

Secretaria de Estado da Saúde

Instituto Pasteur

Células HEK-293: uma alternativa para
isolamento viral no diagnóstico da raiva

Raphaela Mello Zamudio

Trabalho de conclusão de curso de
especialização apresentado ao
Instituto Pasteur, como requisito
parcial para a obtenção do título de
Especialista em Vigilância Laboratorial
da Raiva.

Orientadora: Dr^a Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista

São Paulo
2020

Células HEK-293: uma alternativa para isolamento viral no diagnóstico da raiva

Raphaela Mello Zamudio

Trabalho de conclusão de curso de
especialização apresentado ao
Instituto Pasteur, como requisito
parcial para a obtenção do título de
Especialista em Vigilância Laboratorial
da Raiva

Orientadora: Dr^a Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista

São Paulo
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca do Instituto Pasteur – SES/SP

Z23 Zamudio, Raphaela Mello

Células HEK-293: uma alternativa para isolamento viral no diagnóstico da raiva. / Raphaela Mello Zamudio. – São Paulo, 2020.
38 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Instituto Pasteur, São Paulo, 2020.

Programa de Especialização em Diagnóstico Laboratorial da Raiva.

Orientação: Dra. Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista

1. Raiva/diagnóstico. 2. Raiva/isolamento & purificação. 3. Células HEK-293. 4. Técnicas de Cultura de Células. 5. Adaptação Celular.
I. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Instituto Pasteur.
II. Título.

NLM WC550

À minha avó Benedicta (in memoriam), que se preocupou comigo até o último instante de sua vida. Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Dr^a Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista, pelo apoio, paciência e ensinamentos fundamentais para a minha formação profissional e pessoal.

Ao Instituto Pasteur e seus funcionários, que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

À Camila Mosca, Ana Lee Francisco e Jaíne Garcia, não só pelo auxílio fundamental no desenvolvimento desse projeto, mas também pelo companheirismo e palavras de encorajamento. A vocês minha eterna gratidão.

À Tamires Santos, que nunca se negou a me ajudar em qualquer situação, tendo importância crucial para a conclusão desse trabalho. Muito obrigada de coração.

Aos meus amigos de curso, especialmente: Nathalia Salivo, Mariana Cardoso e Vitória Bueno. Obrigada por deixarem essa caminhada mais leve.

À Eliana de Almeida, bióloga do Instituto Pasteur, pela grande amizade, troca de conhecimentos e companhia durante essa etapa.

A todos os alunos de investigação científica, especialmente Débora Pedrozo e Filipe Gabriel, pelo companheirismo e amizade. Muito obrigada!

Agradeço também a todos os pesquisadores do Instituto Pasteur, pelos conselhos e disponibilidade de ajudar sempre.

Aos meus pais, Walter e Eliza Zamudio, os maiores incentivadores dos meus sonhos.

À minha irmã gêmea Marcela Zamudio e amiga Thaíse da Silva, sempre me apoiando diariamente tanto em momentos difíceis, quanto felizes. Obrigada pela irmandade sempre.

À minha irmã de alma, Giovana do Valle, que sempre me apoiou mesmo nas horas mais difíceis com sua amizade incondicional.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa (1956)

Zamudio, R.M. **Células HEK-293: uma alternativa para isolamento e adaptação de amostras de vírus da raiva no Instituto Pasteur.** São Paulo, 2020.

RESUMO

A raiva é uma zoonose que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC) de todos os mamíferos, causada pelo *Rabies lyssavirus* (RABV) esta doença é de grande importância para a saúde pública mundial. A prova padrão ouro utilizada para a identificação do RABV é a Imunofluorescência Direta (IFD), recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O isolamento viral em cultivo celular (IVCC) pode ser utilizado como teste complementar, a fim de confirmar a detecção do antígeno viral identificado pela IFD. No Brasil, o Instituto Pasteur é o laboratório Referência Nacional para o diagnóstico da raiva, este realiza a técnica de IVCC em células neuroblastoma de murino (Neuro-2a) desde 2004. O RABV, porém, é capaz de infectar diversas linhagens celulares além das células Neuro-2a, incluindo células renais de filhotes de hamster (*Baby Hamster Kidney* - BHK-21), células embrionárias de pintinhos (*Chicken Embryo Related* - CER) e células embrionárias de rim humano (*Human Embryonic Kidney cells*- HEK-293). As células Neuro-2a e BHK-21 são as mais utilizadas respectivamente para IVCC e testes sorológicos ou produção de vírus. As células HEK-293, no entanto, podem ser uma opção nesse contexto, pela presença de proteínas neuronais, como receptores muscarínicos de acetilcolina. Considerando a referência nacional atribuída ao Instituto Pasteur e as características das células HEK-293, este trabalho avaliou a capacidade de adaptação de amostras de RABV nestas células e ainda sua sensibilidade para o IVCC. Para o protocolo de adaptação de vírus, seis amostras de RABV com linhagens genéticas de morcegos não hematófagos foram inoculadas em células HEK-293 em placas de 6 orifícios incubadas por 72 horas à 37°C e 5% de CO₂, descongeladas e congeladas 3 vezes e então passadas novamente em células HEK-293 até completar 10 passagens. Já para o IVCC foi realizada a adição de suspensões cerebrais de 20 amostras de diferentes animais em placa de 96 poços com célula HEK-293 com posterior incubação à 5% de CO₂ e 37°C em diferentes tempos (24, 48 e 72h), adotando duas condições diferentes: com adsorção de 2 horas e sem adsorção. Ambos os protocolos foram fixados e revelados com anticorpo policlonal antívirus da raiva conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e lidos em microscópio de fluorescência. Tanto para a adaptação de vírus como para o IVCC, foi realizada a comparação com os resultados obtidos em células Neuro-2a. Os resultados mostram que para adaptação de amostras de RABV provenientes de morcegos não hematófagos, a linhagem celular Neuro-2a foi mais eficaz. Já em relação ao IVCC com célula HEK-293, observou-se resultados satisfatórios comparado ao IVCC em células Neuro-2a. Assim, esses resultados sugerem que a linhagem celular HEK-293 é uma potencial alternativa para uso no âmbito laboratorial da raiva.

Palavras-chave: Raiva, Células HEK-293, Isolamento Viral em Cultura de Células Adaptação Celular, Instituto Pasteur.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura do vírus da raiva. 14
- Figura 2** – Esquema detalhado do Protocolos de dez passagens consecutivas para a linhagem celular HEK-293, ressaltando o nome que cada passagem recebeu..... 25
- Figura 3** – Esquema detalhado do Protocolo de dez passagens consecutivas para a linhagem celular Neuro-2a, ressaltando o nome que cada passagem recebeu. 26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Amostras positivas e negativas para raiva, diagnóstico realizado pelas técnicas de IFD (Imunofluorescencia Direta) e IVCC (Isolamento Viral em Cultivo de Células) em célula Neuro-2a. As amostras foram cedidas pelo Instituto Pasteur de São Paulo e a descrição inclui ano e espécie das quais foram coletadas..	20
Quadro 2 – Ciclos utilizados na reação de PCR.	23
Quadro 3 – Resultado da Imunofluorescencia Direta (IFD) das 10 passagens consecutivas das seis amostras de vírus da raiva (RABV) em linhagem celular HEK-293 (<i>Human Embryonic Kidney cells</i>).	29
Quadro 4 – Resultado da Imunofluorescencia Direta (IFD) das 10 passagens consecutivas das seis amostras de vírus da raiva (RABV) em linhagem celular Neuro-2a (neuroblastoma de murino)..	30
Quadro 5 – Resultados obtidos no isolamento viral em cultivo de células com o protocolo de adsorção e sem adsorção, utilizando-se três tempos de incubação distintos na linhagem celular HEK-293.	31
Quadro 6 – Resultado da IFD das 10 passagens consecutivas das seis amostras em linhagem celular Neuro-2a.	32
Quadro 7 – Comparação dos resultados obtidos no isolamento viral em linhagem celular HEK-293 com os resultados obtidos pelo Instituto Pasteur através das técnicas de IFD e IVCC em Neuro-2a.	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número de amostras positivas de acordo com o protocolo de adsorção viral e tempo de incubação.	32
--	----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
a.C	Antes de Cristo
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney</i>
cDNA	DNA complementar
células/mL	Células por mililitro
CER	<i>Chicken embryo related</i>
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
E-MEM	Meio essencial mínimo eagle
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEK-293	<i>Human embryonic kidney cells</i>
IFD	Imunofluorescência direta
IP	Instituto Pasteur
MIT	<i>Mouse intracerebral test</i> (Isolamento viral em camundongos)
mL	Mililitro
Neuro-2a	Célula neuroblastoma de murino
°C	Graus Celsius
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)

PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia pela polimerase)
PV	<i>Pasteur Virus</i>
RABV	<i>Rabies lyssavirus</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RTCIT	<i>Rabies Tissue Culture Infection Test</i> (Isolamento viral em cultivo celular)
RT	<i>Reverse transcription</i> (Transcrição reversa)
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
μL	Microlitro

SUMÁRIO

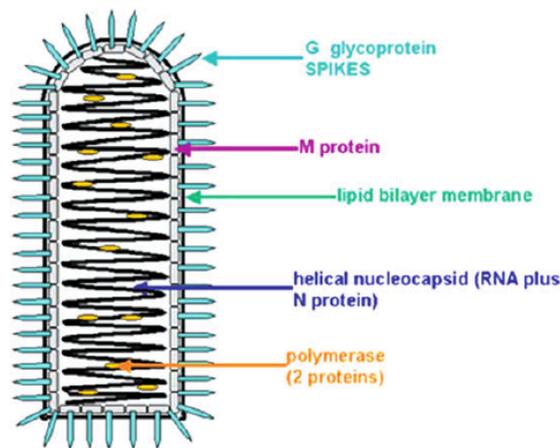
1. Introdução.....	13
2. Objetivos	18
2.a Objetivo Geral	18
2.b Objetivos Específicos	18
3. Material e Métodos	18
3.a Células.....	18
3.b Amostras.....	19
3.c Preparo dos Inóculos.....	21
3.d Inoculação em Camundongos	21
3.e Imunofluorescência Direta (IFD)	21
3.f Caracterização genética	22
i. Extração de RNA	22
ii. Transcrição Reversa (RT).....	22
iii. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	23
iv. Sequenciamento genético.....	24
3.g Adaptação do RABV em células HEK-293	24
3.h Isolamento viral em cultivo celular do RABV em células HEK-293.....	27
4. Resultados	28
5. Discussão	33
6. Conclusão	35
7. Referências	36

1. Introdução

A raiva é reconhecida como uma das doenças infecciosas mais antigas, marcada por uma história rica e fantasiosa, relacionada com a ascensão da civilização, crescimento das cidades e domesticação dos animais (KENNETH, 1993). A sua história pode ser traçada há mais de quatro mil anos. A primeira descrição documentada da enfermidade ocorreu no Códice da Babilônia, no século 23 a.C. (THÉODORIDES, 1986). Posteriormente, na Grécia, o filósofo Demócrito registrou um caso de raiva canina no ano 500 a.C, e no ano 400 a.C o filósofo Aristóteles relacionou a mordida do cão raivoso como principal forma de transmissão da raiva. Atualmente a raiva ocorre em todos os continentes, com exceção da Antártica e Austrália sendo que mais de 95% das mortes humanas acontece na Ásia e África (JACKSON; WUNNER, 2007; GARG, 2014).

Esta zoonose viral afeta o sistema nervoso central (SNC) de humanos e animais de sangue quente, sendo causada pelo vírus da raiva, formalmente, *Rabies lyssavirus* (RABV). O RABV apresenta genoma de RNA sentido negativo, pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. Tal gênero é composto por dezesseis espécies, definidas com base na sua similaridade genética. As dezesseis espécies do gênero incluem, além do RABV: *Aravan lyssavirus* (ARAV); *Australian bat lyssavirus* (ABLV); *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV); *Duvenhage lyssavirus* (DUVV); *European bat 1 lyssavirus* (EBLV-1); *European bat 2 lyssavirus* (EBLV-2); *Gannoruwa bat lyssavirus* (GBLV); *Ikoma lyssavirus* (IKOV); *Irkut lyssavirus* (IRKV); *Khujand lyssavirus* (KHUV); *Lagos bat lyssavirus* (LBV); *Lleida bat lyssavirus* (LLEBV); *Mokola lyssavirus* (MOKV); *Shimoni bat lyssavirus* (SHIBV) e *West Caucasian bat lyssavirus* (WCBV) (ICTV, 2019). Morfologicamente o RABV possui formato de projétil com um nucleocapsídeo helicoidal rodeado por uma membrana proteica (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura do vírus da raiva.



Fonte: GARG, 2014.

A organização e replicação do RABV ocorre por cinco genes monocistrômicos relacionados com cinco proteínas virais. O gene *N* codifica a nucleoproteína que encapsula o RNA viral; o gene *P* codifica a fosfoproteína, importante na transcrição e tradução viral; já a proteína de matriz é codificada pelo gene *M*; enquanto o gene *G* produz a glicoproteína, porção ligada à membrana que medeia a recepção e a fusão nas superfícies celulares; e o gene *L* codifica a polimerase para a síntese de RNA (WUNNER et al., 1988).

O RABV pode ser classificado em variantes antigênicas ou linhagens genéticas, associadas a adaptação do vírus a um determinado reservatório ou hospedeiro natural. Inicialmente as diferenças entre as amostras do RABV foram identificadas por sorotipagem e posteriormente as amostras passaram a ser caracterizadas antigenicamente, utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais direcionados contra a nucleoproteína viral (WIKTOR; KOPROWSKI, 1980). No Brasil existem até o momento 5 variantes antigênicas identificadas: variante 2, isolada de cães domésticos; variante 3, identificada em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*; variante 4, relacionada a morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*; variante 5, isolada de morcegos hematófagos da Venezuela e variante 6, identificada em morcegos insetívoros *Lasiurus cinereus* (FAVORETTO et al., 2002). Atualmente esse método vem sendo substituído pela análise filogenética, permitindo a identificação de linhagens genéticas (EL-THOLOTH; EL-BESKAWY; HAMED, 2015). No Brasil, além das variações identificadas por caracterização antigênica, é possível

a identificação de uma linhagem específica de RABV isolada de saguis (*Callithrix jacchus*), bem como uma linhagem genética do RABV distinta de canídeos silvestres (*Cerdocyon thous*) e sete linhagens diferentes do RABV isoladas de morcegos insetívoros (FAVORETTO et al., 2001; CARNIELI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

Para a saúde pública, merecem destaque os cães, pois estes são os principais transmissores da raiva para os seres humanos, sendo responsáveis pela maioria dos casos da doença na Ásia, África e América Latina. O decréscimo da raiva canina, evidenciado em diversos países, alcançado pela implantação eficaz de programas de controle, permitiu a visibilidade da raiva transmitida por mamíferos silvestres, incluindo morcegos (PLOTKIN, 2000).

Os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são os principais reservatórios do ciclo aéreo silvestre da raiva e responsáveis pela transmissão do vírus aos herbívoros. A identificação do RABV em morcegos não hematófagos, porém, tem sido crescente, sendo que até o momento não existem dados suficientes para comprovar se este aumento é reflexo da maior notificação e vigilância ou um aumento real da raiva nestes animais. Na América do Sul, entre os morcegos não hematófagos, os gêneros/espécies com maior relevância epidemiológica para a raiva são: *Lasiurus sp*, *Artibeus sp*, *Tadarida brasiliensis* e *Myotis sp* (KOTAIT, 2007). No Brasil, já foram identificados 68 gêneros e 180 espécies de morcegos, dentre estes, o RABV já foi detectado em 42 espécies (SCHEFFER et al., 2011; CORRÊA et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2014; FEIJÓ et al., 2015). No estado de São Paulo, a espécie frugívora *Artibeus lituratus* e a insetívora *Myotis nigricans* são as mais frequentemente identificadas com o vírus rábico (CORRÊA et al., 2013).

Inúmeras espécies de morcegos não hematófagos têm se adaptado aos ambientes urbanos, fazendo uso de recursos direta ou indiretamente proporcionados pelo homem, como por exemplo iluminação noturna, edificações e plantas, elementos que servem como fonte de alimentação e abrigo (BATISTA; ASSIS, 2012). Apesar de não ter sido registrado nenhum caso de raiva humana transmitida por morcegos não hematófagos no Brasil (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007), no período de 1993 a 2002, 27 casos de raiva transmitida por diversas espécies de morcegos não hematófagos foram reportadas nas Américas (BELOTTO, 2005).

Para a identificação do RABV, a Organização Mundial da Saúde recomenda a técnica de imunofluorescência direta (IFD) como padrão ouro, considerado um teste

sensível e acurado para detecção do vírus. O isolamento viral também é preconizado como teste padrão para detecção do RABV, já que permite detecção de vírus mesmo com baixa concentração viral. O isolamento viral pode ser realizado *in vivo*, através da inoculação intracerebral em camundongos neonatos ou de 21 dias (*Mouse intracerebral test- MIT/ Isolamento viral em camundongos- IVC*), porém essa técnica apresenta um longo tempo para obtenção do resultado, podendo chegar até 30 dias. Além do tempo para a obtenção dos resultados, deve ser considerada a questão da redução do uso de animais em experimentação, por isso o MIT vem sendo substituído pelo isolamento viral em cultura de células (*Rabies Tissue Culture Infection Test- RTCIT/ Isolamento viral em cultivo celular- IVCC*), técnica com menor custo e menor tempo para a obtenção dos resultados. Comparado a técnica de IFD, o IVCC demonstrou uma concordância de 99,75% com uma especificidade de 100% e sensibilidade de 94,37% a 98,74%. A técnica de IVCC pode ser realizada utilizando suspensões cerebrais bem como fluídos biológicos como líquido cefalorraquidiano, fluido lacrimal e saliva (CASTILHO et al., 2007).

Considerado Laboratório de Referência Nacional para a Raiva, o Instituto Pasteur de São Paulo realiza a técnica de IFD como padrão ouro e desde 2004 implementou a técnica de IVCC em células Neuro-2a em substituição gradativa ao IVC, reduzindo consideravelmente os custos econômicos e colaborando para a redução do uso de animais de laboratório, assim como para a ética animal (CASTILHO et al., 2007).

As primeiras tentativas de isolar o RABV em cultura celular de amostras suspeitas foram realizadas na década de 70 utilizando várias linhagens, incluindo células renais de filhotes de *hamster* (*Baby Hamster Kidney- BHK-21*), células embrionárias de pintinhos (*Chicken Embryo Related- CER*) e células neuroblastoma de murino (Neuro-2a), entre outras. As células Neuro-2a se mostraram altamente suscetíveis para o isolamento viral *in vitro* do RABV, provavelmente pela sua origem neuronal, estas células vêm sendo amplamente utilizadas devido principalmente a obtenção de resultados positivos mesmo quando a carga viral é baixa (Organização Mundial da Saúde, 2018). A linhagem de células embrionárias de rim humano (*Human Embryonic Kidney cells- HEK-293*) tem se destacado nesse cenário como alternativa às células Neuro-2a.

As células HEK-293 foram geradas pela transformação de cultura de células renais embrionárias humana com DNA de adenovírus, descrita pela primeira vez em 1977 por Graham et al. Essas células expressam proteínas neuronais, incluindo receptores muscarínicos de acetilcolina, motivos pelo qual tal linhagem se mostra promissora para utilização no isolamento viral do RABV. Madhusudana, Sundaramoorthy e Ullas (2010) compararam o isolamento do RABV entre as células HEK-293, Neuro-2a e BHK-21, obtendo como resultado 100% de infecção das células HEK-293. O número de focos fluorescentes e a intensidade dos mesmos foi comparável com o isolamento convencional utilizando Neuro-2a. Diante deste resultado satisfatório, a utilização de células HEK-293 impulsiona novas perspectivas para o diagnóstico de raiva em humanos e animais.

Embora uma variedade de linhagens celulares possa ser utilizada para o cultivo *in vitro* do RABV, a adaptação deste vírus ao cultivo celular não tem sido tarefa de fácil execução, podendo ser necessários longos períodos e inúmeras passagens até que se obtenha uma amostra de vírus considerada adaptada (CRICK; KING, 1988). O RABV pode ser classificado em duas categorias: “vírus de rua” e “vírus fixo”. O termo “vírus de rua” é geralmente utilizado para designar amostras ou isolados de vírus recentemente identificados provenientes de casos clínicos recuperados de animais naturalmente infectados em diferentes ciclos de transmissão da raiva. Suas propriedades e características podem ser altamente variáveis. Já o denominado “vírus fixo” é representado pelo “vírus de rua” adaptado por sucessivas passagens em animais ou cultura de células, o que ocasiona estabilidade nas propriedades do vírus, incluindo regularidade do período de incubação e estabilização da virulência. (JACKSON, 2011; YAMADA, 2012). Considerando as diferentes características biológicas do “vírus de rua” em comparação ao “vírus fixo”, como capacidade de infecção celular, internalização do vírus e replicação do vírus em cultura celular, obstáculos como desenvolvimento lento do vírus e baixa infecção celular foram relatados, buscando alternativas para tais dificuldades este estudo visa avaliar a utilização de células HEK-293 para a adaptação e isolamento do vírus da raiva.

2. Objetivos

2.a Objetivo Geral

Avaliar o uso da linhagem celular HEK-293 na técnica de isolamento viral a fim de contribuir com o diagnóstico da raiva.

2.b Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade das células HEK-293 para o isolamento viral de RABV.
- Avaliar a adaptação das amostras de RABV após 10 passagens consecutivas em células HEK-293.

3. Material e Métodos

3.a Células

Foram utilizadas duas linhagens celulares: Neuro-2a (neuroblastoma de murino) e HEK-293 (*Human Embryonic Kidney cells*). Ambas linhagens de células foram mantidas em frascos plásticos para cultivo de células de 25 cm² (Corning®) em Meio Essencial Mínimo Eagle (E-MEM) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®). Adicionalmente, para a linhagem celular Neuro-2a suplementou-se com mais 30 µL de aminoácidos não essenciais para cada 10 mL. As células foram desprendidas com tripsina (Sigma-Aldrich®) e expandidas a cada 4 dias,

adicionado E-MEM já suplementado e incubadas a 5% de CO₂ à 37°C (Ultra Safe® HF212UV) até sua posterior utilização.

3.b Amostras

Um total de 26 amostras de “vírus de rua” do RABV foi selecionado para este trabalho, sendo que as amostras foram utilizadas para diferentes finalidades, conforme descrito a seguir. Todas as amostras foram conservadas em freezer -80°C até sua utilização.

3.b.1- Adaptação do RABV em células HEK-293: para a adaptação do RABV em células HEK-293 foram utilizadas seis amostras de “vírus de rua” do RABV com duas distintas linhagens de vírus RABV, sendo estas: 3 amostras com linhagem genética característica de morcego insetívoro *Myotis nigricans* e 3 amostras com linhagem genética característica de morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, conforme descrito no Quadro 1.

3.b.2- Isolamento viral em cultivo celular do RABV em células HEK-293: para o isolamento viral em cultivo celular (IVCC) em células HEK-293, foram utilizadas 20 amostras de SNC de diferentes espécies previamente diagnosticadas para raiva pelo Instituto Pasteur através das técnicas de IFD e IVCC em célula Neuro-2a, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Amostras positivas e negativas para raiva, diagnóstico realizado pelas técnicas de IFD (Imunofluorescência Direta) e IVCC (Isolamento Viral em Cultivo de Células) em célula Neuro-2a. As amostras foram cedidas pelo Instituto Pasteur de São Paulo e a descrição inclui ano e espécie das quais foram coletadas.

Amostras		
Amostra	Ano	Espécie
IP 444*	2016	<i>Myotis nigricans</i>
IP 1098*	2016	<i>Myotis nigricans</i>
IP 1297*	2019	<i>Myotis nigricans</i>
IP 205*	2016	<i>Artibeus lituratus</i>
IP 469*	2016	<i>Artibeus lituratus</i>
IP 1233*	2016	<i>Artibeus lituratus</i>
IP 2291	2019	Bovino
IP 2296	2019	Bovino
IP 2295	2019	Bovino
IP 2306	2019	Bovino
IP 2682	2019	Bovino
IP 2683	2019	Bovino
IP 2516	2019	Bovino
IP 2546	2019	Bovino
IP 2550	2019	Bovino
IP 2179	2019	Bovino
IP 868	2019	<i>Canis lupus familiaris</i>
IP 2907	2019	Equino
IP 2912	2019	Bovino
IP 408	2019	<i>Canis lupus familiaris</i>
IP 407	2019	<i>Canis lupus familiaris</i>
IP 722	2019	<i>Canis lupus familiaris</i>
IP 2532	2019	Bovino
IP 2605	2019	<i>Canis lupus familiaris</i>
IP 2609	2019	<i>Canis lupus familiaris</i>
IP 2606	2019	<i>Canis lupus familiaris</i>

Notas:

* Amostras utilizadas no protocolo de adaptação celular.

As demais amostras foram utilizadas no IVCC em células HEK-293, sendo que as identificadas em vermelho representam as amostras positivas pela técnica de IFD, enquanto as amostras identificadas em azul, representam as amostras negativas na IFD.

3.c Preparo dos Inóculos

Fragmentos do SNC das amostras descritas no item 3.b foram utilizados para o preparo de suspensão a 20% em diluente (0,1% de gentamicina e 2% de SFB para 1000mL de solução fisiológica a 0,85%). O conteúdo então foi transferido para um tubo cônico de 15 mL e mantido por 30 minutos na geladeira para ação do antibiótico, com posterior centrifugação por 30 minutos em 3000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C. Os inóculos preparados a partir das amostras descritas no item 3.b.1 foram utilizados para inoculação em camundongos, conforme descrito a seguir, já os inóculos preparados a partir das amostras descritas no item 3.b.2 foram utilizados para o IVCC.

3.d Inoculação em Camundongos

Grupos de três camundongos albino suíços de 21 dias foram inoculados por via intracerebral com 0,03 mL das suspensões conforme descrito anteriormente. Os camundongos foram monitorados diariamente para observação dos sinais clínicos e submetidos a eutanásia *in extremis*. Os camundongos foram submetidos à necropsia e coleta do SNC. A presença do RABV no SNC dos animais foi confirmada por Imunofluorescência Direta (IFD) (item 3.e).

3.e Imunofluorescência Direta (IFD)

Para a realização da IFD, foram realizadas impressões em lâminas de microscopia dos SNCs coletados e fixadas com acetona 100% por 45 minutos à 4°C. Em seguida, as lâminas foram secas e o anticorpo policlonal antivírus da raiva conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi adicionado. Com posterior incubação durante 30 minutos em câmara úmida à 37°C, as lâminas foram lavadas

em PBS e em água destilada. Finalmente, as lâminas foram secas e montadas com glicerina tamponada à 50%. Como controle positivo foi utilizado SNC de camundongos inoculados com a amostra de vírus padrão do RABV *Challenge Virus Standard (CVS)*, e como controle negativo foi utilizado SNC de camundongos não inoculados sadios e eutanasiados.

3.f Caracterização genética

As amostras descritas no item 3.b.1 foram submetidas a caracterização genética conforme descrito a seguir. Os controles positivo e negativo (CVS e água ultra-pura livre de DNase/RNase respectivamente) foram incluídos em cada etapa do processamento das amostras.

i. Extração de RNA

Foi realizada a extração de RNA total a partir de 0,6 g de tecido de SNC de cada amostra. A técnica foi realizada com o reagente Trizol®, seguindo as recomendações do fabricante.

ii. Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi realizada separadamente a partir do RNA total extraído de cada amostra, a fim de se obter o DNA complementar (cDNA). A reação consistiu na utilização de 5 µL do RNA total extraído, 8µL de 5x First Stand Buffer, 6µL do *pool* de dNTPs na concentração de 10mM, 1µL da enzima transcriptase reversa (RT), 5µL do *primer* *Ínicio* (senso: 5' ACGCTTAACAACAARATCARAG 3') e 5µL do *primer* p784 (antissenso: 5' CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA 3') na

concentração de 10 mM, descritos por Campos et. al., (2011) e Soares et. al., (2002) respectivamente., 16 µL de água ultra-pura livre de DNase e RNase e 1µL de RNaseOUT. Posteriormente foi realizada a incubação a 42°C por 60 minutos.

iii. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para a técnica de PCR, foram utilizados os *primers* Início e do primer p784, descritos anteriormente. A reação foi realizada com 5µL de cDNA, 5µL de 10x PCR Buffer, 8µL de pool de dNTPs a 1,25mM, 2,5µL de cada *primer* a concentração de 10mM, 2,5µL de MgCl₂, 0,5µL Taq DNA polimerase e 24µL de água ultra-pura livre de DNase e RNase. Em seguida, a reação foi levada ao termociclador e submetida aos seguintes ciclos:

Quadro 2 – Ciclos utilizados na reação de PCR.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo	Etapa
1	94°C	5 minutos	Desnaturação
35	94°C	45 segundos	Desnaturação
	55°C	45 segundos	Anelamento
	72°C	2 minutos	Extensão
	72°C	10 minutos	Extensão final
1	8°C	∞	Conservação

Os produtos oriundos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi colocado em uma cuba com TBE *Buffer* 1x (Tris 0,1M, ácido bórico 0,9M de EDTA 0,001M) contendo 7µL de brometo de etídio a cada 100mL, visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta

iv. Sequenciamento genético

Inicialmente foi realizada a purificação dos produtos de PCR com o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare®) de acordo com as recomendações do fabricante.

Cada uma das amostras foi submetida à reação de sequenciamento, separadamente com os *primers* Início e p784 descritos anteriormente na concentração de 3,2 mM. Para essa técnica foram utilizados 4µL de *BigDye 3.1* (Applied Biosystems®), 1µL de cada primer e 5 µL do DNA alvo e água ultra-pura para uma reação final de 10µL.

O produto da reação de sequenciamento foi purificado com o reagente *Sephadex* (GE Healthcare®) em placa de 96 poços seguindo instruções do fabricante. A reação foi submetida ao analisador genético automático ABI-3130 (Applied Biosystems®), para obtenção das sequências de DNA. As sequências obtidas foram analisadas pelo alinhamento múltiplo com a ferramenta de dados públicos *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

3.g Adaptação do RABV em células HEK-293

Os inóculos preparados e descritos no item 3.c foram submetidas a 10 passagens consecutivas realizadas nas células HEK-293 (Figura 2). Para fim de comparação, o mesmo protocolo para adaptação das amostras foi realizado nas células Neuro-2a (Figura 3).

Figura 2 – Esquema detalhado do Protocolo de dez passagens consecutivas para a linhagem celular HEK-293, ressaltando o nome que cada passagem recebeu.

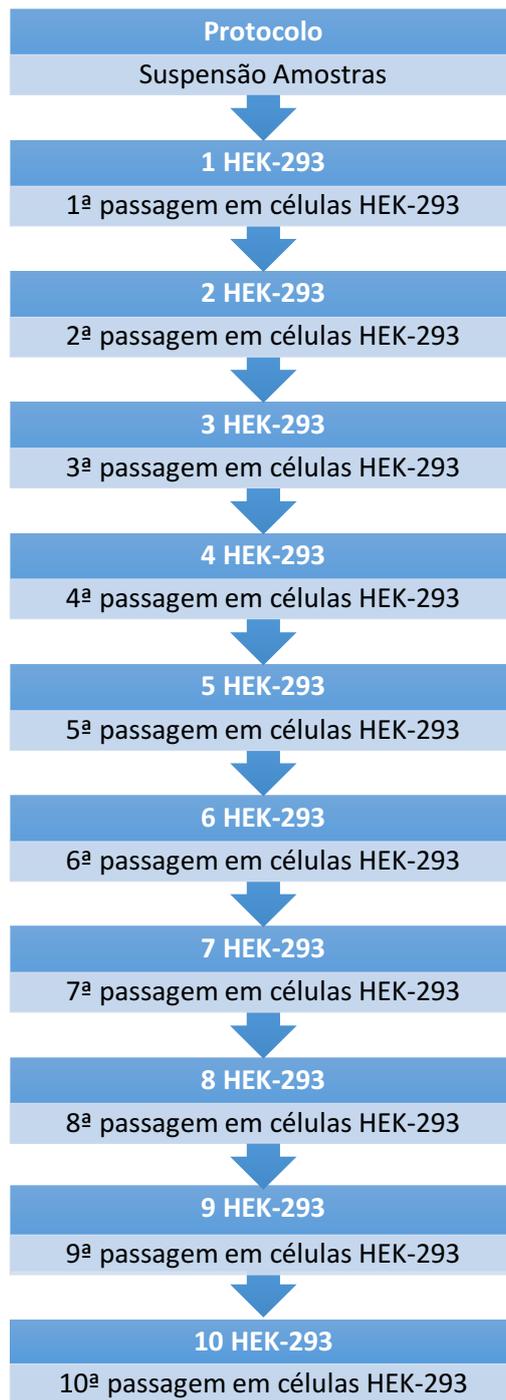
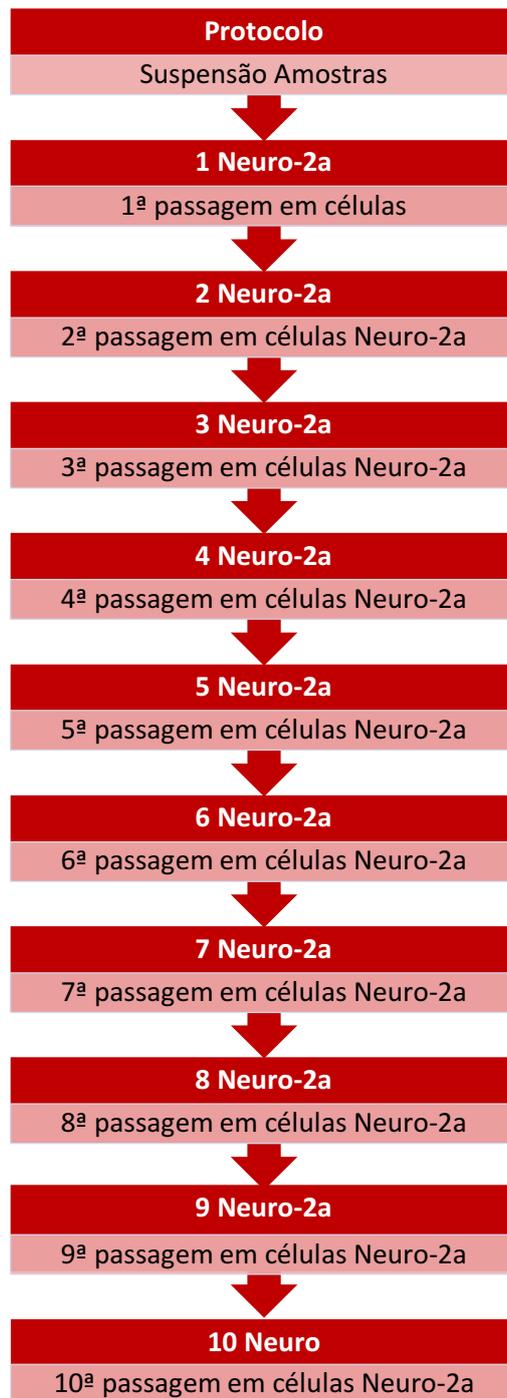


Figura 3 – Esquema detalhado do Protocolo de dez passagens consecutivas para a linhagem celular Neuro-2a, ressaltando o nome que cada passagem recebeu.



Os protocolos foram realizados em placas de 6 poços (Costar®). Para cada poço utilizou-se 1 mL de suspensão celular (1×10^6 células/mL), 300 µL da suspensão da amostra ou os inóculos das consecutivas passagens, 12 µL antibiótico (penicilina/estreptomicina Vitrocell®) e 2,5 mL de E-MEM (Adaptado de Fuoco et al., 2018). As placas então foram incubadas por 72 horas à 5% de CO₂ a 37°C, após este período, as placas foram congeladas a -80°C com posterior descongelamento rápido a 37°C. Repetiu-se essa etapa por duas vezes com posterior coleta da suspensão e armazenamento a -80°C. Assim, cada suspensão armazenada foi utilizada para inoculação de uma nova passagem consecutiva conforme o Protocolo previamente citado. A positividade dos inóculos foi avaliada através de IFD conforme descrito item 3.e. Como controle positivo, utilizou-se amostra de “vírus fixo” padrão PV (*Pasteur Virus*).

3.h Isolamento viral em cultivo celular do RABV em células HEK-293

O isolamento viral foi realizado em placas de 96 poços (Falcon®) utilizando-se dois protocolos distintos: Sem adsorção e com adsorção. As suspensões de 20% das amostras utilizadas para o isolamento foram adicionadas em triplicata na placa juntamente com E-MEM suplementado com 10% de SFB e células HEK-293 (5×10^5 células/mL). Foram utilizados controles positivos e negativos em todas as placas. No protocolo realizado com adsorção, o sobrenadante foi retirado após 2 horas de incubação à 5% de CO₂ a 37 °C (Adaptado de Madhusudana, Sundaramoorthy e Ullas, 2010), e no protocolo sem adsorção, o sobrenadante não foi retirado. Além disso, em ambos os protocolos utilizados, três diferentes tempos de incubação foram empregados: 24, 48 e 72 horas à 5% de CO₂ a 37 °C. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células fixadas com acetona a 80%. Então, a placa foi corada com anticorpo policlonal antivírus da raiva conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluído em PBS com Azul de Evans na diluição 1:60. A leitura foi realizada em microscópio invertido de fluorescência. As amostras foram consideradas positivas na presença de um ou mais focos com fluorescência característica da

infecção e consideradas negativas nenhum foco fluorescente. Para fim de comparação, o protocolo para IVCC, com as células Neuro-2a já padronizado foi utilizado.

4. Resultados

i. Inoculação em camundongos

Os camundongos inoculados com as amostras descritas no item 3.b.1 apresentaram sintomas neurológicos característicos do vírus do RABV em um período de 30 dias e posteriormente confirmados como positivos com a IFD.

ii. Caracterização genética

Todas as amostras descritas no item 3.b.1 foram positivas na RT-PCR, os amplicons foram purificados e submetidos ao sequenciamento genético. A linhagem genética das amostras de RABV foi confirmada através do alinhamento múltiplo pelo BLAST, sendo que nas amostras IP469/16, IP1233/16 e IP205/16 foi identificada a linhagem genética de RABV característica de morcegos insetívoros *Artibeus lituratus*, já as amostras IP444/16 e IP1297/19 foram identificadas como da linhagem genética de RABV, característica de morcegos não hematófagos *Myotis nigricans*. O esferograma da amostra IP1098/16 não foi satisfatório, portanto o sequenciamento genético desta amostra precisará ser repetido.

iii. Adaptação do RABV em células HEK-293

Os resultados da adaptação do RABV em células HEK-293 e Neuro-2a relevadas por IFD das dez passagens consecutivas estão descritos respectivamente nos quadros 3 e 4.

Quadro 3 – Resultado da Imunofluorescência Direta (IFD) das 10 passagens consecutivas das seis amostras de vírus da raiva (RABV) em linhagem celular HEK-293 (*Human Embryonic Kidney cells*).

Dez passagens consecutivas						
Linhagem celular HEK-293						
Passagens	Amostras <i>M. nigricans</i>			Amostras <i>A. lituratus</i>		
	IP 444	IP 1098	IP1297	IP 205	IP 469	IP 1233
1 ^a	+	—	—	+	+	—
2 ^a	—	—	—	+	+	—
3 ^a	+	—	—	+	+	—
4 ^a	—	—	—	+	+	—
5 ^a	—	—	—	+	+	—
6 ^a	—	—	—	+	+	+
7 ^a	—	—	—	+	+	+
8 ^a	—	—	—	+	+	+
9 ^a	—	—	—	+	+	+
10 ^a	—	—	—	+	+	+

As amostras provenientes de *M. nigricans* não apresentaram foco com fluorescência característica da infecção pelo RABV. Já todas as amostras de *A. lituratus* se apresentaram positivas no final de 10 passagens consecutivas. As amostras IP 205 e IP 469 foram positivas desde a primeira passagem

Quadro 4 – Resultado da Imunofluorescência Direta (IFD) das 10 passagens consecutivas das seis amostras de vírus da raiva (RABV) em linhagem celular Neuro-2a (neuroblastoma de murino).

Dez passagens consecutivas						
Linhagem celular Neuro-2a						
	Amostras <i>M. nigricans</i>			Amostras <i>A. lituratus</i>		
Passagens	IP 444	IP 1098	IP 1297	IP 205	IP 469	IP 1233
1 ^a	+	+	—	+	—	+
2 ^a	+	+	—	+	—	+
3 ^a	+	+	—	+	+	+
4 ^a	+	+	—	+	+	+
5 ^a	+	—	—	+	+	+
6 ^a	+	+	—	+	+	+
7 ^a	+	+	—	+	+	+
8 ^a	+	+	+	+	+	+
9 ^a	+	+	+	+	+	+
10 ^a	+	+	+	+	+	+

Foi possível observar que todas as amostras em questão apresentaram resultado positivo na IFD depois de dez passagens consecutivas. Porém, as amostras IP 469/16 e IP 1297/19 tiveram sua adaptação tardiamente em comparação com as outras amostras, que se apresentaram positivas na IFD desde a primeira passagem.

iv. Isolamento viral em cultivo celular do RABV em células HEK-293.

Os resultados das amostras de IVCC com célula HEK-293 utilizando-se os dois protocolos distintos (sem e com adsorção) com três tempos de incubação diferentes (24, 48 e 72h) estão apresentados no Quadro 5 a seguir. Os resultados

obtidos pelas técnicas de IFD e IVCC em cultura Neuro-2a realizados pelo Instituto Pasteur são mostrados no Quadro 6.

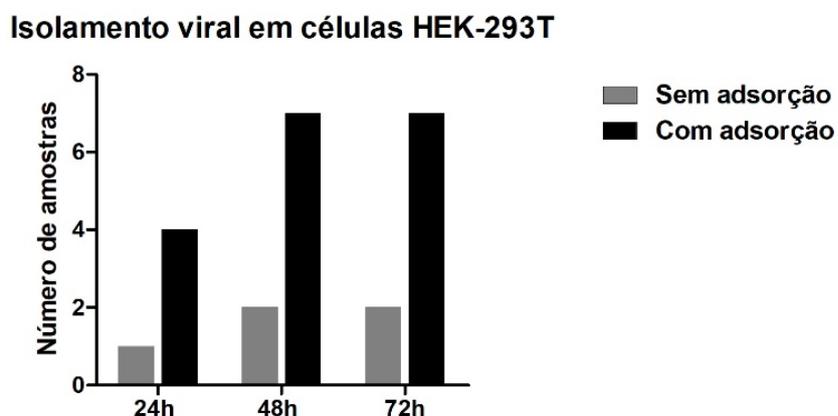
Quadro 5 – Resultados obtidos no isolamento viral em cultivo de células com o protocolo de adsorção e sem adsorção, utilizando-se três tempos de incubação distintos na linhagem celular HEK-293.

Amostra	24 h	24h	48h	48h	72h	72h
	Sem adsorção	Com adsorção	Sem adsorção	Com adsorção	Sem adsorção	Com adsorção
IP 2291	—	—	—	—	—	—
IP 2295	—	+	+	+	+	+
IP 2296	—	—	—	—	—	—
IP 2306	—	—	—	+	—	+
IP 2516	—	—	—	+	—	+
IP 2546	—	—	—	+	—	—
IP 2550	—	—	—	—	—	+
IP 2682	—	+	—	+	—	+
IP 2683	—	+	—	+	—	+
IP 2179	+	+	+	+	+	+
IP 868	—	—	—	—	—	—
IP 407	—	—	—	—	—	—
IP 408	—	—	—	—	—	—
IP 722	—	—	—	—	—	—
IP 2532	—	—	—	—	—	—
IP 2605	—	—	—	—	—	—
IP 2606	—	—	—	—	—	—
IP 2609	—	—	—	—	—	—
IP 2907	—	—	—	—	—	—
IP 2912	—	—	—	—	—	—

É possível observar que o número de amostras positivas aumenta de acordo com o tempo de incubação, como ocorre entre os tempos de 24h e 48h, porém, quando comparados os tempos de 48h e 72h, os resultados se mantiveram (Gráfico

1). Além disso, pode ser observado que o número de amostras positivas aumenta quando utilizado o protocolo de adsorção de 2 horas.

Gráfico 1 – Número de amostras positivas de acordo com o protocolo de adsorção viral e tempo de incubação.



Quadro 6 – Resultados obtidos nas técnicas diagnósticas realizadas pelo Instituto Pasteur de IFD e IVCC em células Neuro-2a.

Amostra	IFD	IVCC Neuro-2a
IP 2291	+	—
IP 2295	+	+
IP 2296	+	—
IP 2306	+	+
IP 2516	+	+
IP 2546	+	+
IP 2550	+	+
IP 2682	+	+
IP 2683	+	+
IP 2179	+	+
IP 868	—	—
IP 407	—	—
IP 408	—	—
IP 722	—	—
IP 2532	—	—
IP 2605	—	—
IP 2606	—	—
IP 2609	—	—
IP 2907	—	—
IP 2912	—	—

Quadro 7 – Comparação dos resultados obtidos no isolamento viral em linhagem celular HEK-293 com os resultados obtidos pelo Instituto Pasteur através das técnicas de IFD e IVCC em Neuro-2a.

Amostras N=20	Técnicas diagnóstico Raiva		
	IFD	IVCC Neuro-2a	IVCC HEK-2293T
Positivas IFD			
Bovinos (n=10)	10/10 (100%)	8/10 (80%)	7/10 (70%)
Negativas IFD			
Bovinos (n=2)	0/2	0/2	0/2
Cães (n=7)	0/7	0/7	0/7
Equino (n=1)	0/1	0/1	0/1

As amostras também foram comparadas com o resultado de IFD e IVCC utilizando Neuro-2a (Quadro 6). Verificou-se que os resultados obtidos pelas técnicas utilizadas pelo Instituto Pasteur foram praticamente semelhantes ao resultado do IVCC com célula HEK-293 (Quadro 7). Apenas a amostra IP 2546 apresentou resultado negativo na IVCC com célula HEK-293, enquanto na IVCC com célula Neuro-2a se apresentou positiva.

5. Discussão

O uso da célula HEK-293 para diagnóstico e pesquisa do vírus da raiva foi descrito pela primeira vez no ano de 2010 por Madhusudana, Sundaramoorthy e Ullas (2010), os quais hipotetizaram o seu uso potencial para o RABV devido à expressão de diferentes proteínas neuronais, incluindo receptores muscarínicos de acetilcolina, sugerindo a sua origem de células neuronais presentes no rim (SHAW et al., 2002). Nesse estudo, os autores testaram amostras de cérebros animais para isolamento viral utilizando além da linhagem celular HEK-293, as linhagens Neuro-2a e BHK-21. Os resultados observados pelos autores neste estudo apontaram para a alta sensibilidade das células HEK-293, semelhante a sensibilidade das células Neuro-2a, sendo esta última linhagem celular considerada mais sensível e amplamente utilizada para o IVCC do RABV. Os resultados obtidos, no presente estudo, no protocolo

realizado com adsorção são concordantes com os resultados obtidos por Madhusudana, Sundaramoorthy e Ullas (2010), mostrando sensibilidade para o IVCC semelhante entre as células HEK-293 a Neuro-2a. Provavelmente o processo de adsorção diminui a toxicidade da amostra e permite uma monocamada celular confluyente.

Em relação aos tempos de incubação, os resultados mostram que o tempo de 48 horas é o ideal para as amostras utilizadas em isolamento viral em HEK-293, refutando os achados de Madhusudana, Sundaramoorthy e Ullas (2010), o qual utilizou 24 horas de incubação. Rudd e Trimarchi (1989) afirmam que 24 horas de incubação para isolamento viral é satisfatório apenas quando o inóculo testado deter quantidades adequadas de vírus. Segundo os mesmos autores, baixas concentrações do vírus não poderiam ser detectadas sem um período de incubação de 2 a 4 dias, o que pode ter sido o caso das amostras utilizadas nesse estudo.

Já nos resultados obtidos para adaptação de amostras de RABV ao cultivo celular, houve uma grande diferença na adaptação das amostras de acordo com a linhagem celular utilizada (Neuro-2a ou HEK-293). Foi identificada completa adaptação de todas amostras submetidas até a décima passagem em linhagem celular Neuro-2a, enquanto que apenas as amostras de morcegos *A. lituratus* mostraram adaptação celular no fim das dez passagens em células HEK-293. Estudos mostram que a linhagem celular Neuro-2a é mais sensível ao isolamento de “vírus de rua” comparado a qualquer outra linhagem celular (RUDD; TRIMARCHI, 1987; MADHUSUDANA; SUNDARAMOORTHY; ULLAS, 2010). Castilho et al. (2007) relataram 100% de concordância entre as técnicas de IFD, MIT e IVCC, mostrando principalmente que as células Neuro-2a são sensíveis para o isolamento de “vírus de rua” em rotina laboratorial de amostras de morcegos. A diferença observada na adaptação celular entre as duas espécies de morcegos contraria os achados de Fuoco et al. (2018), os quais observaram que amostras do morcego *Myotis nigricans* obtiveram uma taxa de replicação maior comparada com outras espécies de morcegos. Os autores sugerem que a patogenicidade do RABV se correlaciona diretamente com a cinética de propagação e captação do vírus, mas inversamente com a taxa de replicação do vírus. Assim, os autores indicam que a alta replicação *in vitro* e a baixa letalidade *in vivo* sugerem que as variantes de RABV associadas a

morcegos insetívoros podem ser menos virulentas e possuir menor patogenicidade potencial, levando ao reconhecimento e ativação da resposta imune.

A linhagem celular HEK-293 pode ser uma alternativa a linhagem Neuro-2a no isolamento viral de cultivo de células, já que os resultados obtidos foram bem próximos ao IVCC com Neuro-2a. O uso de células HEK-293 no laboratório de diagnóstico da raiva ainda ofereceria algumas vantagens sobre as células Neuro-2a, já que tais células possuem um crescimento extremamente rápido, sendo seu cultivo facilitado, obtendo-se monocamada uniforme confluyente em 24 a 36 horas. Além disso as células HEK-293 têm sido descritas como opção para protocolos essenciais na produção de vírus e vacinas recombinantes como a transfecção de DNA. Para a sua utilização em protocolos de adaptação celular, estudos futuros ainda precisarão ser realizados utilizando outras espécies animais para comparar e avaliar a capacidade de adaptação da célula HEK-293.

6. Conclusão

–Foi observada adaptação da HEK-293 após 10 passagens. Contudo, o protocolo de adaptação foi mais eficaz quando empregada a linhagem celular Neuro-2a, a qual mostrou boa capacidade de adaptação de amostras de RABV de morcegos não-hematófagos.

–Foi observado que o IVCC com linhagem celular HEK-293 obteve resultados satisfatórios quando comparados com o IVCC em linhagem celular Neuro-2a.

–A célula HEK-293 mostra grande potencial para ser utilizada como alternativa no protocolo de IVCC quando as células Neuro-2a não estão indisponíveis.

7. Referências

- Batista HBDCR, Franco AC, Roehe PM. Raiva: uma breve revisão, 2007.
- Batista MGN, Assis DSM. Ocorrência De Casos De Raiva Em Morcegos Não Hematófagos No Município De Caicó-Rn. *Rev Centauro*. 2012; 3(1):01-06.
- Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo H, Correa E. Overview of rabies in the Americas. *Virus research*. 2005;111(1):5-12.
- Carnieli JR P, Fahl WDO, Castilho JG, Oliveira RDN, Macedo CL, Durymanova E, Jorge RS, Morato RG, Spíndola RO, Machado LM, Sá JEU, Carrieri ML, Kotait I. Characterization of rabies virus isolate from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Research*. 2008;131(1):33-46.
- Castilho JG, Iamamoto K, Lima JYDO, Scheffer KC, S, Carnieli Jr, P.; Oliveira RN, Macedo CI, Achkar SM, Carrieri ML, Kotait I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)*. 2007;4(47):12-28.
- Corrêa MMDO, Lazar A, Dias D, Bonvicino CR. Quirópteros hospedeiros de zoonoses no Brasil. *Bol. Soc. Bras. Mastozool*. 2013;67:23-38.
- Crick J, King A. Culture of Rabies. *Virus in Vitro*. In: Campbell J.B., Charlton K.M. Rabies. *Developments in Veterinary Virology*. vol 7. Boston:Springer;1988.
- El-tholoth M, El-beskawy M, Hamed MF. Identification and genetic characterization of rabies virus from Egyptian water buffaloes (*Bubalus bubalis*) bitten by a fox. *Virus disease*. 2015;26(3):141-146.
- Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EM, Aguiar EA, Silvia, LH, Sodre MM, Souza MC, Kotait I. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2002;44(2):91-95.
- Favoretto SR, Mattos CC, Moraes NB, Araújo FA, Mattos CA. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention. 2001;7(6):1062-1065.
- FEIJO APAR, ALTHOFF S. New species of *Histiotus* (Chiroptera: Vespertilionidae) from northeastern Brazil. *Zootaxa*, 2015; 4048.3: 412-427.
- Fuoco, NL, Fernandes ER, dos Ramos Silva S, Luiz FG, Ribeiro OG, Katz ISS. Street rabies virus strains associated with insectivorous bats are less pathogenic than strains isolated from other reservoirs. *Antiviral research*. 2018;160: 94-100.

Garg, SR. Rabies in man and animals. India: Springer;2014.

Graham FL, Smiley J, Russell NC, Naim B. Characteristics of a human cell line transformed by a DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36:59–74.

ICTV, International Committee Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>> Acesso em: 11 nov. 2019

Jackson A, Wunner W. Rabies. 2ª ed. California: Academic Press. 2007.

Jackson AC. Research advances in rabies. Academic Press, 2011.

Kenneth FK. The Cambridge world history of human disease. CUP, Cambridge, p. 871, 1993.

Kanitz FA, Cargnelutti JF, Weiblen R, Batista HBCR, Flores EF. Virus isolation in cell culture for confirmatory diagnostic of rabies in bovine specimens. *Ciência Rural.* 2015;45(12):2193-2196.

Kotait I, Carrieri ML, CARNIELI Jr P, Castilho JG, Oliveira RDN, Macedo CI.; Achkar SM. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista.* 2007;4(40):02-08.

Madhusudana SN, Sundaramoorthy S, Ullas PT. Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. *International Journal of Infectious Diseases.* 2010;14(12):1067-71.

Nogueira M, Gregorin R, De lima I, Tavares V, Moratelli R, Peracchi A. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check list,* 10, 808, 2014

Oliveira RN, Souza SP, Lobo RS, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli P, Fahl WO.; Achkar SM, Scheffer KC, Kotait I, Carrieri ML, Brandão PE. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology.* 2010; 405(2):352-360.

PLOTKIN SA. Rabies. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30:4–12

Rudd, RJ, Trimarchi CV. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *Journal of clinical microbiology.* 1987;25(8):1456-1458.

Rudd RJ, Trimarchi CV. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *Journal of clinical microbiology*. 1989; 27(11): 2522-2528.

Scheffer KC, Barros RF, Achkar SM, Silva ACR, Chaves LB, Caporale GMM, Oliveira RN, Costa AEB, Yamamoto K, Fahl WO, Carnieli P Jr. Bats and Rabies in Brazil. In: Zupan JL, Mlakar SL. *Bats: Biology, Behavior and Conservation*. Nova Science Publishers; 2011.

Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal*. 2002;16(8):869-871.

Théodorides. *Histoire de la Rage*. Paris: Masson. 1986.

Webster WA, Casey GA. Diagnosis of rabies infection In: Campbell JB, Charlton KM, editors. *Rabies*. 1988.

Webster WA, Charlton KM, Casey GA. Growth characteristics in cell culture and pathogenicity in mice of two terrestrial rabies strains indigenous to Canada. *Canadian journal of microbiology*, 1988; 34(1):19-23.

Wiktor TJ, Koprowski H. Antigenic variants of rabies virus. *J. exp. Med.* 1980; 152: 99-112.

Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, Smith, C. L. The molecular biology of rabies viruses. *Reviews of infectious diseases*. 1988; 10(4):771-784.

Yamada K, Park CH, Noguchi K, Kojima D, Kubo T, Komiya N, Inoue S. Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus research*. 165(1):34-45.