

ANGÉLICA CRISTINE DE ALMEIDA CAMPOS

ESTUDO GENÉTICO DA VARIANTE DO VÍRUS DA
RAIVA MANTIDA POR POPULAÇÕES DO MORCEGO
HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Dr^a Silvana Regina Favoretto Lazarini

São Paulo
2011

RESUMO

Campos ACA. Estudo genético da variante do vírus da raiva mantida por populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) mostram que a raiva é um problema de saúde pública podendo acarretar sérios prejuízos ambientais e econômicos, a despeito da existência de vacinas eficazes de uso humano e veterinário. Segundo seu último informe, estima-se que no mundo em torno de 55.000 pessoas por ano morrem de raiva. O cão permanece como principal transmissor da raiva para o homem e também como principal vítima da doença. Nos países que conseguiram controlar a raiva em animais domésticos, o vírus se mantém circulante na natureza por meio dos animais silvestres, sendo os morcegos apontados como a segunda espécie transmissora da raiva a humanos. Os *lyssavirus* têm sido detectados em morcegos, em diversos continentes, sendo identificados como transmissor em dez das onze espécies de *lyssavirus*. Fósseis de morcego mostram sua presença há 50 milhões de anos. Mas somente em 1911, Carini relacionou pela primeira vez a raiva aos morcegos, levantando a hipótese destes serem os transmissores da doença a outros animais. Há registros de que o vírus da raiva foi isolado em pelo menos 41 das 167 espécies de morcegos brasileiras, sendo que a maioria dessas espécies está relacionada a atividades humanas com a presença destes animais próximos ao local de trabalho e moradia das pessoas. Os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são encontrados do norte do México até a costa norte do Chile, região central da Argentina e costa do Uruguai e com exceção do Chile. Esta espécie de morcego tem sido apontada como reservatório natural do vírus da raiva nesta região. Alguns pesquisadores observaram que a raiva em morcegos não hematófagos precede a raiva bovina e em animais de estimação, sugerindo que os morcegos não hematófagos podem ser o elo entre a raiva silvestre e a raiva urbana e o fato de se detectar a variante mantida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* em cães e gatos mostra que o papel deste morcego no ciclo da raiva não está limitado à raiva silvestre. As características dos *lyssavirus* adaptados a morcegos têm mostrado diferenças quando comparadas à raiva relacionada aos carnívoros, confirmando a necessidade do desenvolvimento de metodologias que permitam estudos complementares mais precisos a respeito da biologia e epidemiologia da raiva em quirópteros. A escassez de dados na literatura, até o momento, a respeito do genoma completo da variante

do vírus da raiva mantida por populações de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, deixa uma lacuna no entendimento da epidemiologia molecular deste vírus. A importância epidemiológica desta espécie na transmissão da raiva é inquestionável. Neste estudo foi sequenciado e analisado, o genoma da variante do vírus da raiva mantido por populações de morcego hematófago *Desmodus rotundus* isolado de um morcego hematófago *Desmodus rotundus*. A amostra, procedente de área endêmica no Estado de São Paulo, foi filogeneticamente comparada com o genoma da amostra padrão para a espécie viral 1 – *Rabies virus* e outras amostras pertencentes ao ciclo aéreo ou terrestre de transmissão, disponíveis no *GenBank*, identificando possíveis padrões de diferenciação, próprios do ciclo aéreo, e em alguns casos relacionados somente à variante estudada.

Palavras chave: Vírus da raiva. *Desmodus rotundus*. Sequenciamento. Genoma viral. Estudo genético.

ABSTRACT

Campos ACA. Genetic study from rabies virus variant maintained by hematophagous bats *Desmodus rotundus* population [Ph. D. Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Data from the World Health Organization (WHO) show that rabies is a public health problem which can cause serious environmental and economic damage, despite the existence of effective vaccines for human and veterinary use. According to WHO latest report, estimated that worldwide around 55,000 people per year died of rabies. The dog remains the main transmitter of rabies to humans as well as the main victim of the disease. In countries that were successful in controlling rabies in domestic animals, the virus is still circulating in nature by wild animals and the bats are seen as the second species transmitting rabies to humans.

The lyssavirus have been detected in bats in several continents and is identified as a transmitter in ten of eleven species of lyssavirus. Bat fossils show their presence for 50 million years. But only in 1911, in the first time Carini related to rabies at bats, raising the possibility of these being the transmitters of the disease to other animals. Reports show that the rabies virus was isolated in at least 41 of the 167 species of bats in Brazil, with the majority of these species is related to human activities with the animals living near the local job and houses of people. The vampire bat *Desmodus rotundus* is found from northern Mexico to northern Chile coast, central coast of Argentina and Uruguay and with the exception of Chile. This bat species has been identified as a natural reservoir of the rabies virus in this region. Some researchers observed that rabies into non-hematophagous bats precedes the bovine rabies and in pets, suggesting that the non-hematophagous bats may be the link between wildlife rabies and urban rabies and the fact that detect the variant maintained by vampire bats *Desmodus rotundus* in dogs and cats shows that the role of bat rabies in the cycle is not limited to wildlife rabies. The characteristics of lyssavirus bat adapted have been shown differences when compared to rabies related to the carnivores, confirming the need to develop methods that enable more accurate follow-up studies about the biology and epidemiology of rabies in bats. The paucity of data in the literature to date about the complete genome of the rabies virus variant maintained by populations of vampire bats *Desmodus rotundus* leaves a gap in understanding the molecular epidemiology of this virus and the epidemiological importance of this species in the transmission of rabies virus is unquestionable. In this study we sequenced and analyzed the genome of the rabies virus

variant maintained by populations of bat *Desmodus rotundus* isolated from a bat *Desmodus rotundus*. The sample, coming from an endemic area in São Paulo, was phylogenetically compared with the genome of the standard sample for species 1 – *Rabies virus* and other samples belonging to the Terrestrial and Aerial cycles of transmission, available in GenBank, to identify possible patterns of differentiating themselves Aerial cycle and in some cases linked only to variant studied.

Key words: Rabies virus. *Desmodus rotundus*. Sequencing. Viral genome. Genetic study.

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença letal conhecida desde a antiguidade, com relatos no Código de Eshnunna cerca de 1930 aC e nos escritos por Aristóteles e Hipócrates 500 aC. Democritus, também em 500 aC, fez a primeira descrição de um cão raivoso e Celsus, Século I, descreveu a Raiva em humanos. No Século XVIII a raiva foi descrita em diferentes partes da Europa, em 1703 foi descrito o primeiro relato de raiva no México e em 1803 a doença foi relatada pela primeira vez na América do Sul em humanos no Peru. Em 1804, Zinke comprovou que a saliva do cão doente era responsável pela transmissão da raiva e Pasteur com observações e experimentos desenvolveu a primeira vacina, produzida em cérebro de coelhos, a partir de passagens sucessivas do material obtido de animais contaminados.

As citações mais antigas que envolvem morcegos hematófagos foram descritas nas Américas pelos primeiros colonizadores espanhóis que chegaram ao novo mundo e relataram grandes refúgios e agressões destes morcegos a animais e homens, com registros de óbitos de soldados, como no Panamá em 1514, acontecimentos estes que certamente já ocorriam antes da colonização, mas permaneciam restritos a fauna nativa existente.

A raiva é transmitida a partir de contato direto com um animal infectado por meio de mordedura, lambedura, arranhadura, ou ainda pela formação de aerossóis em cavernas onde exista um grande número de morcegos contaminados com alta concentração de vírus. Além do cão e do morcego já foram relatadas transmissão por via oral em raposas e por transplantes de órgãos sólidos entre seres humanos.

Existem duas formas clássicas da doença, a raiva paralítica, que em virtude de ser observada predominantemente em bovinos vem sendo associada à transmissão por morcegos hematófagos e a raiva furiosa, evidente em carnívoros, geralmente relacionada à transmissão por cães. O período de incubação, ou período prodromico, pode variar de 15 dias a anos, sendo observado no homem em média de 45 dias; com o aparecimento dos sintomas a raiva tem sido fatal com excessão de 2 casos humanos um descrito nos Estados Unidos em 2004 e outro no Brasil em 2009.

A raiva continua amplamente distribuída no mundo, com raras exceções de alguns países ou regiões, apesar da quantidade de recursos destinados ao estudo, prevenção e controle da doença. Mesmo em países onde uma estrutura sanitária desenvolvida, como no Brasil onde a campanha de vacinação em massa para cães e gatos, iniciada em 1981, contribuiu de forma decisiva para o controle da raiva no país, o controle da raiva mantida e transmitida por populações de cães e de animais silvestres ainda é um problema de saúde

pública.

Depois de séculos de estudos, o vírus da raiva é o mais conhecido dos *Lyssavirus*. Mundialmente, espécies de animais silvestres que servem como reservatórios e agem como transmissores garantem a manutenção da raiva.

Ainda hoje, 126 anos depois da vacina produzida e testada por Pasteur, a raiva continua a vitimar humanos, animais de companhia e rebanhos além de animais silvestres em todo o mundo, representando um grande problema de saúde pública, tanto para países em desenvolvimento, como para os que detêm recursos e tecnologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O vírus da Raiva pertence à família *Rhabdoviridae* que, juntamente com as famílias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, e *Bornaviridae* constituem uma “superfamília” da ordem *Mononegavirales*, na qual todos os membros são constituídos por uma molécula única de RNA (ssRNA) não segmentado, de polaridade negativa [Mono, do grego *Monos* “único, simples”, *Nega* “de RNA polaridade negativa”, *Virales*, do latim “vírus”] (Fauquet et al., 2004).

A família *Rhabdoviridae* está subdividida em dois sub-grupos de vírus de plantas, um grupo de vírus de peixe e três gêneros de vírus de mamíferos: *Ephemerovirus*, *Vesiculovirus* cujo protótipo é o vírus da estomatite vesicular-VSV e os *Lyssavirus* que têm como protótipo o vírus da raiva.

A partir do final de 2009 foram definidas, pelo Comitê de Taxonomia Viral – ICTV [do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*], 11 espécies virais para o gênero *Lyssavirus* (ICTV, 2009). As quatro primeiras espécies (anteriormente descritas como genótipos) coincidem com os sorotipos 1 a 4:

espécie viral Raiva - *Rabies virus* - mundialmente distribuída (Figura 1), compreende as amostras clássicas de vírus da raiva (RABV): as selvagens isoladas de animais e as amostras chamadas fixas ou vacinais (Tordo, 1996; Wunner, 2002).

espécie viral Lagos Bat - *Lagos bat virus* (LBV) - corresponde a amostra isolada pela primeira vez de um morcego frugívoro (*Eidolon helvum*) na Nigéria em 1956 (Boulger e Porterfield, 1958; Kuzmin et al., 2003) e de outro morcego (*Micropteropus pusillus*) na África Central em 1974 (King e Turner, 1993).

espécie viral Mokola - *Mokola virus* (MOKV) - compreende a amostra isolada na África, de roedores e mussaranhos (*Crocidura sp.*), de cães, de crianças na Nigéria em 1968 e 1971 (Shope et al., 1970; Kemp et al., 1972; Familusi et al., 1972; Kuzmin et al., 2003) e de gatos no Zimbábue (Von Teichman, 1998; Kuzmin et al., 2003).

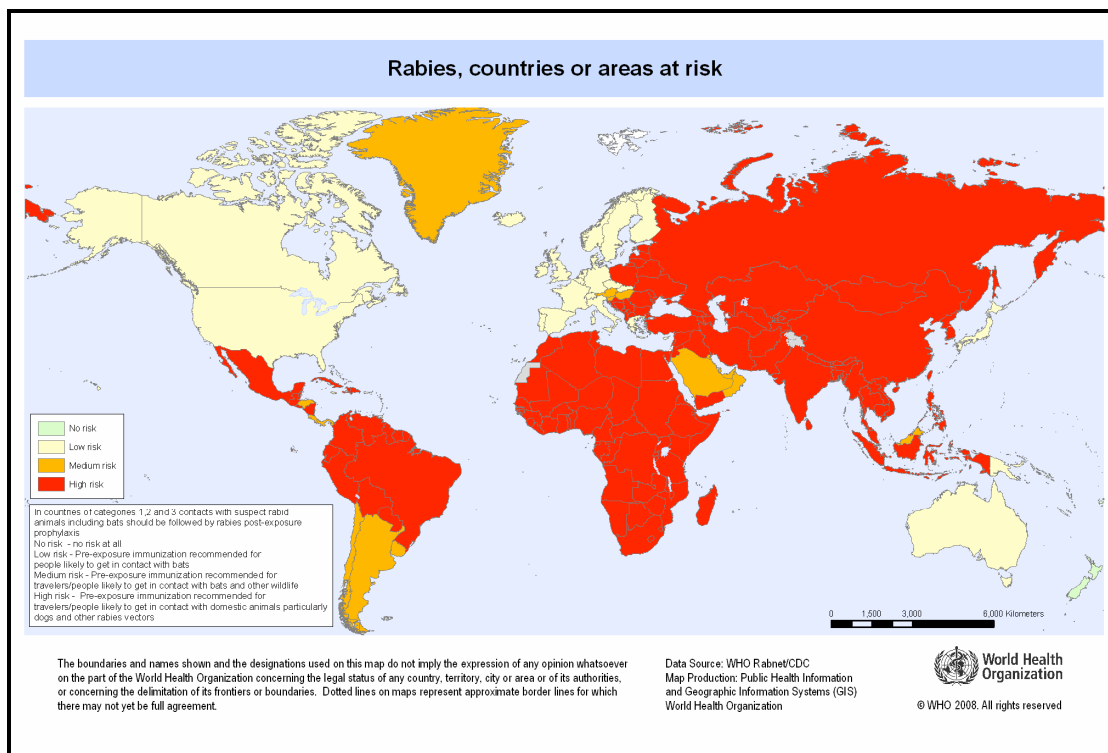


Figura 1. Mapa das áreas de risco para o vírus da raiva no mundo.

Fonte: World Health Organization. Department of Neglected Tropical Diseases (NTD), Neglected Zoonotic Diseases (NZD), 2009.

espécie viral Duvenhage - *Duvenhage virus* (DUVV) - corresponde ao isolado originariamente de um homem que morreu após ser mordido por um morcego na África em 1970 (Meredith et al., 1971) e posteriormente, em 1981, de um morcego *Miniopterus sp.* na África (Kuzmin et al., 2003).

O vírus *European Bat Lyssavirus* (EBLV) primeiro foi identificado como parte do antigo genótipo 4 DUVV (Schneider et al., 1985), entretanto verificou-se a existência de diferenças antigênicas que o classificaram como o antigo genótipo 5 (Dietzschold et al., 1988). Posteriormente foi subdividido em dois genótipos EBLV1 e EBLV2 (Bourhy et al., 1993) e atualmente em duas espécies virais *European bat lyssavirus 1*, *European bat lyssavirus 2* (ICTV, 2009):

espécie viral Lissavírus do Morcego Europeu 1 - *European bat lyssavirus 1* (EBLV1) - identificado em morcego *Eptesicus serotinus* na Alemanha em 1968 (Schneider et al., 1985; Dietzschold et al., 1988; Schneider e Cox, 1994), na Polônia em 1985 (Lafon et al., 1986), na Dinamarca, Holanda e Espanha em 1987 e na França em 1989 (Bourhy et

al., 1992). Alguns isolados do EBLV1 foram obtidos de morcegos na Ucrânia e de um caso humano relacionado a morcego na Rússia em 1985 (Selimov et al., 1989, 1991; Kuzmin et al., 2003).

espécie viral Lissavírus do Morcego Europeu 2 - *European bat lyssavirus 2* (EBLV2) - isolado de um humano na Finlândia em 1985 (Bourhy et al., 1993; Tordo, 1996) e em morcegos na Holanda, Suíça e Reino Unido, sendo mantido por morcegos insetívoros do gênero *Myotis* (King et al., 1994; Kuzmin et al., 2003).

espécie viral Lissavírus do Morcego Australiano - *Australian bat lyssavirus* (ABLV) - responsável por casos humanos em 1996, foi também isolado de cinco espécies de morcegos raposa voadora e uma espécie de morcego insetívoro no continente Australiano (Gould et al., 1998; Fraser et al., 1996; Kuzmin et al., 2003).

Quatro novas espécies virais foram identificadas na Ásia Central, leste da Sibéria e região caucasiana (ICTV, 2009):

espécie viral Aravan - *Aravan virus* (ARAV) - identificada em 1991 na espécie de morcego *Myotis blythi* na região do Quirguistão na Ásia Central (Arai et al., 2003; Kuzmin et al., 2003).

espécie viral Khujand - *Khujand virus* (KHUV) - identificada em 2001 na espécie de morcego *Myotis daubentoni* no Tajiquistão (Kuzmin et al., 2003).

espécie viral Irkut - *Irkut virus* (IRKV) - identificada em 2002 na espécie de morcego *Murina leucogaster* na Província de Irkustk - Rússia (Kuzmin et al., 2005).

espécie viral do Morcego Caucasiano do Oeste - *West Caucasian bat virus* (WCBV) - identificada em 2002 na espécie de morcego *Miniopterus schreibersii* na região de Krasnodar na Rússia (Kuzmin et al., 2005).

Kuzmin et al. (2010) identificaram o *Shimoni Bat Lyssavirus* em morcegos africanos e o indicam como a décima segunda espécie viral.

A primeira vacina foi produzida a partir de passagens sucessivas em cérebro de coelhos e administrada em 1885 por Louis Pasteur (Pasteur et al., 1881; 1882; Pasteur, 1885). Este tipo de vacina, assim como várias outras que sucederam, também produzidas a partir de tecido nervoso, causava acidentes neurológicos em virtude da presença de mielina no cérebro de animais adultos (Horack, 1939; Sellers, 1947). Somente em Fuenzalida e Palácios (1955)

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

