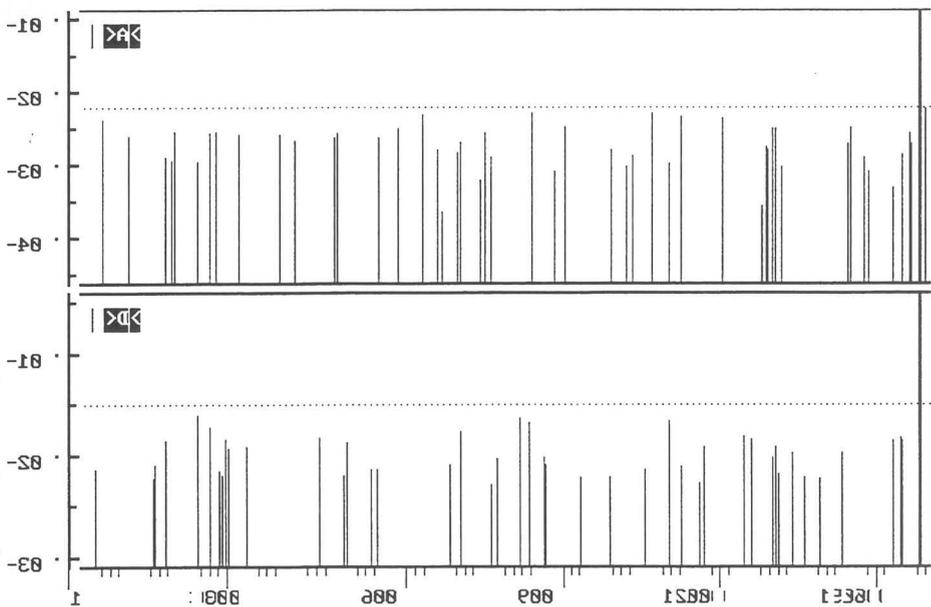


Figura 1. Representação gráfica da remoção dos sítios de *splicing* nas junções exon-intron do gene G do vírus da raiva através de síntese química. A: antes do tratamento; B: depois do tratamento.

clonado no sítio de restrição *EcoR* V do plasmídeo pVR1012 (Figura 2), sendo subsequente analisado, através de digestão com enzimas de restrição, para verificar a orientação do gene no mesmo. O plasmídeo pVRraiva.gp foi digerido com as enzimas *Mlu*N I e *Acc*65 I. O fragmento de 1,9 kb resultante, contendo o gene G do vírus da raiva e o promotor do hCMVie-1 (denominado de fragmento de expressão, prom-synG), teve as extremidades preenchidas utilizando-se o fragmento Klenow da DNA polimerase I (Roche) e dNTPs, para facilitar a clonagem deste fragmento (prom-synG) no plasmídeo pCRblunt (Invitrogen; Figura 2). O plasmídeo resultante, denominado pCR4raiva.gp, foi digerido com as enzimas *EcoR* I e *Sma* I sendo então adicionado ao fragmento gerado (prom-synG) adaptadores *Spe* I-*EcoR* I. O fragmento de expressão foi purificado através de eletroforese em gel de agarose (Sambrook et al., 1989) e subclonado no sítio de restrição *Spe* I do vetor de recombinação (pBR322/11; Figura 3). Este vetor, originado do plasmídeo p1, contém as regiões 5'-3' flanqueadoras da gE do BHV-1 (Franco et al., 2002a). O plasmídeo resultante foi denominado de pBR11raiva.gp (Figura 3). Os vetores produzidos foram propagados em bactérias competentes Top 10 (Invitrogen) e purificados através de lise alcalina (Sambrook et al., 1989). O DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose.

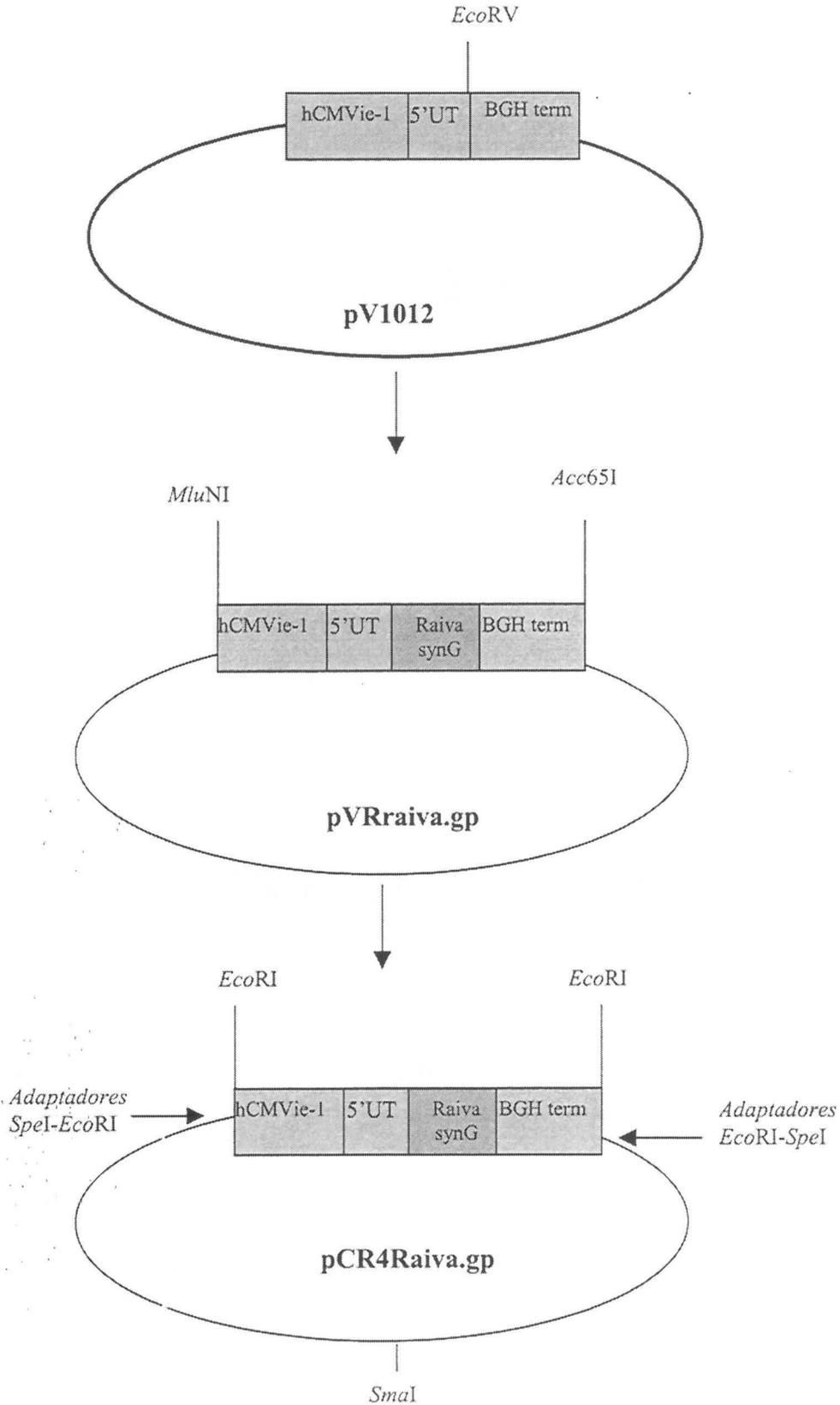


Figura 2. Clonagem do gene G do vírus da Raiva no vetor de expressão pVR1012 e no vetor pCRblunt. O vetor de expressão pVR1012 contém o promotor do citomegalovírus humano (hCMVie-1) seguido de uma região não traduzida (5'UT). A região codificadora é seguida por uma região terminadora da transcrição do hormônio do crescimento bovino (BGH Term). A sequência codificante da ORF da proteína G do vírus da Raiva foi clonada no sítio de policlonagem do plasmídeo, atrás desta região (5'UT) e é indicada pela caixa em vermelho (raiva synG).

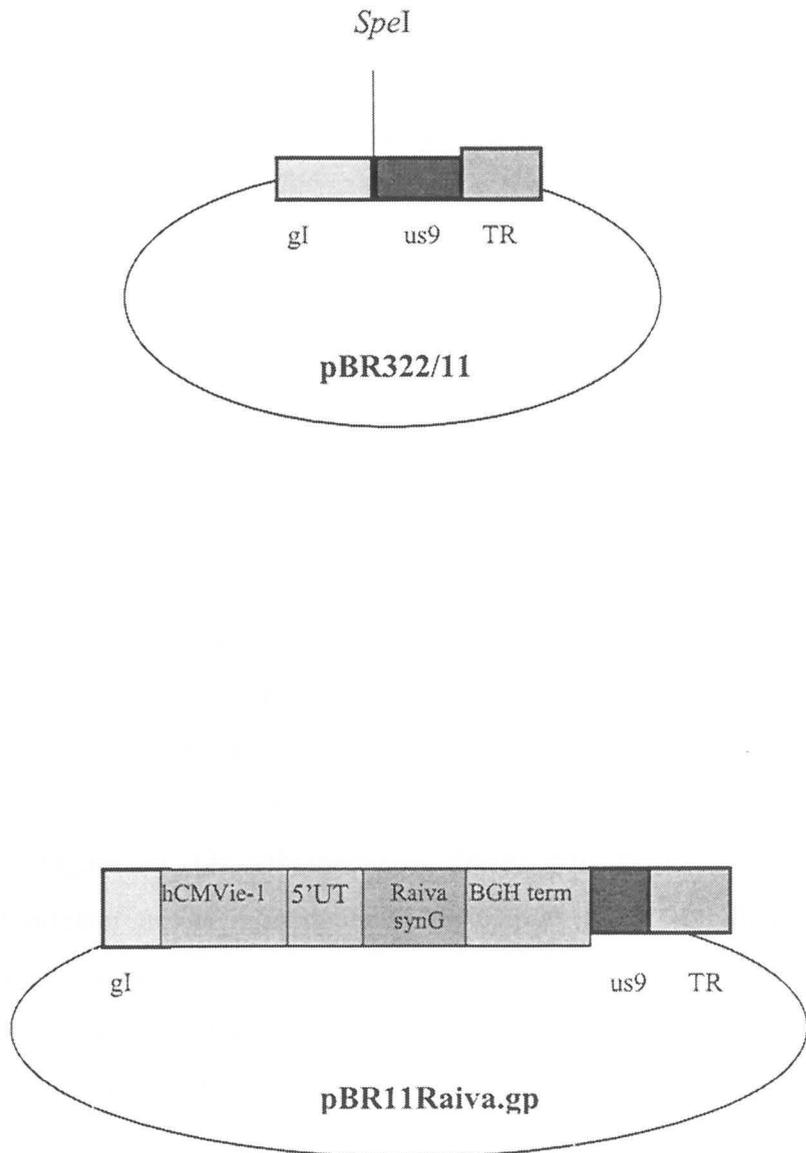


Figura 3. O plasmídeo pBR322/11 contém as regiões flanqueadoras da gE do BHV-1. O plasmídeo pBR11Raiva.gp foi originado a partir da clonagem do fragmento de expressão (contendo o promotor do CMV e o gene G do vírus da Raiva) no vetor de recombinação pBR322/11.

3.3 Expressão transiente da proteína G do vírus da Raiva

A expressão transiente do gene G sintético foi confirmada em células EBTr após a realização do teste de imunoperoxidase utilizando soro policlonal produzido, em camundongos, contra o vírus da Raiva (Figura 4).

3.4 Co-transfecção do DNA do vírus parental e fragmento de recombinação (5'gE-prom-synG-3'gE)

Foram obtidas aproximadamente 480 placas virais após a co-transfecção de células EBTr com o DNA viral parental e o fragmento de recombinação. A tentativa de isolar o vírus recombinante diretamente a partir das placas virais obtidas na co-transfecção e, utilizadas para infectar monocamadas de células EBTr em microplacas com 96 poços, não resultou no isolamento do vírus recombinante uma vez que, após realizada a técnica de imunoperoxidase, não foram visualizadas placas virais coradas, indicativo da expressão da proteína G.

Quando o sobrenadante da co-transfecção foi utilizado para infectar novas microplacas de cultivo de células com 96 poços foram detectados dois poços contendo placas virais coradas, indicando a presença do BHV-1 expressando a glicoproteína do vírus da raiva (Figura 5). Os sobrenadantes destes dois poços foram coletados e utilizados para infectar novas monocamadas de células EBTr. Infelizmente, não foi possível recuperar o vírus recombinante nesta segunda etapa de isolamento. No total, foram realizadas mais 5 tentativas de isolamento do vírus recombinante, as quais não resultaram no isolamento do mesmo.

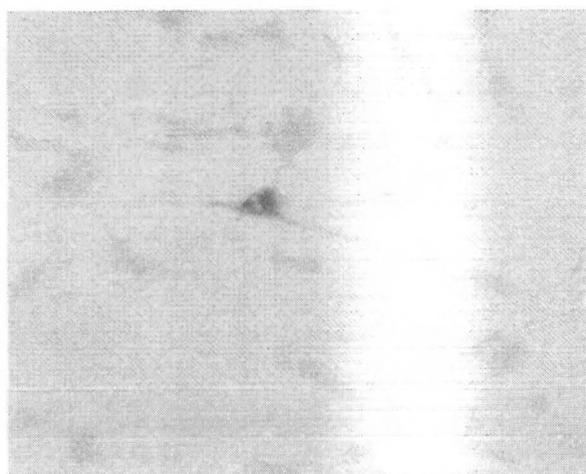
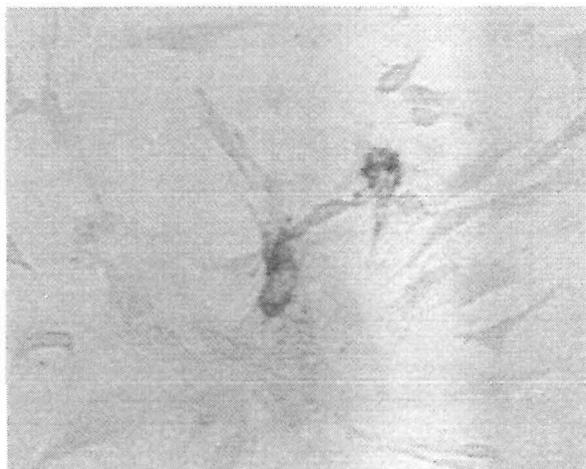


Figura 4. Expressão da glicoproteína do vírus da raiva, em células EBTr, após a transfecção das células com o DNA plasmideal (pVRaiva.gp) contendo o gene G do vírus da Raiva.

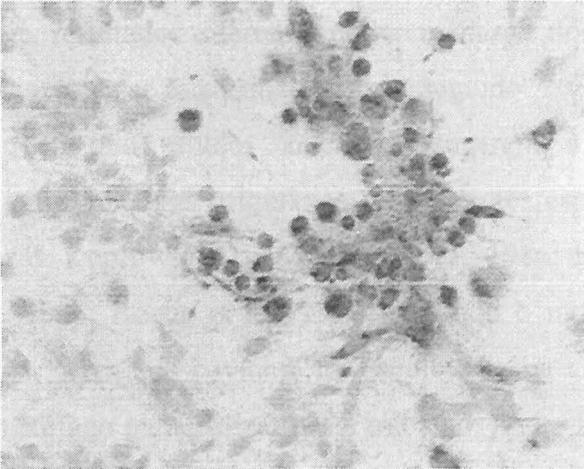
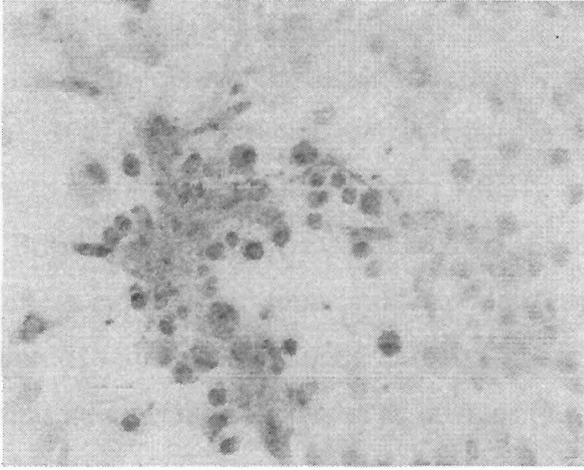


Figura 5. Expressão da glicoproteína do vírus da Raiva em células EBTR infectadas pelo recombinante BHV-1/ Raiva G.

4. DISCUSSÃO

A Raiva transmitida por morcegos é um importante problema econômico e de saúde pública pois, além dos prejuízos causados pela mortalidade de animais de produção, ainda existe o risco de contágio de humanos e outros animais domésticos (Schaefer et al., 2002). Em um estudo realizado por Hayashi et al. (1984), foi avaliado o grau de proteção conferido pela vacina contra a Raiva utilizada na vacinação de cães e humanos no Brasil (*suckling mouse brain vaccine*; SMB). Esta vacina, muito embora considerada eficaz em proteger animais de experimentação frente a um desafio com o vírus homólogo (CVS), foi considerada de baixa eficácia quando foram utilizadas no desafio amostras de vírus rábico isoladas de bovinos (Hayashi et al., 1984). Além disso, os experimentos para avaliação da potência da vacina contra a Raiva são usualmente realizadas em camundongos e, desta forma, não poderiam ser extrapoladas para outras espécies (Koprowski et al., 1985). Idealmente, os experimentos de proteção em animais deveriam ser realizados na mesma espécie para a qual a vacina se destina. Provavelmente, resultados diferentes poderiam surgir nos testes de proteção conferidos pela vacina antirábica se este princípio fosse seguido.

Uma vez que estudos anteriores sugerem a possibilidade de diferenças importantes entre amostras originárias de diferentes espécies (Fuenzalida & Palacios, 1955; Wiktor & Koprowski, 1978; Smith et al., 1986; Dietzschold et al., 1988; Loza-Rubio et al., 1996; Roehle et al., 1997), e sendo o morcego hematófago o principal transmissor da Raiva aos bovinos, foi escolhida uma amostra de vírus de origem de morcego hematófago para utilizar neste trabalho. Desta forma, foi utilizada uma versão sintética do gene que codifica a proteína imunodominante do vírus (G) visando a expressão da glicoproteína que seja representativa do vírus que infecta bovinos no Brasil. O gene G foi sintetizado quimicamente uma vez que diversos autores descrevem a dificuldade em expressar proteínas codificadas por vírus RNA que replicam no citoplasma das células (como o vírus da Raiva) a partir de vetores virais que replicam no núcleo (Shiu et al., 1997; Kühnle et al., 1998; Schmitt et al., 1999). Normalmente, o RNA e as proteínas de certos vírus (como o vírus da Raiva, BRSV, BVDV e CSFV) não entram no núcleo durante um ciclo de infecção natural. Todavia, quando um dado gene viral é independentemente expressado a partir de um vetor plasmideal ou viral (no caso o BHV-1), ele deve ser transcrito e clivado no núcleo como os genes celulares. Isto pode dar origem a um mRNA instável, sem condições de induzir a expressão da

proteína viral. Isto ocorre devido a presença de sequências no RNA viral reconhecidas como sítios doadores e receptores de "splicing" do RNA (Sharp et al., 1997). Com o objetivo de evitar essa possibilidade, os sítios potenciais de "splicing" foram removidos do cDNA. Segundo Shiu et al. (1997), comparações de sequências distintas do gene E2 do vírus da Peste Suína Clássica (CSFV) evidenciaram que os sinais de "splicing" potenciais são bem conservados. Kühnle et al. (1998) demonstraram que os transcritos contendo o ORF autêntico da proteína G do Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) foram instáveis no núcleo das células infectadas com um BHV-1 recombinante contendo o gene responsável pela mesma.

O BHV-1 foi escolhido como vetor para a expressão da proteína G do vírus da raiva devido ao tamanho do seu genoma, com muitos genes não essenciais, permitindo a incorporação de um ou mais genes heterólogos. Como local para a inserção do gene G no genoma do BHV-1 foi escolhido o locus do gene que codifica a glicoproteína E (gE) viral. A gE é codificada por um gene que se localiza na região única curta (U_S) do genoma do BHV-1 sendo flanqueada pelos genes gI e US9 (Rebordosa et al., 1994). A gE não é essencial para a replicação viral, mas análises de crescimento *in vitro* demonstraram a sua importância na disseminação viral célula a célula (Rebordosa et al., 1994; Franco, 2001). Trabalhos prévios descrevem que amostras de BHV-1 onde o gene gE foi deletado possuem virulência reduzida para bovinos e são imunogênicos (Kaashoek, et al., 1994; van Engelenburg et al., 1994, Franco et al., 2002b). Desta forma, é esperado que o vírus recombinante produzido seja atenuado para bovinos e também permita a diferenciação entre animais vacinados e infectados pelo BHV-1 "wild-type", não interferindo em possíveis estratégias de controle dessa infecção.

As dificuldades encontradas para o isolamento do vírus BHV-1 recombinante expressando a proteína G do vírus da raiva são em parte justificadas pela baixa frequência de recombinação homóloga (em torno de 1%) entre o vírus parental e o fragmento de recombinação (F.A.M. Rijsewijk, comunicação pessoal). Desta forma, dentre as aproximadamente 480 placas virais detectadas após a co-transfecção, esperava-se encontrar quatro clones do vírus recombinante. Amostras do recombinante BHV-1 gE negativo apresentam dificuldades de disseminação célula a célula, demonstradas pelo tamanho reduzido das placas virais nos cultivos celulares quando comparado a amostras do vírus parental (Franco, 2001). Este fato ocasiona que o vírus parental dissemine-se no cultivo celular mais rapidamente que os recombinantes, dificultando o isolamento deste último à medida em que o tempo de cultivo progride.

Uma forma de minimizar este problema seria utilizar nas co-transfecções DNA de uma amostra de BHV-1 gE negativa. Desta forma, após a co-transfecção todos os clones obtidos, recombinantes e não recombinantes, apresentariam uma igual capacidade de disseminação no cultivo celular. Esta abordagem pode vir a ser utilizada no futuro usando amostras de BHV-1 já deletadas no gene gE (Franco et al., 2002a). Uma outra possibilidade de otimização da recombinação homóloga seria a utilização de sítios de restrição enzimática naturalmente existentes em amostras de BHV-1 (Mahony et al., 2003). Nestas, um sítio de restrição enzimática único para a enzima *Psp1406I* localizado na região intergênica entre os genes gG e gD poderia ser utilizado com local para inserção da glicoproteína do vírus da Raiva (Mahony et al., 2003).

AGRADECIMENTOS

Ao Franz Daus e Sylvia Verschuren do ID-Lelystad (Lelystad, Holanda); e ao Dr. Rudi Weiblen da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil pela disponibilização da amostra de BHV-1 SV265.

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, PRONEX, CAPES & FAPERGS.

REFERÊNCIAS

CAVANAGH, D. Viral and bacterial vectors of immunogens. **Vaccine**, v. 3, p. 45-48. 1985.

D'ARCE, R.C., ALMEIDA, R.S., SILVA, T.C., FRANCO, A.C., SPILKI, F., ROEHE, P.M., ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 315-324. 2002.

DIETZSCHOLD, B. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 84, p. 9165-9169. 1987.

DIETZSCHOLD, B., RUPPRECHT, C.E., TOLLIS, M., LAFON, M., MATTEI, J., WIKTOR, T.J., KOPROWSKI, H. Antigenic diversity of glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: Implications for epidemiology and control of rabies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, p. S785-S798. 1988.

FRANCO, A.C. **Recombinantes de herpesvírus bovino tipo 1 com deleções nos genes gE e us9**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 178p. 2001.

FRANCO, A.C., RIJSEWIJK, F.A.M., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., ROEHE, P.M. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 274-278. 2002a.

FRANCO A.C, SPILKI, F.R., ESTEVES, P.A., LIMA, M., WEIBLEN, R., FLORES, E.F., RIJSEWIJK, F.A.M., ROEHE, P.M. A Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2 a (BHV-1.2 a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 135-140. 2002b.

FUENZALIDA, E., PALACIOS, R. Un metodo para la preparation de la vacuna antirabica. **Boletin Instituto Bacteriologico Chile**, v. 8, p. 3-10. 1955.

FUJII, H., TAKITA-SONODA, Y., MIFUNE, K., HIRAI, K., NISHIZONO, A., MANNEN, K. Protective efficacy in mice of post-exposure vaccination with vaccinia virus recombinant expressing either rabies virus glycoprotein or nucleoprotein. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1339-1344. 1994.

GERMANO, P.M.L., SILVA, E.V., SILVA, E.V., MIGUEL, O., SUREAU, P. Variantes antigénicas del virus de la rabia aisladas en el Nordeste y Sudeste del Brasil. Estudio preliminar. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 108, p. 39-45. 1990.

GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 86-91. 1994.

GRAHAM, F.L., VAN DER EB, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, v. 52, p. 456-467. 1973.

HARTIKKA, J., SAWDEY, M., CORNEFERT-JENSEN, F., MARGALITH, M., BARNHART, K., NOLASCO, M., VAHLSING, H.L., MEEK, J., MARQUET, M., HOBART, P., NORMAN, J., MANTHORPE, M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. **Human Gene Therapy**, v. 7, p. 1205-1217. 1996.

HAYASHI, Y, MORA, E., CHANDELIER, E.L., MONTANO, J.A., OHI, M. Estudos de proteção cruzada de 24 cepas de vírus rábico isoladas de diferentes espécimes animais no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 27, p. 27-35. 1984.

KAASHOEK, M., MOERMANN, A., MADIC, J., RIJSEWIJK, F.A.M., QUAK, J., GIELKENS, A.L.J., VAN OIRSCHOT, J.T. A conventionally attenuated glycoprotein E negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. **Vaccine**, v. 12, p. 439-444. 1994.

KOPROWSKI, H., WIKTOR, T.J., ABELSETH, M.K. Cross reactivity and cross protection: rabies variants and rabies viruses. In: KUWERT, E., MERIEUX, C., KOPROWSKI, H., BOGEL, K, eds. **Rabies in the tropics**. Berlin: Springer-Verlag: p. 30-39. 1985.

KOPROWSKI, H. Overview. In: Baer, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press, p. 27-29. 1991.

KOZAK, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. **Journal of Molecular Biology**, v. 198, p. 947-950. 1987.

KRAMPS, J.A., MAGDALENA, J., QUAK, J., WEERDMEESTER, K., KAASHOEK, M.J., MARIS-VELDHUIS, M.A., RIJSEWIJK, F.A.M., KEIL, G., VAN OIRSCHOT, J.T. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2175-2181. 1994.

KUHNLE, G., HEINZE, A., SCHMITT, J., GIESOW, K., TAYLOR, G., MORRISON, I., RIJSEWIJK, F.A.M., VAN OIRSCHOT, J.T., KEIL, G.M. The class II membrane glycoprotein G of bovine respiratory syncytial virus, expressed from a synthetic open reading frame, is incorporated into virions of recombinant bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3804-3811. 1998.

LOZA-RUBIO, E., VARGAS, R., HERNANDEZ, E., BATALLA, D., AGUILLAR, A. Investigation of virus rabies strains in Mexico with a panel of monoclonal antibodies

used to classify lyssavirus. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 30 p. 31-35. 1996.

MAHONY, T.J., MCCARTHY, F.M., GRAVEL, J.L., YOUNG, P.L. Rapid and efficient construction of recombinant bovine herpesvirus 1 genomes. **Journal of Virological Methods**, v. 107, p. 269-274. 2003.

MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H.,(eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 223-233. 1996.

PERRIN, P., THIBODEAU, L., SUREAU, P. Rabies immunosomes (sub-unit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection experiments. **Vaccine**, v. 3, p. 325-332. 1985.

REBORDOSA, X., PIÑOL, J., PÉREZ-PONS, J.A., LLOBERAS, J., NAVAL, J., QUEROL, E. Mapping, cloning and sequencing of a glycoprotein-encoding gene from bovine herpesvirus type 1 homologous to the gE gene from HSV-1. **Gene**, v. 149, p. 203-209. 1994.

ROEHE, P.M., PANTOJA, L.D., SCHAEFER, R., NARDI, N.B., KING, A.A. Analysis of brazilian rabies virus isolates with monoclonal antibodies to lyssavirus antigens. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 288-292. 1997.

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

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 1989.

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

SHARP, P.A., BURGE, C.B. Classification of introns: U2-type or U12-type. **Cell**, v. 91, p. 875-879. 1997.

SCHMITT, J., BECHER, P., THIEL, H-J., KEIL, G.M. Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2839-2848. 1999.

SHEPPARD, M. Viral vectors for veterinary vaccines. **Advances in Veterinary Medicine**, v. 41, p. 145-161. 1999.

SHIU, J.S., LIU, S.T., CHANG, T.J., HO, W.C., LAI, S.S., CHANG, Y.S. The presence of RNA splicing sites in the cDNA construct of the E2 gene of classical swine fever virus affected its expression. **Journal of Virological Methods**, v. 69, p. 223-230. 1997.

DA SILVA, A.C.R., CAPORALE, G.M.M., GONÇALVES, C.A., TARGUETA, M.C., COMIN, F., ZANETTI, C.R., KOTAIT, I. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 95-98. 2000.

SMITH, J.S., REID-SANDEN, F.L., ROUMILLAT, L.F., TRIMARCHI, C., CLARK, K., BAER, G., WINKLER, W.G. Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 573-580. 1986.

TAYLOR, J., TRIMARCHI, C., WEINBERG, R., LANGUET, B., GUILLEMIN, F., DESMETTRE, P., PAOLETTI, E. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. **Vaccine**, v. 9, p. 190-193. 1991.

TIMS, T., BRIGGS, D., DAVIS, R.D., MOORE, S.M., XIANG, Z., ERTL, H.C.J., FU, Z.F. Adult dogs receiving a rabies booster dose with a recombinant adenovirus expressing rabies virus glycoprotein develop high titers of neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 18, p. 2804-2807. 2000.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 28-51. 1996.

VAN ENGELENBURG, F.A.C., KAASHOEK, M.J., RIJSEWIJK, F.A.M., VAN DEN BURG, L., MOERMAN, A., GIELKENS, A.L.J., VAN OIRSCHOT, J.T. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 2311-2318. 1994.

WANG, Y.; XIANG, Z.; PASQUINI, S.; ERTL.; H.C. The use of na E1-deleted, replication-defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein for early vaccination of mice against rabies. **Journal of Virology**, v. 71, p. 3677-3683. 1997.

WEI, C-M.; GIBSON, M.; SPEAR, P.G.; SCOLNICK, E.M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 39, p. 935-944. 1981.

WIKTOR, T.J., GYÖRGY, E., SCHLUMBERGER, D., SOKOL, F., KOPROWSKI, H. Antigenic properties of rabies virus components. **Journal of Immunology**, v. 110, p. 269-276. 1973.

WIKTOR, T.J., KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: Detection of antigenic variants. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v. 75, p. 3938-3942. 1978.

WIKTOR, T.J., MAC FARLAN, R.I., REAGAN, K.J., DIETZSCHOLD, B., CURTIS, P.J., WUNNER, W.H., KIENY, M.O., LATHE, R., LECOCQ, J.P., MACKETT, M., MOSS, B., KOPROWSKI, H. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 81, p. 194-198. 1984.

XUAN, X.; TUCHIYA, K.; SATO, I.; NISHIKAWA, Y.; ONODERAZ, Y.; TAKASHIMA, Y.; YAMAMOTO, A.; KATSUMATA, A.; IWATA, A.; UEDA, S.; MIKAMI, T.; OTSUKA, H. Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector. **Vaccine**, v. 16, p. 969-976. 1998.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL

Estudos sobre as propriedades antigênicas e genômicas de amostras Brasileiras do vírus da Raiva

Há muitos anos as eventuais dificuldades encontradas no combate à Raiva vem sendo motivo de preocupação dos pesquisadores envolvidos com o tema. A suspeita de que imunógenos preparados com a amostra padrão do vírus ("*Challenge Virus Standard*", CVS ou "*Evelyn-Rokitnicki-Abelseth*", ERA) não protegeria os animais imunizados contra a infecção causada por diferentes amostras do vírus começou a ser investigada. Fuenzalida e Palácios, em 1955, já mencionavam a importância de incluir amostras de origem de morcegos nas vacinas. Mais recentemente, Hayashi (1984) demonstrou diferenças nos níveis de proteção conferidos pela vacina contra a Raiva devido as diferenças antigênicas existentes entre amostras isoladas em animais silvestres e a amostra utilizada na vacina. Em vista disto, diversos estudos foram realizados buscando a identificação de variantes do vírus da Raiva e sua associação com as espécies animais suscetíveis (Smith et al., 1991; Loza-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997 Ito et al., 2001).

Neste estudo, foi possível associar diferentes perfis antigênicos e genômicos de variantes do vírus as duas principais espécies reservatórias do mesmo no Brasil, morcegos hematófagos e cães. A análise antigênica das amostras com Mabs demonstrou que todas pertencem ao genotipo 1 do gênero *Lyssavirus*, diferente da situação encontrada em outros países onde circulam outros genotipos do vírus (Bourhy et al.,

1993a; Amengual et al., 1997; Gold et al., 1998). Os resultados encontrados com a caracterização antigênica das amostras foram confirmados pela análise do genoma viral (RT-PCR/REA), a qual apresentou como vantagem a rapidez da caracterização das amostras e também permitindo o isolamento de RNA viral a partir de amostras em estado avançado de decomposição (David et al., 2002).

A utilidade da RT-PCR/REA pôde ser comprovada na prática ao longo dos estudos aqui realizados quando foi possível determinar, em menos de 24 horas, a origem de infecção de um felino (Schaefer et al., 2002), oriundo de uma região onde casos de raiva urbana não haviam sido identificados desde 1990 (Caldas & Anjos, 1997). Naquela ocasião, foi possível constatar que a amostra de vírus em questão correspondia a uma variante de origem de morcegos (Schaefer et al., 2002). Portanto, a área permanecia livre de raiva urbana, permitindo que as medidas de controle fossem dirigidas ao combate a morcegos. Mais tarde, através da análise das seqüências de uma região do gene N dessa amostra, foi possível identificá-la como uma variante de morcego não hematófago (capítulo 2).

Por outro lado, a existência de variantes com sinais de adaptação a diferentes espécies inevitavelmente leva a especulações a respeito das fontes de origem do vírus. Até recentemente, supunha-se que a Raiva em morcegos não hematófagos fosse resultado de eventuais contatos com morcegos hematófagos. Nos estudos aqui desenvolvidos, embora alguns casos indicativos de contato entre morcegos hematófagos e não hematófagos tenha ocorrido (ver capítulo 2), foi possível detectar a ocorrência de variantes, aparentemente adaptativas a morcegos não hematófagos. Estas variantes, detectadas por alterações conservadas no gene N, sugerem a ocorrência de um ciclo biológico próprio em espécies não hematófagas, sugerindo a ocorrência de co-evolução do vírus nas mesmas. A ocorrência de espécies não hematófagas infectadas representa sérios riscos para a saúde pública, principalmente em vista de que os mesmos podem coabitar áreas urbanas, como recentemente identificado (Favi et al., 1991; Schaefer et al., 2002).

Por conseguinte, sobre esta etapa dos estudos aqui realizados foi possível concluir que o vírus rábico apresenta variantes com alterações adaptativas a seus hospedeiros de origem. Tais variantes são conservadas para cada espécie animal em particular, podendo ser utilizadas como "marcadores epidemiológicos". Logo, estas modificações não parecem ser alteradas após uma ou duas passagens em espécies não reservatórias habituais do vírus, ou hospedeiros finais ("dead-end hosts") permitindo,

desta forma, a identificação da espécie de origem da variante. Isto pode ser exemplificado pelas amostras isoladas de bovinos, as quais retêm as características de amostras de morcego hematófago, mesmo quando submetidas a nova passagem em camundongos. Por outro lado, as alterações antigênicas e genômicas detectadas nas amostras estudadas não apresentaram associação com a distribuição geográfica dos isolados, o que sugere que a evolução do vírus é dirigida à adaptação ao hospedeiro e não à região geográfica.

Construção de um herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1) recombinante contendo o gene que codifica a glicoproteína (G) do vírus da Raiva

A segunda parte deste estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um vírus recombinante, expressando a glicoproteína (G) do vírus da Raiva e com potencial para ser utilizado na vacinação de bovinos. Foi escolhido um vetor viral para a expressão da proteína G devido ao fato de que a estrutura tri-dimensional da G é importante para que ocorra a indução de anticorpos neutralizantes (Perrin et al., 1988). Quando a G é purificada, e utilizada na imunização de animais de experimentação, ocorre a formação de agregados que induzem uma resposta de anticorpos neutralizantes menor, indicando que a G necessita estar ancorada em uma membrana para seu processamento adequado pelo sistema imune (Perrin et al., 1988). O BHV-1 foi escolhido para ser utilizado como vetor por ser um patógeno importante para a espécie bovina (Gibbs & Rweyemamu, 1977). Optou-se por utilizar uma amostra de BHV-1 do genotipo 1.2a, já que este tipo de vírus pode ser associado tanto a manifestações respiratórias como reprodutivas (Franco, 2001), sendo representativo das amostras que circulam no sul do Brasil (Souza et al., 2002). Como local para inserção do gene G do vírus rábico no genoma do BHV-1 foi escolhido o locus do gene que codifica a gE, uma vez que amostras de BHV-1 gE negativas são atenuadas e eficazes na imunização de bovinos contra infecções pelo BHV-1 (Kaashoek et al., 1994; van Engelenburg et al., 1994; Franco et al., 2002b). Além disso, tal amostra permite a diferenciação entre animais vacinados e infectados pelo BHV-1 selvagem, não interferindo em possíveis estratégias de controle dessa infecção (Kaashoek et al., 1994; van Engelenburg et al., 1994; Franco et al., 2002b).

Outro aspecto importante para a expressão da proteína G pelo vetor BHV-1 foi o de utilizar um gene G sintético, ao invés de utilizar um gene autêntico. Esta estratégia foi utilizada em função da possível dificuldade em expressar proteínas codificadas por

vírus RNA pelo recombinante (Kühnle et al., 1998; Schmitt et al., 1999). Desta forma, com esta abordagem, foi possível observar a expressão da proteína G do vírus da raiva a partir da transfecção de células EBTr com DNA plasmideal, contendo este gene e também a partir da co-transfecção de células EBTr com o DNA parental (BHV-1) e com o fragmento de recombinação contendo o gene G desenvolvido neste estudo.

Contudo, a maior dificuldade encontrada foi justamente o isolamento do vírus recombinante produzido. Uma das hipóteses levantadas para explicar esta dificuldade foi a baixa eficiência na produção de recombinantes através de recombinação homóloga (em torno de 1%), tornando difícil o isolamento do vírus recombinante nos cultivos celulares na presença de uma maioria de vírus não recombinantes. A outra hipótese levantada seriam as diferenças na eficiência de disseminação celular entre o vírus parental e o recombinante. Como demonstrado previamente (Franco, 2001), o vírus parental dissemina-se mais eficientemente do que os vírus recombinantes (BHV-1 gE negativos), dificultando o isolamento deste último à medida em que o tempo de cultivo progride. Foram levantadas algumas alternativas para contornar esta dificuldade, como por exemplo, a utilização de uma amostra de BHV-1 gE negativa como vírus parental nas co-transfecções. Desta forma, após a co-transfecção, todos os clones obtidos recombinantes e não recombinantes apresentariam uma igual capacidade de disseminação no cultivo celular. Uma outra possibilidade de otimização da recombinação homóloga seria a utilização de sítios de restrição enzimática naturalmente existentes em amostras de BHV-1 (Mahony et al., 2003) como local para inserção da glicoproteína do vírus da raiva.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A H.; POBER, J.S. Immunity to microbes. In: **Cellular and molecular immunology**, WB Saunders Company, cap. 15, p. 302-316. 1991.
- ABELSETH, M.K. Propagation of rabies virus in pig kidney cell culture. **Canadian Veterinary Journal**, v. 5, p. 84-87. 1964.
- AMENGUAL, B.; WHITBY, J.E.; KING, A; COBO, J.S.; BOURHY, H. Evolution of european bat lyssavirus. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2319-2328. 1997.
- BAER, G.M. Bovine paralytic rabies and rabies in vampire bat. In: BAER, G.M. **The Natural History of Rabies**. New York, Academic Press: p. 155-175. 1975.
- BAER, G.M.; LENTZ, T.L. Rabies pathogenesis to the central nervous system. In: BAER, G.M. **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press: p. 105-120. 1991.
- BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in *Lyssavirus* history from chiroptera to the carnivora orders. **Journal of Virology**, v. 75, p. 8096-8104. 2001.
- BOSCH, J.C.; DE JONG, M.C.; FRANKEN, P.; FRANKENA, K.; HAGE, J.J.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; NOORDHUIZEN, J.P.; VAN DER POEL, W.H.; VERHOEFF, J.; WEERDMEESTER, K.; ZIMMER, G.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gDsubunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. **Vaccine**, v. 16, p. 265-271. 1998.
- BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Taxonomy and evolutionary studies on lyssaviruses with special reference to Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 277-282. 1993a.
- BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity of the lyssavirus genus. **Virology**, v. 194, p. 70-81. 1993b.
- BROCHIER, B.; THOMAS, I.; BAUDUIN, B.; LEVEAU, T.; PASTORET, P.P.; LANGUET, B.; CHAPPUIS, G.; DESMETTRE, P.; BLANCOU, J.; ARTOIS, M. Use of vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. **Vaccine**, v. 8, p. 101-104. 1990.
- BROUGHAN, J.H.; WUNNER, W.H. Characterization of protein involvement in rabies binding to BHK-21 cells. **Archives of Virology**, v. 140, p. 75-93. 1995.
- CALDAS, E & ANJOS, C.B. Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva. **Norma Técnica e Operacional**. Secretaria da Saúde. RS, Brasil: p. 5-40. 1997.

CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N.; ZELLER, H.; DIGOUTTE, J.P.; TESH, R.B.; SHOPE, R.E.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; ST GEORGE, T.D. Antigenic relationships among rhabdoviruses from vertebrates and hematophagous arthropods. **Intervirology**, v. 30, p. 241-257. 1989.

CAVANAGH, D. Viral and bacterial vectors of immunogens. **Vaccine**, v. 3, p. 45-48. 1985.

CELIS, E.; MILLER, R.; WIKTOR, T.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Isolation and characterization of human Tcell lines and clones reactive to rabies virus: antigen specificity and production of interferon gamma. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 692-697. 1986.

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

CRICK, J.; BROWN, F. Viral subunits for rabies vaccination. **Nature**, v. 222, p. 92. 1969.

DAVID, D., YAKOBSON, B., ROTENBERG, D., DVERES, N., DAVIDSON, I., STRAM, Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 111-118. 2002.

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

DE JONG, M.C.M.; KIMMAN, T.G. Experimental quantification of vaccine-induced reduction in virus transmission. **Vaccine**, v. 12, p. 761-766. 1994.

DELPIETRO, H.A.; GURY-DHOMEN, F.; LARGHI, O.P.; MENA-SEGURA, C.; ABRAMO, L. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. **Journal of Veterinary Medicine**, v. B44, p. 477-483. 1997.

DÍAZ, A.M. Suckling-mouse brain vaccine. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 243-250. 1996.

DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W.H.; WIKTOR, T.J.; LOPES, D.; LAFON, M.; SMITH, C.L.; KOPROWSKI, H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 80, p. 70-74. 1983.

DIETZSCHOLD, B. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. **Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 9165-9169. 1987a.

DIETZSCHOLD, B.; LAFON, M.; WANG, H.; OTVOS, L.; CELLIS, E.; WUNNER, W.H.; KOPROWSKI, H. Localization and immunological characterization of antigenic domains of rabies virus internal N and NS proteins. **Virus Research**, v. 8, p. 103-125. 1987b.

DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C.E.; TOLLIS, M.; LAFON, M.; MATTEI, J.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Antigenic diversity of glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: Implications for epidemiology and control of rabies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, p. S785-S798. 1988.

DIETZSCHOLD, B.; ERTL, H.C.J. New developments in the pre- and post-exposure treatment of rabies. **Critical Reviews in Immunology**, v. 10, p. 427-439. 1991.

DRINGS, A.; JALLET, C.; CHAMBERT, B.; TORDO, N.; PERRIN, P. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? **Vaccine**, v. 17, p. 1549-1557. 1999.

ETESSAMI, R.; CONZELMANN, K.K.; FADAI-GHOTBI, B.; NATELSON, B.; TSIANG, H.; CECCALDI, P-E. Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2147-2153. 2000.

FAVI, C.M., DURAN, J.C. Epidemiología de la rabia en Chile (1929-1988) y perspectivas en mamíferos silvestres. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v. 6, p. 13-21. 1991.

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

FLAMAND, A.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. II. The glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 48, p. 105-109. 1980b.

FLORES, E.F.; OSORIO, F.A.; ZANELLA, E.L.; KIT, S.; KIT, M. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of 90 vaccinated from naturally infected animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 534-540. 1993.

FRANCO, A.C. **Recombinantes de herpesvírus bovino tipo 1 com deleções nos genes gE e us9**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 178p. 2001.

FRANCO, A.C., RIJSEWIJK, F.A.M., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., ROEHE, P.M. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 274 - 278. 2002a.

FRANCO A.C; SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; LIMA, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. A Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2 a (BHV-1.2 a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 135-140. 2002b.

FRASER, G.C.; HOOPER, T.P.; LUNT, R.A.; GOULD, A.R.; GLEESON, L.J.; HYATT, A.D.; RUSSELL, G.M.; KATTENBELT, J.A. Encephalitis caused by a lyssavirus in fruit bats in Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, p. 327-331. 1996.

FUENZALIDA, E.; PALACIOS, R. Un metodo para la preparation de la vacuna antirabica. **Boletin Instituto Bacteriologico Chile**, v. 8, p. 3-10. 1955.

FUJII, H.; TAKITA-SONODA, Y.; MIFUNE, K.; HIRAI, K.; NISHIZONO, A.; MANNEN, K. Protective efficacy in mice of post-exposure vaccination with vaccinia virus recombinant expressing either rabies virus glycoprotein or nucleoprotein. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1339-1344. 1994.

FU, Z.F.; DIETZSCHOLD, B.; SCHUMACHER, C.L.; WUNNER, W.H.; ERTL, H.; KOPROWSKI, H. Rabies virus nucleoprotein expressed and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences, USA**, v. 88, p. 2001-2005. 1991.

GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 86-91. 1994.

GIBBS, E.P.J.; RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses. Part I. **Veterinary Bulletin**, v. 47, p. 317-343. 1977.

GLÜCK, R. Purified duck-embryo vaccine for humans. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H.,(eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 253-259. 1996.

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

HAYASHI, Y; MORA, E.; CHANDELIER, E.L.; MONTANO, J.A.; OHI, M. Estudos de proteção cruzada de 24 cepas de vírus rábico isoladas de diferentes espécimes animais no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 27, p. 27-35. 1984.

HOOPER, D.C.; MORIMOTO, K.; BETTE, M.; WEIHE, E.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3711-3719. 1998.

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

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

KAASHOEK, M.; MOERMANN, A.; MADIC, J.; RIJSEWIJK, F.A.M.; QUAK, J.; GIELKENS, A.L.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. A conventionally attenuated glycoprotein E negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. **Vaccine**, v. 12, p. 439-444. 1994.

KAASHOEK, M.; MOERMANN, A.; MADIC, J.; WEERDMEESTER, K.; MARISVELDHUIS, M.A.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. **Vaccine**, v. 13, p. 342-346. 1995.

KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.; RUULS, R.C.; KEIL, G.M.; THIRY, E.; PASTORET, P.P.; VAN OIRSCHOT, J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**, v. 16, p. 802-809. 1998.

KIMMAN, T.G. Comparative efficacy of three doses of the genetically engineered Aujeszky's disease virus vaccine strain 783 in pigs with maternal antibodies. **Vaccine**, v. 10, p. 363-365. 1992.

KING, A.A.; CRICK, J. Rabies-related viruses. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. (Eds.). **Rabies**. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers: p. 177-199. 1988.

KING, A.A. **Studies of the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies**. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias)-University of Surrey, Guilford, U.K., 254 p. 1991.

KING, A.A.; TURNER, G.S. Rabies. A review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, p. 1-39. 1993.

KING, A.A.; MEREDITH, C.D.; THOMPSON, G.R. The biology of southern African lyssavirus variants. In: C.E. RUPPRECHT, B. DIETZSCHOLD, H. KOPROWSKI (ed), **Lyssaviruses**. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 267-295. 1994.

KISSLING, R.E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 98, p. 223-225. 1958.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H.,(eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 80-86. 1996.

KUBES, V.; GALLIA, F. Estudios inmunologicos sobre la pluralidad de los virus rábicos en Venezuela. **Bol. Inst. Invest. Vet. Caracas**, v. 1, p. 3-45. 1942.

KUHNLE, G.; HEINZE, A.; SCHMITT, J.; GIESOW, K.; TAYLOR, G.; MORRISON, I.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T.; KEIL, G.M. The class II membrane glycoprotein G of bovine respiratory syncytial virus, expressed from a synthetic open reading frame, is incorporated into virions of recombinant bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3804-3811. 1998.

KUNDIG, T.M.; KALBERER, C.P.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. Vaccination with two different vaccinia recombinant viruses: long-term inhibition of secondary vaccination. **Vaccine**, v. 11, p. 1154-1158. 1993.

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

LODMELL, D.; SUMNER, J.W.; ESPOSITO, J.J.; BELLINI, W.J.; EWALT, L.C. Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus infection. **Journal of Virology**, v. 65, p. 3400-3405. 1991.

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

MAHONY, T.J., MCCARTHY, F.M., GRAVEL, J.L., YOUNG, P.L. Rapid and efficient construction of recombinant bovine herpesvirus 1 genomes. **Journal of Virological Methods**, v. 107, p. 269-274. 2003.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. A gE-negative BHV1 vaccine virus strain cannot perpetuate in cattle populations. **Vaccine**, v. 18, p. 2120-2124. 2000.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.M.; FRANKEN, P.; VAN OIRSCHOT, J.T. Efficacy of a live gE-negative BHV1 vaccine in cattle in the field. **Vaccine**, v. 19, p. 1924-1930. 2001.

MEBATION, T.; WEILAND, F.; CONZELMANN, K.K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and



interacts with the transmembrane spike glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 242-250. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, **Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle**. Brasília, Fundação Nacional de Saúde. 1998.

MONTAGNON, B.; FANGET, B. Purified Vero cell vaccine for humans. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H.,(eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 285-289. 1996.

NICHOLSON, K.G. Cell-culture vaccines for human use: general considerations. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H.,(eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: p. 271-279. 1996.

PERRIN, P.; THIBODEAU, L.; SUREAU, P. Rabies immunosomes (sub-unit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection experiments. **Vaccine**, v. 3, p. 325-332. 1985.

PERRIN, P.; JOFFRET, M.L.; OTH, D.; LECLERC, C.; SUREAU, P.; THIBODEAU, L. Interleukin-2 production in vitro: a new approach to the study of rabies vaccine immunogenicity as appraised by testing different glycoprotein presentations. **Vaccine**, v. 6, p. 331-338. 1988.

RODRIGUES DA SILVA, A .C.; CAPORALE, G.M.M.; GONÇALVES, C.A; TARGUETA, M.C.; COMIN, F.; ZANETTI, C.R.; KOTAIT, I. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 95-98. 2000.

ROEHE, P.M.; PANTOJA, L.D.; SCHAEFER, R.; NARDI, N.B.; KING, A.A. Analysis of brazilian rabies virus isolates with monoclonal antibodies to lyssavirus antigens. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 288-292. 1997.

QUINT, W.G.V.; GIELKENS, A.L.J.; BERNS, A.J.M; VAN OIRSCHOT, J.T.; CUYPERS, H.T. Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of "live" vaccines. **Journal of General Virology**, v. 68, p. 523-534. 1987.

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

RUPPRECHT, C.E.; GLICKMAN, L.T.; SPENCER, P.A.; WIKTOR, T.J. Epidemiology of rabies virus variants. Differentiation using monoclonal antibodies and discriminant analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 126, p. 298-309. 1987.

SACRAMENTO, D.; BADRANE, H.; BOURHY, H.; TORDO, N. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1149-1158. 1992.

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

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

SCHMITT, J.; BECHER, P.; THIEL, H-J.; KEIL, G.M. Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2839-2848. 1999.

SCHNEIDER, L.G. Antigenic variants of rabies virus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 5, p. 101-107. 1982.

SCHNEIDER, L.G. Spread of virus from the central nervous system. In: BAER, G.M. **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press: p. 133-144. 1991.

SCHNEIDER, L.G.; COX, J.H. Bat lyssaviruses in Europe. In: RUPPRECHT, C.E., DIETZSCHOLD, B., KOPROWSKI, H (eds). **Lyssaviruses**. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 207-218. 1994.

SHANKAR, V.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Direct entry of rabies virus into central nervous system without prior local replication. **Journal of Virology**, v. 65, p. 2736-2738. 1991.

SHOPE, R.E. Rabies virus antigenic relationships. In BAER, G.M. (Ed). **The Natural History of Rabies**, New York, USA: Academic Press, 1, p. 141-152. 1975.

SHEPPARD, M. Viral vectors for veterinary vaccines. **Advances in Veterinary Medicine**, v. 41, p. 145-161. 1999.

SMITH, J.S.; REID-SANDEN, F.L.; ROUMILLAT, L.F.; TRIMARCHI, C.; CLARK, K.; BAER, G.; WINKLER, W.G. Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 573-580. 1986.

SMITH, J.S.; FISHBEIN, D.B.; RUPPRECHT, C.; CLARK, K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, p. 205-211, 1991.

SMITH, J.S.; ORCIARI, L.A.; YAGER, P.A. Molecular epidemiology of rabies in the United States. **Seminars in Virology**, v. 6, p. 387-400. 1995.

SMITH, J.S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 166-176. 1996.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.R.; GONÇALVES, D.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTINI, F.K.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 13-18. 2002.

STRUBE, W.; AUER, S.; BLOCH, W.; HEINEN, E.; KRETZDORN, D.; RODENBACH, C.; SCHMEER, N. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 181-189. 1996.

SUPERTI, F.; SEGANTI, L.; TSIANG, H.; ORSI, N. Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cell. **Archives of Virology**, v. 81, p. 321-328. 1984.

SUPERTI, F.; HAUTTECOEUR, B.; MORELEC, M.J.; GOLDONI, P.; BIZZINI, B.; TSIANG, H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 46-56. 1986.

SUREAU, P.; ROLLIN, P.; WIKTOR, T.J. Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: Detection by monoclonal antibodies. **American Journal of Epidemiology**, v. 117, p. 605-609. 1983.

SUREAU, P.; PERRIN, P. The use of immunosome technology for vaccines against rabies and other viral diseases. **European Journal of Epidemiology**, v. 5, p. 275-278. 1989.

TAKASHIMA, Y.; NAGANE, N.; HUSHUR, O.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) recombinant expressing pseudorabies virus (PrV) glycoproteins B and C induces type 1 immune response in Balb/c mice. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 64, p. 589-596. 2002.

TAYLOR, J.; WEINBERG, R.; LANGUET, B.; DESMETTRE, P.; PAOLETTI, E. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. **Vaccine**, v. 6, p. 497-503. 1988.

TAYLOR, J.; TRIMARCHI, C.; WEINBERG, R.; LANGUET, B.; GUILLEMIN, F.; DESMETTRE, P.; PAOLETTI, E. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. **Vaccine**, v. 9, p. 190-193. 1991.

TAYLOR, G.; RIJSEWIJK, F.A.M.; THOMAS, L.H.; WYLD, S.G.; GADDUM, R.M.; COOK, R.S.; MORRISON, W.I.; HENSEN, E.; VAN OIRSCHOT, J.T.; KEIL, G. Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1759-1767. 1998.

THOULOUBE, M.I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7181-7190. 1998.

TIMS, T.; BRIGGS, D.; DAVIS, R.D.; MOORE, S.M.; XIANG, Z.; ERTL, H.C.J.; FU, Z.F. Adult dogs receiving a rabies booster dose with a recombinant adenovirus expressing rabies virus glycoprotein develop high titers of neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 18, p. 2804-2807. 2000.

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

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

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. World Health Organization Geneva: 28-51. 1996.

TUFFEREAU, C.; LEBLOIS, H.; BÉNÉJEAN, J.; COULON, P.; LAFAY, F.; FLAMAND, A. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. **Virology**, v. 172, p. 206-212. 1989.

TUFFEREAU, C.; BÉNÉJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (p75^{NTR}) can serve as a receptor for rabies virus. **EMBO Journal**, v. 17, p. 7250-7259. 1998.

VAN ENGELBURG, F.A.C.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN DEN BURG, L.; MOERMAN, A.; GIELKENS, A.L.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 2311-2318. 1994.

VAN OIRSCHOT, J.T.; RZIHA, H.J.; MOONEN, P.J.L.M.; POL, J.L.A.; VAN ZAANE, D. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 1179-1182. 1986.

VAN OIRSCHOT, J.T.; GIELKENS, A.L.J.; MOORMANN, R.J.M.; BERNS, A.J.M. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 85-101. 1990.

VAN OIRSCHOT, J.T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal of Biotechnology**, v. 73, p. 195-205. 1999.

WAGNER, R.R.; ROSE, J.K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: **Fundamental Virology**. FIELDS, KNIPE, HOWLEY (eds). Lippencott-Raven Publishers, Philadelphia, Third Edition, Chapter 19. 1996.

WANG, Y.; XIANG, Z.; PASQUINI, S.; ERTL, H.C. The use of a E1-deleted, replication-defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein for early vaccination of mice against rabies. **Journal of Virology**, v. 71, p. 3677-3683. 1997.

WEI, C-M.; GIBSON, M.; SPEAR, P.G.; SCOLNICK, E.M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 39, p. 935-944. 1981.

WHITT, M.A.; BUONOCORE, L.; PREHAUD, C.; ROSE, J.K. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. **Virology**, v. 185, p. 681-688. 1991.

WIKTOR, T.J.; FERNANDES, M.V.; KOPROWSKI, H. Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI-38. **Journal of Immunology**, v. 93, p. 353-366. 1964.

WIKTOR, T.J.; GYÖRGY, E.; SCHLUMBERGER, D.; SOKOL, F.; KOPROWSKI, H. Antigenic properties of rabies virus components. **Journal of Immunology**, v. 110, p. 269-276. 1973.

WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: Detection of antigenic variants. **Proceedings of the National Academy Sciences, USA**, v. 75, p. 3938-3942. 1978.

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

WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. 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, Brasil, 1, p. 94-112. 1982.

WIKTOR, T.J.; MAC FARLAN, R.I.; REAGAN, K.J.; DIETZSCHOLD, B.; CURTIS, P.J.; WUNNER, W.H.; KIENY, M.O.; LATHE, R.; LECOCQ, J.P.; MACKETT, M.; MOSS, B.; KOPROWSKI, H. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 81, p. 194-198. 1984.

WUNNER, W.H.; DIETZSCHOLD, B.; CURTIS, P.J.; WIKTOR, T.J. Rabies subunits vaccines. **Journal of General Virology**, v. 64, p. 1649-1656. 1983.

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.

XUAN, X.; TUCHIYA, K.; SATO, I.; NISHIKAWA, Y.; ONODERAZ, Y.; TAKASHIMA, Y.; YAMAMOTO, A.; KATSUMATA, A.; IWATA, A.; UEDA, S.; MIKAMI, T.; OTSUKA, H. Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector. **Vaccine**, v. 16, p. 969-976. 1998.

ZANETTI, C.R.; de FRANCO, M.T.; VASSÃO, R.C.; PEREIRA, C.A.; PEREIRA, O.A.C. Failure of protection induced by a Brazilian vaccine against Brazilian wild rabies viruses. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1745-1756. 1998.