

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR
DE CASOS DE RAIVA BOVINA NA REGIÃO
CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fábio Adriano Kanitz

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CASOS DE RAIVA BOVINA NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

Fábio Adriano Kanitz

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CASOS DE
RAIVA BOVINA NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

elaborada por
Fábio Adriano Kanitz

Como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Eduardo Furtado Flores, PhD.
(Presidente/Orientador)

Rudi Weiblen, PhD. (UFSM)

Luciane Teresinha Lovato, PhD. (UFSM)

Santa Maria, 20 de outubro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a minha família pela confiança em mim depositada, além do amor e união em todos os momentos. Em especial aos meus pais por todos os conselhos e a ajuda durante esta caminhada, serão sempre minha principal referência.

A minha fiel companheira Gabriela A. Jurach por todo o amor e companheirismo durante esses anos.

Ao Setor de Virologia, representado por todas as pessoas que em algum momento fizeram parte do grupo de pesquisa e principalmente aos colegas da pós e bolsistas que colaboraram diretamente com a realização deste trabalho.

Ao orientador prof. Eduardo Furtado Flores e ao prof. Rudi Weiblen, pela oportunidade e confiança, pela dedicação e pelos tantos ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço à Juliana, ao Mathias e ao Marcelo, além da grande amizade, por terem compartilhado suas experiências na área da virologia, pela paciência e por ter estado sempre disponível.

Aos amigos do laboratório, da faculdade, e todos os outros que tornaram meus dias mais agradáveis, com certeza também foram importantes.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realizar mestrado em um programa de excelência da CAPES.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste objetivo, meu muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CASOS DE RAIVA BOVINA NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

AUTOR: FÁBIO ADRIANO KANITZ
ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, 20 de outubro de 2014

A raiva é uma doença infecciosa do sistema nervoso central causada pelo vírus da raiva (RabV), que afeta todos os mamíferos. No Brasil a raiva tem causado consideráveis perdas a rebanhos bovinos em diversas regiões. O diagnóstico oficial é realizado pela técnica de imunofluorescência direta (FAT) de forma concomitante com a prova biológica, geralmente a inoculação intracerebral em camundongos (MIT). A MIT é considerada uma técnica sensível, específica e eficaz para o diagnóstico da raiva, porém apresenta desvantagens como o longo tempo para obtenção dos resultados e a necessidade de uso de animais. O primeiro artigo da presente dissertação descreve uma investigação epidemiológica e molecular de surtos de raiva ocorridos na região central do Rio Grande do Sul, entre maio e agosto de 2012. Nesse período, 45 casos suspeitos de raiva foram relatados em 22 rebanhos, localizados dentro de um raio de 4,7km, no município de Pinhal Grande. Desses, 32 amostras foram submetidas para diagnóstico da raiva, sendo que o RabV e/ou antígenos virais foram identificados em 27 amostras. Em um segundo momento, 11 amostras foram submetidas à transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para o gene da nucleoproteína (N) do RabV, seguido de sequenciamento nucleotídico e análise filogenética. Sete das 11 amostras apresentaram sequências nucleotídicas idênticas e uma apresentou mutação sinônima, não-codificante, indicando uma provável origem comum dos vírus. Por outro lado, três amostras apresentaram mutações que resultaram em alterações de aminoácidos, sugerindo uma origem diferente do vírus. Esses resultados sugerem que RabV de diferentes origens/linhagens co-circulam na região e foram envolvidos nos surtos descritos. O segundo artigo descreve a avaliação da sensibilidade ao isolamento do RabV em linhagens de células de neuroblastoma murino (N2A) e rim de hamster neonato (BHK-21). Para isso, trinta e seis amostras de cérebros bovinos oriundos de casos suspeitos de raiva foram inicialmente submetidas ao teste de FAT e MIT e, subsequentemente, a três protocolos de VI em cada linhagem celular: uma única passagem de 24h e 72h, e três passagens de 48h. O tempo médio necessário para obtenção de resultados finais na MIT foi de 12,3 dias (8-21). A FAT e MIT combinadas detectaram 32/36 amostras positivas. Dessas, a MIT detectou 32 (100%) e a FAT detectou 31 (96,8%). O tempo médio necessário para obter os resultados conclusivos na MIT foi de 12,3 dias (8-21). O isolamento em células BHK-21 resultou em 100% (32/32) de positividade no protocolo de 72h e em 96,9% (31/32) após três passagens de 48h. Em células N2A o isolamento resultou em 100% (32/32) das amostras positivas em 72h e em 30/32 (93,7%) após três passagens de 48h. Uma única passagem de 24h em ambas as linhagens mostrou um baixo desempenho, detectando menos de 40% das amostras positivas. Estes resultados indicam que o isolamento viral em qualquer uma das linhagens representa uma boa alternativa para a MIT como um teste confirmatório para o diagnóstico da raiva em amostras de bovinos, produzindo resultados confiáveis em tempo reduzido.

Palavras-chave: raiva, bovinos, análise filogenética, FAT, MIT.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

DIAGNOSIS AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF RABIES CASES OF BOVINE RABIES IN CENTRAL RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.

AUTHOR: FÁBIO ADRIANO KANITZ
ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, October 20, 2014

Rabies is an infectious disease of the central nervous system caused by the rabies virus (RABV), which affects all mammals. In Brazil the rabies has caused considerable losses to cattle herds in various regions. The official diagnosis is made by the fluorescent antibody technique (FAT) concomitantly with biological assay, usually the mouse inoculation tests (MIT). The MIT is considered a sensitive, specific and effective technique for rabies diagnosis, but has disadvantages such as long time to obtain the results and the need to use animals. The first paper of this dissertation describes a molecular and epidemiological investigation of outbreaks of bovine rabies occurring in the central region of Rio Grande do Sul state, Brazil, between May and August 2012. In this period, 45 cases suspected of rabies were reported in 22 small herds, located within a 4.7km range, in the county of Pinhal Grande. From these, 32 samples were submitted to rabies diagnosis and RabV and/or viral antigens were identified in 27 samples. Subsequently, 11 brain samples were submitted to reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) for the nucleoprotein gene (N) followed by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis. Seven out of 11 samples yielded identical sequences; one presented a synonymous, non-coding mutation, indicating a likely common origin of the virus. However, three other samples presented nucleotide mutations which resulted in amino acid changes, suggesting a different origin of the virus. In summary, these results suggest that RabV strains of different origin/lineages co-circulate in the region and were involved in the outbreaks. The second paper describes an evaluation of sensitivity for VI of Rabv in neuroblastoma cells (N2A) and baby hamster kidney cells (BHK-21). For this, thirty-six samples derived bovine brains of suspected rabies cases were initially submitted to the FAT and MIT test and subsequently to three protocols VI in each cell line: a single pass 24h and 72h, and three passes 48h. The average time to obtain final results at MIT was 12.3 days (8-21). The average time required for final MIT results was 12.3 days (8 – 21). The FAT and MIT combined detected 32/36 positive samples, these MIT detected 32 (100%) and the FAT detected 31 (96.8%). The isolation in BHK-21 cells resulted in 100% (32/32) positivity in the protocol of 72h and 96.9% (31/32) after three passages of 48h. The isolation in N2A cells resulted in 100% (32/32) positive for 72h and 30/32 (93.7%) samples 48h after three passages. A single 24h passage protocol (T1) in both cell lines performed poorly, detecting less than 40% of the positive samples. These results indicate that VI in either cell line, especially in BHK-21 cells that grow faster and are much easier to maintain than N2A cells, does represent an adequate alternative for MIT as a confirmatory test for rabies diagnostic in bovine specimens, yielding reliable results in reduced time.

Key words: Rabies, bovine, phylogenetic analysis, FAT, MIT.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 2. CAPÍTULO 1 - EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE SURTO DE RAIVA BOVINA NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL | 12 |
| INTRODUÇÃO | 15 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| RESULTADOS | 18 |
| DISCUSSÃO | 19 |
| CONCLUSÃO | 21 |
| REFERÊNCIAS | 21 |
| 3. CAPÍTULO 2 - VIRUS ISOLATION IN CELL CULTURE FOR CONFIRMATORY DIAGNOSTIC OF RABIES IN BOVINE SPECIMENS | 28 |
| ABSTRACT | 29 |
| BRIEF COMMUNICATION | 30 |
| REFERENCES | 34 |
| 4. CONCLUSÃO | 1 |
| 5. REFERÊNCIAS | 1 |

1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecto-contagiosa aguda que acomete todos os mamíferos. É causada pelo vírus da raiva (RabV), que pertence à Ordem *Mononegavirales*, Família *Rhabdoviridae*, Gênero *Lyssavirus* (KING & TURNER, 1993). Usando métodos sorológicos, antigênicos e genéticos o RabV é classificado em sete genótipos (RUPRECHT, HANLON & HEMACHUDHA, 2002).

A morfologia do vírus rábico é comparada à forma de um projétil, possuindo uma extremidade plana e outra arredondada. No entanto, partículas com ambas as extremidades arredondadas também podem ser observadas (MATTOS, MATTOS & RUPRECHT, 2001). Os vírions infecciosos possuem 130 a 200 nm de comprimento e 60 a 110 nm de diâmetro (WUNNER, 1991). O genoma é formado por uma fita simples de RNA, polaridade negativa, com aproximadamente 11928 nucleotídeos. O nucleocapsídeo, formado pelo genoma e múltiplas cópias da nucleoproteína (N) é recoberto por um envelope lipídico e possui conformação helicoidal (KOPROWSKI, 1991). A partícula viral é revestida externamente por uma membrana lipídica contendo espículas compostas de trímeros da glicoproteína G (MATTOS, MATTOS & RUPRECHT, 2001).

O genoma do RabV codifica 5 proteínas estruturais, denominadas: G (glicoproteína), N (nucleoproteína), P ou NS (fosfoproteína), M (proteína de matriz), e L (proteína RNA polimerase dependente de RNA). A proteína G, a mais estudada, possui 505 aminoácidos, sendo o principal antígeno de superfície indutor de anticorpos neutralizantes, e também relacionada a atividades de ligação aos receptores celulares, bem como determinante antigênico para linfócitos B e T (MATTOS, MATTOS & RUPRECHT, 2001).

A nucleoproteína, principal componente do nucleocapsídeo viral, embora imunogênica, possui limitada importância relacionada à proteção, no entanto, ela é o principal alvo dos linfócitos T auxiliares, gerando reação cruzada entre os lissavírus (NATHANSON & GONZALES, 1991).

A proteína P ou NS é constituinte do nucleocapsídeo viral e é formada por 297 a 303 aminoácidos. É uma proteína fosforilada, mas os sítios de fosforilação ainda não foram precisamente determinados (MATTOS, MATTOS & RUPRECHT, 2001).

A proteína M, que tem a função de unir o envelope viral ao nucleocapsídeo, é a menor e mais simples das proteínas do RabV, possui 202 aminoácidos. Outra função desta proteína

envolve a interação do domínio citoplasmático da proteína G com o nucleocapsídeo (proteína N) durante a montagem e brotamento do vírus (MATTOS, MATTOS & RUPRECHT, 2001).

A proteína L, maior proteína do RabV, possui várias funções, dentre elas estão: a síntese de RNA, terminação, metilação e poliadenilação de RNA viral, mas pelo fato de estar presente em pequenas quantidades, esta é uma das proteínas virais menos estudadas (WUNNER, 1991).

Na patogenia da raiva, o RabV geralmente penetra no hospedeiro por solução de continuidade na pele produzida por mordeduras. No entanto, a penetração através de membranas mucosas intactas e do trato digestivo pode ocorrer, porém não através da pele íntegra. Em circunstâncias excepcionais a infecção por via respiratória é possível, por exemplo, em furnas que albergam um elevado número de morcegos infectados (KAPLAN, 1996).

A migração do RabV para o sistema nervoso central (SNC) ocorre em direção centrípeta por meio de axônios motores, sensoriais e nervos periféricos, porém a via motora é a rota comumente utilizada na disseminação do vírus rábico para o SNC (JACKSON, 2002).

O período de incubação varia em função do título viral e do local da inoculação. Quanto mais próximo do SNC for esse local, mais curto será o período de incubação. A velocidade estimada de migração do vírus ao longo das vias nervosas é de 15 a 100 mm por dia (WHO, 2005b).

Em bovinos, equinos e outros animais de produção, a incubação da doença varia de 25 a 150 dias, ou mais. A duração da doença varia de 2 a 10 dias e geralmente culmina com a morte por paralisia generalizada (FEKADU, 1991).

Os sinais clínicos da raiva nos animais podem se manifestar de duas formas: furiosa ou paralítica, sendo esta última mais comum em animais de produção como bovinos, bubalinos, equinos, caprinos, ovinos. Estes animais costumam apresentar como sinal clínico mais característico a paralisia que é observada pela dificuldade motora (FEKADU, 1991).

A raiva encontra-se amplamente distribuída pelo mundo e está presente em todos os continentes. Existe um pequeno número de países livres dessa enfermidade e em geral são ilhas (WHO, 2005a). Uma área somente é considerada livre quando nenhum caso de infecção nativa por *Lissavirus* foi confirmada em humanos ou animais, incluindo morcegos, nos últimos dois anos, e que existe um adequado sistema de vigilância em funcionamento (WHO, 2005b). No Brasil, a raiva é endêmica, em níveis diferenciados de acordo com a região geográfica (BRASIL, 2002).

A OMS estima que aproximadamente 55.000 mortes humanas ocorram a cada ano, principalmente na Ásia e África, resultado que reflete um sistema de saúde ineficiente e medidas inadequadas de controle da doença (WHO, 2005b).

A permanência do RabV em determinadas regiões ocorre através de diferentes ciclos, ocasionalmente inter-relacionados, denominados ciclos urbano e silvestre, aéreo e rural. O ciclo aéreo refere-se à raiva em morcegos, sendo os demais ciclos denominados ciclos “terrestres” (OIE, 2009).

No ciclo da raiva urbana, os cães são os principais reservatórios. Este ciclo predomina em regiões da África, Ásia, América Central e América do Sul, onde o número de cães não vacinados ainda é alto. Este ciclo foi controlado em diversas regiões do Brasil por meio de vacinação de animais domésticos e foi praticamente eliminada na América do Norte e Europa; embora casos esporádicos ocorram em cães infectados por animais selvagens, o ciclo urbano não se perpetua na população canina (BRASIL, 2002; OIE, 2009).

O ciclo silvestre é o predominante na Europa e América do Norte. Também está presente simultaneamente com o ciclo urbano em algumas partes do mundo. A epidemiologia deste ciclo é complexa; fatores que o afetam incluem a variante do vírus, o comportamento das espécies hospedeiras, ecologia e fatores ambientais (SCHNEIDER et al., 2009).

No ciclo rural os herbívoros são principalmente acometidos, comumente os bovinos e equinos. Em função de seus hábitos alimentares, os morcegos hematófagos são os principais transmissores da infecção a bovinos. Não obstante, na indisponibilidade de bovinos para sua alimentação, os morcegos *D. rotundus* podem atacar outras espécies na busca de alimento, inclusive humanos. Duas outras espécies de morcegos hematófagos conhecidas, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*, alimentam-se geralmente de sangue de aves. Ambas as espécies podem ser contaminadas pelo RabV, mas a sua participação na manutenção da infecção no ciclo silvestre da raiva não é significativa (BRASIL, 2002).

No Brasil o diagnóstico laboratorial preconizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) é realizado pela técnica de imunofluorescência direta (FAT) concomitante com a prova biológica.

A FAT é uma técnica rápida e segura, sua sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da raiva aproximam-se de 100% (LENNETTE & EMMONS, 1971). Foi estabelecida pela OMS e a OIE como a técnica padrão ouro para detecção do antígeno do RabV. Recomenda-se, para aumentar a sensibilidade da FAT, que sejam examinados fragmentos de córtex cerebral, cerebelo e corno de Ammon (WHO, 2005b). Existem alguns fatores que influenciam na sensibilidade da técnica de FAT: estado de conservação da amostra

das áreas do cérebro amostradas para confecção do teste, e da distribuição do vírus, que pode ser irregular (WHITFIELD et al, 2001). A sensibilidade da técnica fica muito prejudicada em materiais em decomposição (TRIMARCHI & DEBBIE, 1991).

A inoculação intracerebral em camundongos (*Mouse inoculation test*, MIT) é considerada uma prova eficaz para a detecção do vírus da raiva (OIE, 2005), porém exige pessoal treinado e instalações para manutenção e/ou criação dos camundongos.

O uso de animais em laboratório tem sido amplamente discutido por comitês nacionais e internacionais, ONGs, legisladores e as atuais perspectivas apontam para redução do uso de animais e, sempre que possível, até mesmo a total substituição por métodos alternativos (WOLDEHIWET, 2005).

Nesse contexto a substituição da MIT por inoculação em cultivo celular (ICC) tem se mostrado uma maneira de reduzir ou até mesmo eliminar o uso de camundongos para o diagnóstico da raiva, além de reduzir os custos.

O MAPA, por meio da Instrução Normativa 5 de 1 de março de 2002, passou a recomendar a substituição da MIT pela técnica de isolamento em cultivo celular. A linhagem celular preconizada é a de neuroblastoma murino (N2A, ATCC: CCL-131). De acordo com o MAPA (2009) este teste é tão sensível quanto à inoculação em camundongos e uma vez existindo a unidade de cultura celular no laboratório, este teste deve substituir o teste de inoculação em camundongos, evitando assim o uso de animais, além do fato de ser menos onerosa e mais rápida a obtenção do diagnóstico definitivo.

Com base nisso, os objetivos desse trabalho foram descrever uma investigação epidemiológica e molecular de surtos de raiva ocorridos na região central do Rio Grande do Sul, entre maio e agosto de 2012, e também avaliar a sensibilidade do isolamento do RabV em linhagens N2A e BHK-21 para amostras provenientes de bovinos suspeitos de raiva, comparando-o com as técnicas de rotina FAT e MIT. Essa dissertação é composta por dois capítulos: o primeiro descreve a investigação epidemiológica e molecular dos surtos de raiva e o segundo descreve a investigação da sensibilidade do isolamento viral em cultivo celular como teste complementar para o diagnóstico da doença

2. CAPÍTULO 1

Epidemiologia molecular de surto de raiva bovina na região central do Rio Grande do Sul.

Fábio Adriano Kanitz, Ananda Paula Kowalski , Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista, Pedro Carnieli Junior, Rafael de Novaes Oliveira, Rudi Weiblen, Eduardo Furtado Flores

(Publicado na revista Ciência Rural v.44, n.5, p.834-840, maio, 2014)

Epidemiologia molecular de surto de raiva bovina na região central do
Rio Grande do Sul, 2012.

Molecular epidemiology of an outbreak of bovine rabies in central Rio Grande do Sul, Brazil,
2012

Fábio Adriano Kanitz^I Ananda Paula Kowalski^I Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista^{II} Pedro Carnieli
Junior^{II} Rafael de Novaes Oliveira^{II} Rudi Weiblen^I Eduardo Furtado Flores^{I*}

RESUMO

A raiva é uma doença infecciosa do sistema nervoso central de mamíferos causada pelo vírus da raiva (RabV), geralmente, transmitido pela mordedura de animais infectados. No Brasil, os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são as principais fontes de infecção do RabV para bovinos e equinos. Este artigo descreve uma investigação epidemiológica e molecular de surtos de raiva ocorridos na região central do Rio Grande do Sul, entre maio e agosto de 2012. Nesse período, 45 casos suspeitos de raiva foram relatados em 22 pequenos rebanhos, localizados dentro de um raio de 4,7km, no município de Pinhal Grande. Desses, 32 amostras foram submetidas para diagnóstico da raiva, sendo que o RabV e/ou antígenos virais foram identificados em 27 amostras. Em um segundo momento, 11 amostras foram submetidas à transcrição reversa/reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para o gene da nucleoproteína (N) do RabV, seguido de sequenciamento nucleotídico e análise filogenética. Sete das 11 amostras apresentaram sequências nucleotídicas idênticas e uma apresentou mutação sinônima, não-codificante, indicando uma provável origem comum dos vírus. Por outro lado, três amostras apresentaram mutações que resultaram em alterações de

^{I*} Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com . Autor para correspondência.

^{II} Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil.

aminoácidos, sugerindo uma origem diferente do vírus. Esses resultados sugerem que RabV de diferentes origens/linhagens co-circulam na região e foram envolvidos nos surtos descritos. Investigações sobre a circulação de ambos os genótipos em morcegos na região estão em andamento.

Palavras-chave: raiva, *Desmodus rotundus*, surtos, análise filogenética.

ABSTRACT

Rabies is an infectious disease of the central nervous system of mammals caused by rabies virus (RabV), generally transmitted by the bite of rabid animals. In Brazil, vampire bats *Desmodus rotundus* are the main reservoirs of RabV for livestock. The present study describes a molecular and epidemiological investigation of outbreaks of bovine rabies occurring in the central region of Rio Grande do Sul state, Brazil, between May and August 2012. In this period, 45 cases suspected of rabies were reported in 22 small herds, located within a 4.7km range, in the county of Pinhal Grande. From these, 32 samples were submitted to rabies diagnosis and RabV and/or viral antigens were identified in 27 samples. Subsequently, 11 brain samples were submitted to reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) for the nucleoprotein gene (N) followed by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis. Seven out of 11 samples yielded identical sequences; one presented a synonymous, non-coding mutation, indicating a likely common origin of the virus. However, three other samples presented nucleotide mutations which resulted in amino acid changes, suggesting a different origin of the virus. In summary, these results suggest that RabV strains of different origin/lineages co-circulate in the region and were involved in the outbreaks. Investigations on the circulation of both genotypes in bats in the region are currently underway.

Key words: rabies, *Desmodus rotundus*, outbreaks, phylogenetic analysis.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa aguda do sistema nervoso central (SNC) causada pelo vírus da raiva (RabV), pertencente à família *Rhabdoviridae* e ao gênero *Lyssavirus* (TORDO et al., 1998). Os vírions do RabV contêm um nucleocapsídeo em forma de projétil recoberto por envelope lipoproteico. O genoma viral é formado por uma cadeia única de ácido ribonucleico (RNA) com polaridade negativa e possui cinco genes, que codificam a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a glicoproteína (G), a proteína de matriz (M) e a RNA polimerase (L) (ICTV, 2012). Com algumas exceções, particularmente algumas ilhas, o RabV é encontrado em todo o mundo (OIE, 2009). No Brasil, a raiva é endêmica e variantes do RabV têm sido identificadas em cães, canídeos silvestres e saguis, além de morcegos hematófagos e não hematófagos (MOCHIZUKI et al., 2012). Os morcegos hematófagos, especialmente *Desmodus rotundus*, são os principais reservatórios do RabV na América Latina, sendo os principais transmissores da raiva para os herbívoros (SCHNEIDER et al., 2009).

O sequenciamento parcial do gene da nucleoproteína (N) tem sido utilizado no diagnóstico e em estudos de epidemiologia molecular da raiva, pois esse gene é conservado nos *Lyssavirus* (BOURHY et al., 2008). Uma divergência na sequência de três aminoácidos no gene N permite agrupar os isolados brasileiros do RabV em dois grupos: (i) vírus da raiva relacionado aos canídeos e (ii) vírus da raiva relacionada aos morcegos hematófagos (ITO, 2001). Uma análise geográfica e molecular de surtos de raiva bovina na região central e sudeste no Brasil mostrou a relação entre os RabVs identificados nos rebanhos afetados com os vírus de morcegos hematófagos. Com o uso dessas ferramentas, foi possível determinar como o padrão epidemiológico é mantido no tempo e no espaço nessas áreas (KOBAYASHI, 2006). Por meio de análises geográficas e moleculares, também é possível identificar diferentes linhagens do RabV, cujas divergências são influenciadas por características

epidemiológicas e ecológicas dos morcegos hematófagos, que, por sua vez, são afetadas pela topografia e geografia da região (KOBAYASHI, 2008).

Historicamente, a raiva tem causado importantes perdas a rebanhos bovinos em várias regiões do País, acarretando um impacto econômico negativo à cadeia produtiva (SCHNEIDER et al., 2009). Durante o ano de 2012, foram notificados oficialmente no Brasil 1435 casos de raiva em bovinos, contabilizando-se somente aqueles diagnosticados em laboratórios oficiais e credenciados (MAPA, 2013). No entanto, dados da Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul (RS) indicam a ocorrência de aproximadamente quatro mil casos de raiva bovina entre janeiro e junho de 2013 (SEAPA, 2013).

Acompanhando essa tendência, entre maio e agosto de 2012, foram relatados 45 casos suspeitos de raiva em 22 rebanhos bovinos no município de Pinhal Grande, região central do RS. Destes, 32 amostras foram submetidas ao diagnóstico e 27 foram diagnosticadas positivas para a raiva. O objetivo do presente trabalho foi descrever esses eventos, procurando identificar e caracterizar geneticamente os RabVs envolvidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 32 amostras de bovinos, oriundas de casos ocorridos no município de Pinhal Grande (latitude: 29°20'46''S e longitude: 53°18'24''W), região central do Rio Grande do Sul, entre maio e agosto de 2012. O diagnóstico laboratorial foi realizado em fragmentos do encéfalo (hipocampo, cerebelo e córtex), utilizando-se os dois testes-padrão de diagnóstico da raiva: imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (MIT, OIE, 2009). O material foi enviado por Médicos Veterinários autônomos ou do quadro da Secretaria de Agricultura do RS, acompanhado de histórico clínico e epidemiológico. Os locais de origem das amostras e a localização de farnas catalogadas pela Secretaria de

Agricultura do Estado do RS, que abrigam colônias de morcegos hematófagos, foram obtidos pelo sistema de posicionamento global (GPS) e plotados no mapa da região.

Após a confirmação do diagnóstico, os materiais positivos foram encaminhados ao Instituto Pasteur (São Paulo, SP) para análise molecular. Para tal, foi realizada a extração de RNA total dos fragmentos, utilizando-se o reagente *Trizol* (Invitrogen Life Technologies™). Posteriormente, o RNA extraído foi submetido à transcrição reversa, seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para amplificação do gene que codifica a nucleoproteína N do RabV (CARNIELI, 2005), com os seguintes *primers*: 21G (senso, 5'ATGTAACACCTCTACAATG3') e 304 (antisenso, 5'TTDACGAAGATCTTGCTCAT3'), descritos por ORCIARI et al. (2001). Os *amplicons* foram purificados com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare™) e submetidos ao sequenciamento genético. A reação de sequenciamento de DNA foi realizada com 3,2pmol de cada *primer* (senso- 21G e antisenso- 304), descritos anteriormente e com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®). Para obtenção das sequências nucleotídicas, foi utilizado o analisador genético automático 3130 da Applied Biosystems®. Foram analisados 1218 nucleotídeos da região codificante da proteína N, localizados entre os nucleotídeos 203 e 1421 da amostra PV, padrão de RabV (acesso M13215.1). As sequências foram editadas usando o software CHROMAS (versão 2.24 Copyright 1998–2004 Technelysium Pty Ltd.), alinhadas pelo método CLUSTAL/W (versão 7.1.3.0 do *software* BIOEDIT, HALL, 1999) e utilizadas para aferir a identidade das espécies, utilizando o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Uma árvore filogenética para determinar e confirmar as relações evolutivas entre as espécies foi construída com o software MEGA (versão 5.0), usando o método *maximum likelihood* com o modelo de substituição GTR (G + I) 5.0 (TAMURA, et al., 2011) e a confiabilidade foi avaliada com

bootstrap de 1.000 repetições. Os cálculos de diversidade e identidade intragrupo entre as amostras sequenciadas neste trabalho foram realizados com o software MEGA (versão 5.0).

RESULTADOS

Os casos descritos neste estudo ocorreram entre final de maio e agosto de 2012, abrangendo um intervalo um pouco inferior a três meses. Quarenta e cinco animais, oriundos de 22 rebanhos, apresentaram sinais neurológicos sugestivos de raiva (perda do trem posterior, ataxia, incoordenação e decúbito esternal) e foram a óbito. Os rebanhos acometidos pertenciam a pequenas propriedades, caracterizadas pela produção diversificada e agricultura de subsistência, e possuíam entre dois e 58 animais com aptidão para carne e também bovinos leiteiros (Tabela 1).

Os focos concentraram-se dentro de um raio de 4,7 quilômetros (km) (FIGURA 1), todos com proximidade do Rio Jacuí, sendo que a propriedade mais distante é localizada a 7,2km da margem. Dentro dos limites do surto, situam-se duas furnas (F1 com latitude: 29°17'57.07"S e longitude: 53°15'27.94"O; e F2 com latitude: 29°19'44.13"S e longitude: 53°14'31.88"O) cadastradas pela Secretaria de Agricultura do RS, locais em que técnicos realizam vistorias e ações periódicas de combate a morcegos hematófagos.

Das 32 amostras enviadas, 27 foram positivas para o RabV pelos testes de IFD e/ou inoculação em camundongos (MIT). O sequenciamento de 1218 nucleotídeos do gene N de 11 dessas amostras demonstrou sequências características da linhagem do RabV de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*. Sete destas amostras (SV 229/12, SV 256/12, SV 275/12, SV 276/12, SV 335/12, SV 362/12 e SV 528/12) apresentaram sequências nucleotídicas idênticas entre si (100% de identidade). Uma amostra (SV 447/12) apresentou uma mutação sinônima no nucleotídeo 141 [codificante de aminoácido (aa) de mesmo grupo químico]. Outras três amostras (SV 214/12, SV 336/12 e SV 529/12) apresentaram mutações não

sinônimas. Destas, as amostras SV 214/12 e SV 336/12 apresentaram a mesma mutação (posição 1243, troca do aa ácido glutâmico [E] pelo aa aspartato [D]). Já a amostra SV 529/12 apresentou troca do aa asparagina (N) pelo aa serina (S), na posição 219.

A topologia da árvore filogenética (Figura 2) pode ser dividida em três agrupamentos: de morcegos hematófagos, de morcegos não-hematófagos e de caninos. Todas as amostras sequenciadas localizaram-se no agrupamento de morcegos hematófagos e formaram três subgrupos: subgrupo 1 (amostra SV 529/12); subgrupo 2 (SV 214/12 e SV 336/12); e subgrupo 3, formado pelas demais amostras idênticas entre si. A diversidade entre as amostras sequenciadas foi de 0,2%. A identidade entre as amostras correspondente a cada um dos subgrupos foi de 1,1% entre os subgrupos 1 e 2, 1% entre os subgrupos 2 e 3 e finalmente de 0,1% entre os subgrupos 1 e 3.

DISCUSSÃO

No Brasil, a raiva apresenta diferentes níveis de endemicidade de acordo com a região. No Rio Grande do Sul, a raiva urbana, que é transmitida por cães domésticos, está erradicada desde 1988 (BATISTA et al., 2007). Já a raiva dos herbívoros, transmitida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, continua endêmica, sendo, que em 2012 e 2013, foi registrada a maior incidência de casos desde a década de 80. O presente estudo descreve um surto de raiva bovina ocorrido no final do outono e inverno, abrangendo 22 propriedades na região central do Rio Grande do Sul, onde foram identificadas 27 amostras positivas para o RabV. Dentre as 32 amostras analisadas, 27 resultaram positivas. Esse número revela-se atípico quando comparado com a casuística observada no Setor de Virologia da UFSM no período de 2001 a 2011, quando foram examinadas 96 amostras suspeitas e 31 resultaram positivas. Ou seja, o presente surto resultou em número de positivos equivalente ao total diagnosticado no SV/UFSM nos 10 anos anteriores.

Além da área central do Rio Grande do Sul, outras regiões apresentaram um crescimento no número de casos de raiva bovina nos últimos anos. Entre os meses de janeiro e junho de 2013, cerca de quatro mil bovinos morreram em decorrência de raiva. Somando-se os dados de 2011 a 2013, esse número se aproxima dos 30 mil (SEAPA, 2013). Somente em perdas diretas, os prejuízos estão estimados em 30 a 40 milhões de reais. Eventos como este podem estar relacionados a um aumento na população de morcegos hematófagos (LORD, 1988) e também a fatores ambientais, além da oferta de alimento (LEE, 2012). Os casos descritos neste estudo ocorreram após um longo período de estiagem no RS (2010-2011), em que a região central do Estado passou pelo maior período de seca dos últimos 60 anos (AGRICULTURA, 2012). Outros fatores, como a alta densidade populacional de bovinos na região e a pequena distância entre as furnas/abrigos e os rebanhos podem também ter contribuído para esses casos (GOMES et al., 2010). É possível que a longa estiagem, somada ao desmatamento e à ocupação desordenada de áreas antes preservadas, tenham gerado mudanças ambientais que resultaram em um aumento na população de morcegos hematófagos e, conseqüentemente, no grande número de casos de raiva observado.

Em nível de Estado, além do aumento explosivo do número de casos, a ocorrência de raiva tem se expandido geograficamente, passando a afetar áreas até então indenes (ou hipoendêmicas), como a fronteira oeste e região da campanha (SEAPA, 2013). As causas dessa expansão são desconhecidas até o presente, mas provavelmente envolvem questões ecológico-ambientais que afetam a biologia e comportamento dos quirópteros. Diante desse aumento na incidência de raiva em bovinos no RS, as atuais recomendações para o controle da doença no Estado deveriam ser revisadas.

As propriedades foco concentraram-se dentro de um raio de 4,7km e possuem proximidade com o Rio Jacuí. Dentro dos limites geográficos do surto, também existem duas furnas catalogadas pelo serviço de combate a morcegos hematófagos da Secretaria de

Agricultura do RS. Tais distâncias estão dentro do raio de vôo dos *Desmodus rotundus*, que geralmente buscam alimento dentro de um raio de 2 a 7km do seu abrigo (ARELLANO, 1988). Além disso, condições climáticas favoráveis, presença de abrigos naturais (furnas, matas) ou artificiais e presença de bovinos contribuem para a ocorrência da raiva (BARROS et al., 2006).

As diferenças de nucleotídeos apresentadas pelas amostras analisadas são pouco significantes. Sendo assim, sugere-se que as oito amostras (sete idênticas entre si e uma com alteração de um nucleotídeo) tenham origem comum, ou seja, sejam originadas de um mesmo vírus ou sublinhagem viral. Por outro lado, as amostras que contêm mutação com alteração de aminoácido (SV 214/12, SV 336/12 e SV 529/12) possivelmente pertençam a outra sublinhagem, indicando a circulação de mais de uma linhagem do RabV na região.

A identificação de três subgrupos da linhagem genética de RabV de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* indica a co-circulação dessas sublinhagens na região. Essas linhagens podem ter origem em três colônias de morcegos (cada uma mantendo uma sublinhagem) ou, eventualmente, a manutenção de mais de uma sublinhagem do vírus em uma mesma colônia. A identificação de três sublinhagens do RabV pode ainda ser reflexo de mutações totalmente aleatórias, características de vírus com genoma RNA. Para o conjunto de amostras analisadas, é difícil confirmar ou refutar essas hipóteses, principalmente pelo fato de a análise ter se restringido a amostras obtidas do hospedeiro terminal, os bovinos.

CONCLUSÃO

Três sublinhagens do RabV de *Desmodus rotundus* foram identificadas nos surtos ocorridos na região central do RS, em 2012.

REFERÊNCIAS

AGRICULTURA. Notícias da agricultura. **Canal Rural**, Porto Alegre, 23 mar. 2012. Especiais. Acesso em: 14 dez. 2012. Online. Disponível em:

<<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2012/11/encontro-no-rio-grande-do-sul-debate-propostas-de-prevencao-a-seca-3966719.html>>.

ARELLANO, C. Biology, ecology and control of the vampire bat. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p.615-619, 1988. Disponível em:

<http://cid.oxfordjournals.org/content/10/Supplement_4/S615.full.pdf+html>. Acesso em: 25 jun. 2013.

BARROS, C.S.L. et al. **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**. São Paulo: Vallée, 2006. p.21-28.

BATISTA, H.B.C.R. et al. Rabies: a brief review. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.125-144, 2007.

BOURHY, H. et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. **Journal of General Virology**, v.89, p.2673, 2008. Disponível em:

<<http://vir.sgmjournals.org/content/89/11/2673.full.pdf+html>>. Acesso em: 25 jun.2013. doi:

10.1099/vir.0.2008/003913-0.CARNIELI, P.J. et al. Phylogeny of a rabies virus identified in a cat closely related to vampire bat rabies based on the nucleoprotein gene. **Virus Reviews and Research**, v.10, p.50-54, 2005.

GOMES, M.N. et al. Landscape risk factors for attacks of vampire bats on cattle in São Paulo, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.93, p.139-146, 2010. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0167587709003134/1-s2.0-S0167587709003134-main.pdf?_tid=b9891bd4-fba6-11e2-b70b-00000aacb362&acdnat=1375470607_af445bffae2c562387c6dde5cd5eae8a>.

Acessao em: 20 jul. 2013.

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

ITO, M. et al. 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.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682200909164#>>.

Acesso em: 25 jun.2013. doi: 10.1006/viro.2000.0916.

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES), 2012. Acesso em: 25 jun. 2013. Online. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>.

KOBAYASHI, Y. et. al. Geographical distribution of vampire bat related cattle rabies in Brazil.

Journal of Veterinary Medical Science, v.68, p.1097-1100, 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085890>>. Acesso em: 26 jun.2013.

KOBAYASHI, Y. et. al. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC Research Notes**, v.4, p.1-9, 2008. Disponível em:

<<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-4-44.pdf>>. Acesso em: 25 jun.2013.

doi: 10.1186/1746-6148-4-44.

LEE, D.N. et al. Present and potential future distribution of common vampire bats in the Americas and the associated risk to cattle. **PLoS ONE**, v.7, p.1-9, 2012. Disponível em:

<[http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0042466?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+plosone%2FComputationalBiology+\(PLoS+ONE+Alerts%3A+Computational+Biology\)](http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0042466?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+plosone%2FComputationalBiology+(PLoS+ONE+Alerts%3A+Computational+Biology))>. Acesso em: 14 jun.2013.

doi:10.1371/journal.pone.0042466

LORD, R.D. et al. Control of vampire bats. In: GREENHALL A.M. & SCHMIDT, U. **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC, 1988. p.215-226.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), 2013.

Disponível em:

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20dos%20herbivros/Dados%20controle%20raiva%20herb%C3%ADvoros%20Brasil%20ate%202012.pdf.

Acesso em: 24 jul.2013.

MOCHIZUKI, N. et al. Molecular epidemiology of livestock rabies viruses isolated in the northeastern Brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003 - 2009. **BMC Research Notes**, v.5, p.32, 2012. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/32>. Acesso em: 26 jun.2013. doi:10.1186/1756-0500-5-32.

OIE. Rabies. World Organisation for Animal Health. **Technical Disease Card**, 2009. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/rabies.pdf. Acesso em: 04 jun.2013.

ORCIARI, L.A. et al. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v.19, n.31, p.4511-4518, 2001. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0264410X01001864/1-s2.0-S0264410X01001864-main.pdf?_tid=62b67644-1d34-11e3-949f-00000aab0f6b&acdnt=1379159838_6657ad7d163d9ddce0638ea93aa17c17>. Acesso em: 14 jul. 2013.

SCHNEIDER, M.C. et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America?. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.25, p.260-269, 2009. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-5-32.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2013.

SEAPA. Notícias. Assessoria de Imprensa. **Secretaria da Agricultura Pecuária e Agronegócio**, Porto Alegre, 21 jun. 2013. Acesso em: 20 jul. 2013. Online. Disponível em: http://www.agricultura.rs.gov.br/conteudo/4270/?Raiva_j%C3%A1_matou_quatro_mil_animais_no_Estado_em_2013.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. v. 4, p.1-9, 2011.

TORDO, N. et al. Rhabdoviruses: rabies. In: Hodder Education Publishers. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. Londres, 1998. p.666-692.

Tabela 1 – Identificação das propriedades, data, localização geográfica e número de animais afetados.

| Identificação da amostra | Propriedade | Data | Posicionamento Geográfico | Número de bovinos acometidos | Número de bovinos na propriedade |
|--------------------------|-------------|------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| SV 214/12 | A | 28/5 | 29°17'25.60"S 53°15'48.70"O | 2 | 38 |
| SV 229/12 | B | 30/5 | 29°18'48.40"S 53°15'29.10"O | 1 | 15 |
| SV 230/12 | C | 30/5 | 29°19'30.50"S 53°16'17.10"O | 3 | 20 |
| SV 253/12 | D | 4/6 | 29°19'30.50"S 53°16'17.10"O | 4 | 54 |
| SV 256/12 | E | 4/6 | 29°20'27.50"S 53°17'58.00"O | 1 | 2 |
| SV 257/12 | F | 4/6 | 29°19'6.40"S 53°16'40.20"O | 3 | 43 |
| SV 274/12 | G | 12/6 | 29°18'42.90"S 53°15'14.40"O | 3 | 31 |
| SV 275/12 | H | 12/6 | 29°18'42.80"S 53°15'13.50"O | 2 | 28 |
| SV 276/12 | I | 12/6 | 29°18'42.80"S 53°15'13.50"O | 1 | 58 |
| SV 277/12 | J | 12/6 | 29°19'30.60"S 53°14'19.30"O | 3 | 20 |
| SV 298/12 | L | 18/6 | 29°17'59.20"S 53°16'55.20"O | 2 | 25 |
| SV 329/12 | M | 26/6 | 29°19'29.10"S 53°18'59.30"O | 1 | 44 |
| SV 330/12 | N | 26/6 | 29°17'24.20"S 53°15'42.90"O | 4 | 26 |
| SV 334/12 | O | 29/6 | 29°19'21.00"S 53°17'44.10"O | 2 | 40 |
| SV 335/12 | P | 29/6 | 29°19'10.60"S 53°17'43.90"O | 3 | 62 |
| SV 336/12 | Q | 29/6 | 29°17'59.20"S 53°16'55.20"O | 3 | 54 |
| SV 362/12 | R | 03/7 | 29°17'59.20"S 53°16'55.20"O | 1 | 31 |
| SV 446/12 | S | 06/8 | 29°22'50.30"S 53°15'80.50"O | 2 | 18 |
| SV 447/12 | T | 06/8 | 29°19'40.20"S 53°15'57.40"O | 1 | 7 |
| SV 528/12 | U | 23/8 | 29°18'27.30"S 53°15'40.70"O | 2 | 34 |
| SV 529/12 | V | 23/8 | 29°19'49.20"S 53°17'57.40"O | 1 | 25 |

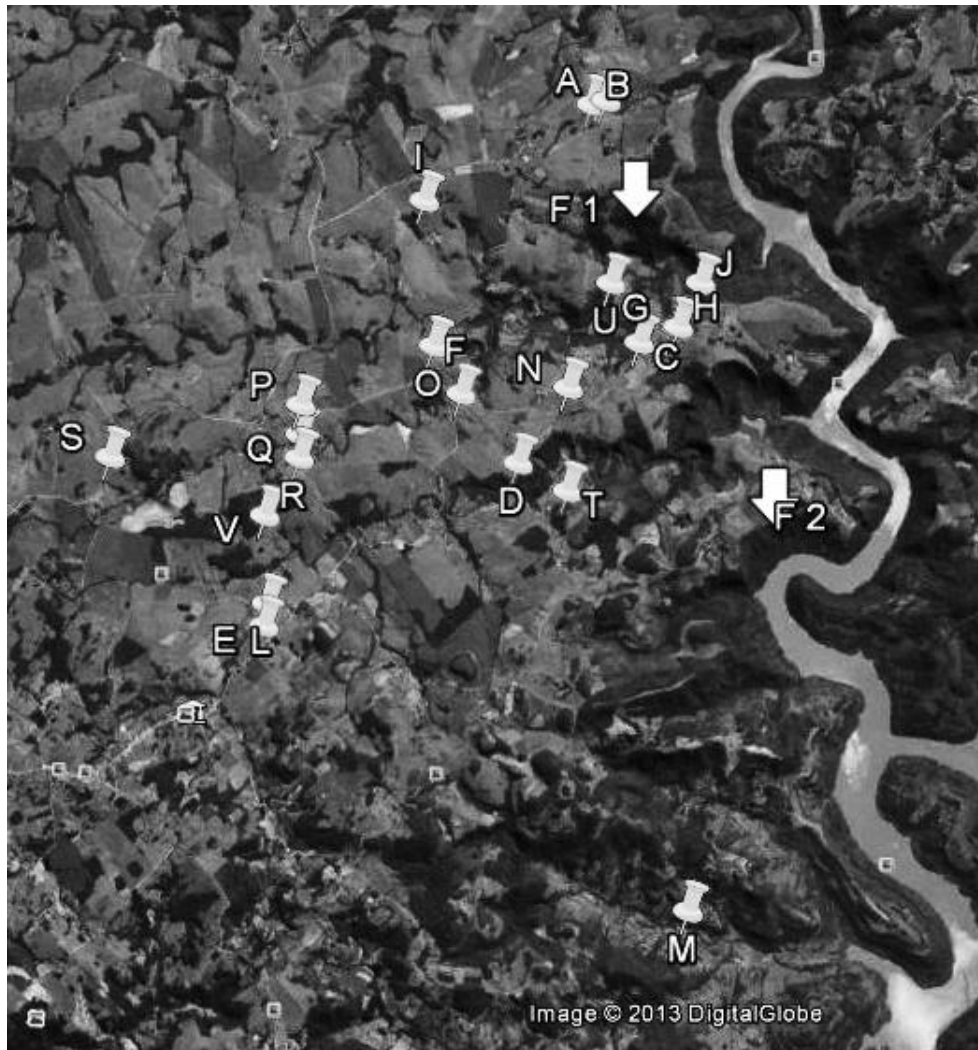


Figura 1 - Mapa obtido pela plotagem dos pontos de localização geográfica das propriedades. Marcadores indicam a localização das propriedades; setas indicam localização das furnas (F1 e F2).

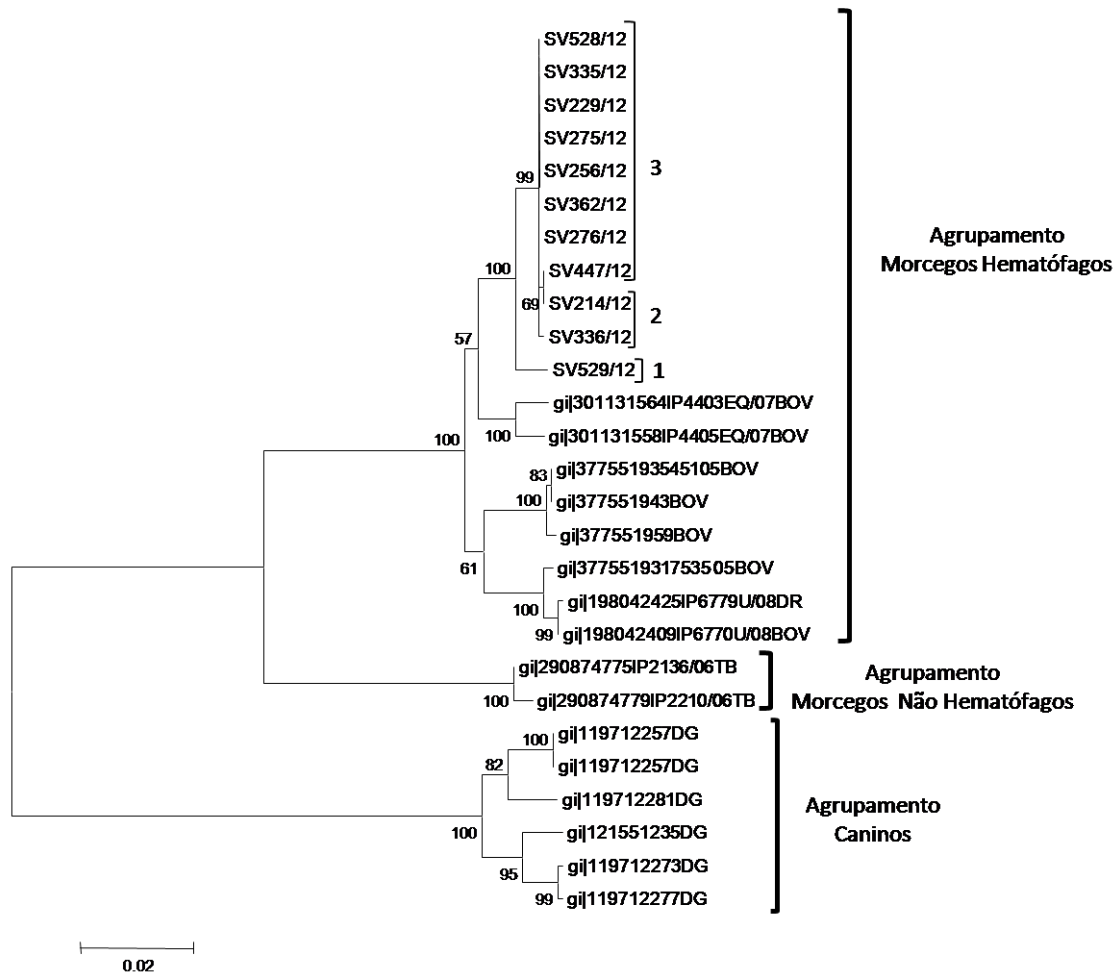


Figura 2 - Árvore filogenética construída pelo método de *maximum likelihood* com o modelo de substituição GTR (G + I) 5.0. A confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1.000 repetições, baseada na sequência de 1218 nucleotídeos da região codificante da nucleoproteína do RabV.

3. CAPÍTULO 2

Virus isolation in cell culture for confirmatory diagnostic of rabies in bovine specimens

Fabio Kanitz, Juliana F. Cargnelutti, Rudi Weiblen, Helena B. C. Rutner Batista, Eduardo F.
Flores

(Artigo submetido a revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* – 2014)

Running headline: Rabies virus isolation in cell culture
Virus isolation in cell culture for confirmatory diagnostic of rabies in bovine specimens¹

Fabio Kanitz¹, Juliana F. Cargnelutti¹, Rudi Weiblen¹, Helena B. C. Rutner Batista², Eduardo F. Flores^{1*}

¹From the Setor de Virologia, Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. ² Pasteur Institute, São Paulo, SP. *Corresponding author:

eduardofurtadoflores@gmail.com

Abstract

This study investigated the suitability of virus isolation (VI) in mouse neuroblastoma cells (N2A) and baby hamster kidney cells (BHK-21) as a confirmatory test for diagnosis of bovine rabies. Thirty six brain samples from rabies suspected cases were initially submitted to fluorescent antibody test (FAT) and mouse inoculation test (MIT) and, subsequently, to three protocols of VI in each cell line: a single 24h or 72h passage, or three 48h passages. The FAT and MIT combined detected 32/36 positive samples, from which MIT detected 32 and FAT 31 (96.8%). The average time required for final MIT results was 12.3 days (8 – 21). VI in BHK-21 cells provided definitive, positive results in 100% of the samples (32/32) in 72h and in 96.9% (31/32) after three 48h passages. VI in N2A cells yielded positive results in 100% (32/32) in 72h and in 30 out of 32 samples (93.7%) after three 48h passages. A single 24h passage in both cell lines performed poorly, detecting less than 40% of the positive samples. Taking together, these results indicate that VI in either cell line, especially in BHK-21 cells that grow faster and are much easier to maintain than N2A cells, does represent an adequate alternative for MIT as a confirmatory test for rabies diagnostic in bovine specimens, yielding reliable results in reduced time.

Key words: rabies, cattle, outbreaks, diagnostic, virus isolation.

Brief communication

Rabies is as an acute and fatal viral disease affecting a wide range of domestic and wild mammals, including man, caused by the *Lyssavirus* rabies virus (RabV) (WHO 2005). Bovine rabies transmitted mainly by the hematophagous bat *Desmodus rotundus* is endemic in most Brazilian states, being responsible for important losses to farmers and livestock industry (Wada et al. 2011; MAPA 2013). In Rio Grande do Sul state (RS), vampire bat-associated bovine rabies (and equine rabies as well) historically occurred endemically in well defined, restricted regions rather than being widely distributed (Kanitz et al. 2014; SEAPA/RS 2014a). Hence, massive vaccination of cattle was not a common practice in most regions. From 2012 to the present, however, an unprecedented rabies outbreak is occurring in RS, crossing boundaries and expanding dramatically over otherwise free areas. To date, this outbreak has produced an estimate of 40-50.000 bovine deaths (SEAPA/RS 2014b). As a consequence, diagnosing bovine rabies has become an overwhelming task for some laboratories, whose diagnostic routine was historically set up for a limited number of cases year round.

Laboratory diagnosis of animal rabies is routinely performed by fluorescent antibody test (FAT) in brain tissue, usually followed by a confirmatory biological assay, e.g. the mouse inoculation test (MIT) (Rudd et al. 1980, OIE 2013). Although MIT is highly sensitive, reliable and easy to perform, the relative long time required for the definitive results (up to 21 – 30 days) and the inherent restrictions and issues concerning animal use have led for its gradual replacement. Hence, virus isolation (VI) in cell culture has been proposed as an alternative to replace MIT as a confirmatory test for rabies. Isolation systems based on mouse neuroblastoma (N2A) and baby hamster kidney (BHK-21) cells have been evaluated regarding to sensitivity to RabV from different animal species (Rudd et al. 1980, 1989, Rudd and Trimarchi 1987, Barrat et al. 1988, Antúnez et al. 2013). Considering the fastidious

growth and the special culture medium requirements for N2A cells, the use of BHK-21 cells for VI as confirmatory rabies diagnosis would compare favorably since BHK-21 cells display a fast growth in vitro and are largely used in many laboratories.

The dramatic increase in submissions for diagnosis of rabies in bovine samples in the last years and the consequent overwhelming demand for diagnosis, in addition to the crescent restrictions for animal use prompted us to evaluate VI in cell culture as a confirmatory test for diagnosis of rabies in bovine specimens.

Bovine specimens (n=36) submitted to the Virology Section of the Federal University of Santa Maria (SV/UFSM) between May, 2013 and January, 2014 were routinely processed for rabies diagnosis, e.g. FAT in brain smears followed by MIT (according to OIE 2013). Subsequently, the samples were submitted to three protocols of virus isolation in N2A cells (passage 12-15, Pasteur Institute, SP) and BHK-21 cells (passage 30-35, ATCC, 334). VI was performed following three protocols: a single 24h passage (T1) or 72h (T2), or three 48h passages (T3), all followed by FAT for RabV antigens at the end of the last passage. At least one RabV positive and one negative brain were included in all steps of VI.

The results of the respective tests and protocols are summarized in Table 1. Out of 36 examined specimens, RabV and/or viral antigens were detected in 32 samples (88.9%). From these, 31 (96.9%) were positive in FAT and 32 (100%) were positive in MIT (confirmatory test). Both tests agreed in 31/32 samples (96.9%) and disagreed in a single sample (SV298/12). Subsequently, this FAT false negative was found positive by VI in both N2A and BHK-21 cells. The average time required to achieve a positive result in MIT was 12.3 days (8 – 21). Four samples were negative in FAT and in the biological assays (MIT and VI). Comparing to MIT, the FAT presented a sensitivity of 96.9%, missing one positive sample (probably contained low viral amounts). Thus, MIT fulfilled its major objective, i.e. to enhance the sensitivity of rabies diagnosis by detecting weakly positive samples that may go

undetected by FAT (Rudd and Trimarchi 1989).

Viral isolation in N2A and BHK-21 cells presented a sensitivity of 100% (32/32) upon a passage of 72h (T2), inclusively detecting a positive sample missed by FAT. In the T3 protocol, however, BHK-21 cells presented a higher sensitivity, detecting 31/32 samples (96.9%) against 30/32 (93.7%) detected in N2A cells. A single 24h passage (T1) followed by FAT performed poorly in either cell line in 13 specimens and was not tested further. Considering the time required for the final result, both T2 (72h) and T3 (3 x 48h) protocols compared positively against MIT (mean time for final diagnosis: 12.3 days). Thus, virus isolation in BHK-21 and N2A cells in a single 72h (T2) passage provided reliable results and were obtained much faster than in MIT.

Our results cells indicate that an adequate incubation time for reaching maximal sensitivity (comparable to that of MIT) would be 3 days (1 passage of 72h). The protocol T3 (three passages of 48h each) failed in detecting one positive sample in BHK-21 cells and two in N2A. Previous studies have suggested a minimal incubation period of three (Antunez et al. 2013) or 4-5 days (Rudd and Trimarchi 1989), while others suggested that a 24h period would be adequate (Bourhy et al. 1989, Chitra et al. 1988, Portnoi et al. 1982). These discrepancies may reflect different VI protocols or cells (cell lines, passage number, etc.), species origin, sample conservation, variable virus titers in specimens, among others (Rudd and Trimarchi 1989). In our conditions, a 24h incubation period would definitively not be adequate since it missed a significant number of positive samples. Since the purpose of a confirmatory test (VI in this case) is to detect FAT false negative results – probably those containing low amounts of virus – a minimum of three days incubation time should be necessary for detecting RabV in bovine brain specimens.

The MIT has long been used as a confirmatory, backup test for FAT and is especially indicated to confirm a FAT negative result in cases of human exposure, in which post-

exposure treatment may be urgently required (Rudd et al. 1980, Rudd and Trimarchi 1989). A major drawback of this test is the long incubation period of many fields RabV isolates (7 to 18 days), which would unacceptably delay the final diagnosis, the medical decision and, thus, compromise the success of the treatment (Rudd et al. 1980). Hence, a confirmatory backup test for FAT yielding a final result in less time would greatly improve rabies diagnosis in field specimens (Rudd et al. 1980). Our results demonstrate that VI in cell cultures may be an alternative for MIT as a confirmatory test for FAT in the diagnosis of rabies in bovine specimens. Using this system, the definitive results were obtained in 72h in 100% of the cases, much faster than in MIT (8-21 days). In addition, the procedure dispenses the use of animals and its implications (cost, ethical issues, animal care etc.).

Previous studies have indicated a higher sensitivity of N2A cells over BHK-21 cells for isolation of street RabV (Ikasaki et al. 1977, Rudd and Trimarchi 1987). Nonetheless, our VI results demonstrate that BHK-21 cells do present an adequate sensitivity – even slightly superior to N2A cells in our conditions – for bovine RabV samples. Thus, in addition to N2A cells, already incorporated into the rabies diagnosis in many laboratories, VI in BHK-21 cell provide an adequate alternative, yielding reliable and faster results, at least for samples of bovine origin. A major advantage of BHK-21 would be its easy handling, manipulation and fast growth, what make it one of the most used cell lines in virology laboratories.

Acknowledgement

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process number 475795/2013-0. J.F. Cargnelutti, E.F. Flores and R. Weiblen are CNPq research fellows.

References

- Antúnez MAR, Girón B, Monsalvez I, Morier L, Acosta G, Tejero Y, Cordero Y and Piedra D 2013. Comparison of a modified shell vial culture procedure with conventional mouse inoculation for rabies virus isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:255-256.
- Barrat J, Barrat M, Picard M and Aubert M 1988. Diagnosis of rabies infection by cell culture. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 11: 207-214.
- Bourhy H, Rollin PE, Vincent J and Sureau P 1989. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J Clin Microbiol* 27:519-523.
- Chitra L, Pandit V and Kalyanaraman VR 1988. Use of murine neuroblastoma culture in rapid diagnosis of rabies. *Indian J Med Res* 87: 113-116.
- Kanitz FA, Kowalski AP, Batista HBCR, Carnieli Junior P, Oliveira RN, Weiblen R and Flores EF 2014. Molecular epidemiology of an outbreak of bovine rabies in central Rio Grande do Sul, Brazil, 2012. *Cien Rural* 44: 834-840.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2013. Available from: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20dos%20herbivoros/Dados%20controle%20raiva%20herb%C3%ADvoros%20Brasil%20ate%202012.pdf
- OIE – Organization for Animal Health 2013. Rabies. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES.pdf
- Portnoi D, Favre S and Sureau P 1982. Use of neuroblastoma cells (MNB) for the isolation of street rabies virus from fields specimens. *Rabies Information Exchange, CDC, Atlanta*. 6:35-

Rudd RJ, Trimarchi CV and Abelseth MK 1980. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus J Clin Microbiol 12:590-593.

Rudd RJ and Trimarchi CV 1987. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. J Clin Microbiol 25: 1456-1458.

Rudd RJ and Trimarchi CV 1989. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. J Clin Microbiol 27: 2522-2528.

SEAPA/RSa – Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Estado do Rio Grande do Sul 2014. Vigilância contra a raiva dos herbívoros. Available from:

http://www.agricultura.rs.gov.br/conteudo/6024/?Vigil%C3%A2ncia_contra_a_Raiva_dos_Herb%C3%ADvoros

SEAPA/RSb. Notícias. Assessoria de Imprensa. **Secretaria da Agricultura Pecuária e**

Agronegócio, Porto Alegre, 31 mar. 2014. Acesso em: 08 jun. 2014. Online. Disponível em:

<http://www.agricultura.rs.gov.br/conteudo/6091/?Produtores_devem_vacinar_rebanho_contra_a_raiva_e_ficar_atentos_para_ref%C3%BAgios_de_morcego%2C_alerta_Secretaria_da_Agricultura>

Wada MY. et al. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, v. 20, n. 4, p.509-518, 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO expert consultation on rabies. First report. (WHO technical report series, N.º 931). 2005; World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Table 1- Results of tests used for diagnosis of rabies in bovine specimens.

| | | VI ¹ in N2A cells/ protocol | | | VI in BHK-21 cells/protocol | | |
|--------------------|------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------------------|----------|-----------|
| FAT ² | MIT ³ | T1 ⁴ | T2 ⁵ | T3 ⁶ | T1 | T2 | T3 |
| | | (24h) | (1x 72h) | (3 x 48h) | (24h) | (1x 72h) | (3 x 48h) |
| 31/32 ⁷ | 32/32 | 03/13 | 32/32 | 30/32 | 02/13 | 32/32 | 31/32 |

¹ Virus isolation ²Fluorescent antibody test; ³Mouse inoculation test; ⁴Protocol 1: a single passage of virus in cells for 24h; ⁵Protocol 2: a single passage of virus in cells for 72h; ⁶Protocol 3: three virus passages in cells of 48h each; ⁷Positive samples in the performed test/total tested samples.

4. CONCLUSÕES

Os resultados dos presentes trabalhos permitem concluir que:

- Três sublinhagens do RabV de *Desmodus rotundus* circularam nos surtos ocorridos na região central do RS, em 2012;

- O isolamento do RabV tanto em BHK-21 quanto em N2A representa uma boa alternativa para a MIT como um teste confirmatório para o diagnóstico da raiva em amostras de bovinos, produzindo resultados confiáveis em tempo reduzido.

5. REFERÊNCIAS

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. vol.II. 5 ed. Brasília: FUNASA, 2002. 842 p.

FEKADU, M. Canine rabies. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2nd ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 367-378.

JACKSON, A. C. Pathogenesis. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, San Diego: Academic Press, 2002. p. 245-282.

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed., **Laboratory Techniques in Rabies**, 4th ed., Geneva: World Health Organization, 1996, p.03-08

KING, A. A.; TURNER, G. S. Rabies: a review. **J. Comp. Path.**, v. 108, p. 1-39, 1993.

KOPROWSKI, H. The virus - Overview. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2nd ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 27-29.

LENNETTE, E. H.; EMMONS, R. W. The laboratory diagnosis of rabies: Review and prospective. In: NAGANO, Y.; DAVENPORT, F. M., eds., **Rabies**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1971, p.77-94.

MAPA 2009. Controle da raiva dos herbívoros no Brasil. Manual Técnico. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20dos%20herbivoros/manual%20tecnico%20para%20controle%20da%20raiva.pdf Disponível em: 21.03.2014.

MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology Fields**, 4th ed. Florida: William and Wilkins, 2001, p. 1245-1268.

NATHANSON, N.; GONZALES, F. Immune response to Rabies Virus. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2nd ed., Florida: CRC Press, 1991, p. 145-161.

OIE. Rabies. World Organisation for Animal Health. Technical Disease Card, 2009. Disponível em:

[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications %26 Documentation/docs/pdf/rabies.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications%26Documentation/docs/pdf/rabies.pdf) . Disponível em: 21.03.2014.

RUPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 327-343, jun. 2002.

SCHNEIDER, M.C. et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America?. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v.25, p.260-269, 2009. Disponível em: www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-5-32.pdf . Disponível em: 21.03.2014.

TRIMARCHI, C. V.; DEBBIE, J. G. The fluorescent antibody in rabies. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2nd ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 219-233.

WHITFIELD, S. G. et al. A comparative study of fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 95, p. 145-151, 2001.

WHO. World Health Organization. Rabies. Epidemiology. Disponível em: <http://www.who.int> . Acesso em: 14 jul. 2014a.

WHO. World Health Organization 2005. WHO Technical Report Series 931. **Expert Consultation on rabies**. First Report. Disponível em: <http://www.who.int> . Acesso em: 02 jul. 2014b.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 49-63, 2005.

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2nd ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 32-67.