

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DA  
RAIVA EM BOVINOS NO ESTADO  
DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**Gislaine Raquel Santos**

**Médica Veterinária**

**2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DA  
RAIVA EM BOVINOS NO ESTADO  
DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**Gislaine Raquel Santos**

**Orientadora: Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho**

**Coorientador: Prof. Dr. Daniel Figuglietti Brandespim**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva.

**2016**

Santos, Gislaine Raquel  
S237      Caracterização epidemiológica e molecular da raiva em bovinos  
no Estado de Pernambuco, Brasil. / Gislaine Raquel Santos. --  
Jaboticabal, 2016  
xviii, 60 p. : il ; 29 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

Banca examinadora: Luís Antonio Mathias, Maria da Glória  
Buzinaro, Fumio Honma Ito, Darci Lara Perecin Nociti

Bibliografia

1. Epidemiologia. 2. Filogenia. 3. Herbívoros. 4. *Lyssavirus*. 5.  
Raiva. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DA RAIVA EM BOVINOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

**AUTORA: GISLAINE RAQUEL SANTOS**

**ORIENTADORA: ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO**

**CO-ORIENTADOR: DANIEL FRIGUGLIETTI BRANDESPIM**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



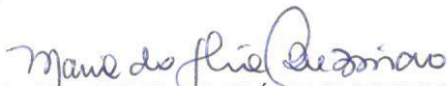
Prof. Dr. FUMIO HONMA ITO  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Sanidade Animal / FMVZ/USP - São Paulo/SP



Profa. Associada DARCI LARA PERESIN NOCITTI  
FAMEV/CLIMEV / UFMG - Cuiabá/MT



Prof. Dr. LUÍS ANTÔNIO MATHIAS  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARIA DA GLÓRIA BUZINARO  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 22 de março de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Gislaine Raquel Santos** – Nascida em Esperança/PB, no dia 25 de outubro de 1977, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Câmpus de Patos, em setembro de 2004. Trabalhou na Agência de Defesa Sanitária do Estado de Rondônia (IDARON), durante o período de 2005 a 2008. Ingressou como Professora substituta na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), onde permaneceu durante o período de 2008 a 2011. Iniciou no ano de 2010 a especialização em Defesa Sanitária e Inspeção e Higiene de Alimentos de Origem Animal. Concluiu o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) em dezembro de 2011 com a dissertação intitulada: Aspectos epidemiológicos da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em rebanhos bovinos leiteiros na microrregião Garanhuns do Estado de Pernambuco. Em março de 2012, iniciou o curso de Doutorado na área de Medicina Veterinária Preventiva no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus de Jaboticabal.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”

Cora Coralina

## DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, que é o meu suporte, o meu referencial, o meu exemplo em todos os momentos da minha vida. É o amor de vocês que fortalece as minhas asas, fazendo-me alçar voos mais altos, acreditando, sonhando, buscando e tendo a certeza de que, quando eu precisar descansar, sempre terei o meu ninho para voltar. Obrigada por nunca me deixarem desanimar. Eu amo muito vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que está ao meu lado em cada segundo do meu dia, iluminando os meus passos e mostrando sempre o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais, Alexandre e Carmita, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu duvidava. O amor, a dedicação, o exemplo e a presença constante de vocês em minha vida é o que me fortalece, me dá coragem para lutar pelos meus sonhos e asas para voar.

À minha irmã Gilmara, por se fazer tão presente na minha vida, me acolhendo, me repreendendo quando necessário, mas acima de tudo me dando a certeza do seu amor incondicional e de que nunca, onde quer que eu esteja, estarei sozinha. Você é o meu amor maior.

Ao meu irmão Max, à minha cunhada-irmã Débora e aos meus sobrinhos Eduarda e Guilherme, por sempre almejarem o meu sucesso e estarem sempre me envolvendo com o seu amor.

Aos meus avós Lourival, Denise e Rita Daluz (*in Memoriam*) e à minha Tia Margarida (*in Memoriam*), que onde quer que estejam estão acompanhando os meus passos e desejando minha felicidade e sucesso. Saudades eternas.

À minha orientadora, Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, que me guiou por este caminho com paciência, dedicação e amizade. Conviver com a senhora me fez não só crescer profissionalmente, mas acima de tudo evoluir como ser humano. Com a senhora aprendi a cada dia a me tornar uma pessoa melhor. Tenho muito orgulho de ser sua “filha”. Muito Obrigada!!

Ao meu coorientador, Daniel Friguglietti Brandespim, que me fez acreditar que era possível a realização deste sonho. Obrigada por sempre estar presente na minha vida, me aconselhando, ensinando, repreendendo, mas acima de tudo sendo meu amigo. Por mais que eu agradeça, nunca será o suficiente.

Aos professores da Pós-graduação em Medicina Veterinária, pelo conhecimento compartilhado, pela atenção e paciência dedicada a cada dúvida. Em especial aos professores Luís Antônio Mathias, Maria da Glória Buzinaro, Samir Issa Samara, Luiz Augusto do Amaral e Antônio Sérgio Ferraud, pela significativa contribuição a



este trabalho. A vocês dedico o meu respeito, a minha admiração e a minha gratidão.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial a Assis, Cidinha, Marisa, Andreia, Márcia e Roseane, pelo acolhimento, amizade, carinho e atenção. Vocês tornaram a minha caminhada mais leve. A Andressa, pelas orientações e preciosa colaboração nas análises moleculares.

A meus irmãos de orientação, em especial a Fernanda Cassioli, Zé (José Honorato Begali) e Maurício Machado; no início tínhamos em comum apenas a mesma orientadora, com o tempo passamos a dividir as alegrias, os momentos difíceis, a torcer um pelo outro e nos tornamos amigos. Obrigada por tudo!

À Heloísa Godoy e André Buzutti, poderia falar apenas de um e mesmo assim seriam dois, meus amigos, que se tornaram irmãos de vida. Sempre presentes, me ouvindo, aconselhando, acalmando, falando coisas que eu precisava ouvir e, acima de tudo, sendo meus amigos nos momentos difíceis e nos momentos felizes. O meu ciclo está acabando, mas o que me faz feliz é a certeza de que sempre terei vocês na minha vida. Muito Obrigada!!!

À Glaucenyra Pinheiro, que foi umas das primeiras pessoas que conheci no Departamento. Naquela época ela me chamava de Marta, coisas da Glau, e eu não sabia que tinha encontrado uma irmã. Foram tantas emoções, alegrias, superações, despedidas, momentos difíceis compartilhados. E muitas, muitas gargalhadas. Hoje você não está mais em Jaboticabal, mas continua tão presente em minha vida. Obrigada por tudo!!!

À Renata Ferreira dos Santos, como é bom ter você na minha vida. Você me dá paz, me faz pensar melhor e acreditar que eu posso e consigo. Sabe o que nunca te contei, que desde que te conheci, eu quis ser sua amiga. E não sabia ainda, a pessoa especial que você é, mas a minha intuição já sabia que logo eu reconheceria mais uma irmã. A sua amizade foi um dos grandes presentes que ganhei no Doutorado e vai seguir comigo por toda a vida. Obrigada por estar sempre tão presente.

A todos aqueles a quem pude ter o privilégio de reconhecer como amigos, obrigada pelo carinho, pelos puxões de orelha, pelos sorrisos, pelo ombro amigo, por sempre estarem ao meu lado. Em especial a Thyago Lira, Sônia Amaro, Augusto Amaro,

Lucília Machado, Agda Facincani, Vanja Gondim, Gustavo Claudiano, Fabiana Cirino, Edimar Soares, Jéssica Oliveira e Lucimara Borges.

Aos amigos Daniele Araújo (Dani), Karla Alvarenga, Carolina Alvarenga Cruz, Eric Matheus, Paulo Eduardo Carrara (Poodle), por fazerem os meus dias mais felizes.

À Universidade de Nihon, em especial ao Prof. Takuya e à Profa. Yuki Kobayashi, pelo carinho, atenção, conhecimento compartilhado e imensa contribuição na realização desta pesquisa.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela cessão do material biológico utilizado neste trabalho. Sem a contribuição de vocês, nada disso seria possível.

A CAPES pelo apoio financeiro, sendo essencial na execução deste projeto.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, nesta etapa da minha vida.

Levarei vocês sempre comigo.

Muito obrigada!

**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 24914/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Caracterização epidemiológica e molecular do vírus da raiva em herbívoros, no Estado de Pernambuco, Brasil", sob a responsabilidade da Profª Drª Adolorata Aparecida Bianco Carvalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de fevereiro de 2015.

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2015.

**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| <b>RESUMO</b> .....  | xii    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | xiii   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....   | xiv    |
| <b>LISTA DE QUADROS</b> .....  | xvi    |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | xvi    |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | xvii   |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 1      |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 2      |
| 2.1. Etiologia.....  | 2      |
| 2.1.1. Estrutura e propriedades do vírus da raiva (VR).....                                      | 2      |
| 2.1.2. Características moleculares do vírus da raiva.....  | 3      |
| 2.2. Epidemiologia.....  | 5      |
| 2.3. Patogenia e sinais clínicos.....  | 8      |
| 2.4. Diagnóstico.....  | 10     |
| 2.5. Controle e profilaxia.....  | 11     |
| 2.6. Estudos moleculares.....  | 12     |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | 15     |
| 3.1. Objetivo geral.....   | 15     |
| 3.2. Objetivos específicos.....  | 15     |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 16     |
| 4.1. Área de estudo.....   | 16     |
| 4.2. Levantamento de dados e análise da distribuição temporal dos casos de raiva em bovinos..... | 16     |
| 4.3. Distribuição espacial dos casos de raiva em bovinos.....                                    | 17     |
| 4.4. Determinação da taxa de incidência e da sazonalidade da raiva em bovinos.....               | 17     |
| 4.5. Caracterização molecular do vírus da raiva.....   | 18     |
| 4.5.1. Amostras de encéfalos utilizadas na caracterização molecular.....                         | 18     |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.5.2. Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para o gene N.....                | 19        |
| 4.5.3. Síntese de cDNA do gene N.....   | 20        |
| 4.5.4. Sequenciamento.....  | 21        |
| 4.5.5. Análise das sequências de DNA.....   | 21        |
| 4.5.6. Análise filogenética.....  | 22        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>25</b> |
| 5.1. Distribuição temporal dos casos de raiva em bovinos.....   | 25        |
| 5.2. Distribuição espacial dos casos de raiva em bovinos.....   | 26        |
| 5.3. Taxas de incidência e sazonalidade da raiva em bovinos.....  | 36        |
| 5.4. Taxa de incidência da raiva bovina por mesorregião.....  | 39        |
| 5.5. Análise filogenética do gene N.....  | 40        |
| 5.5.1. Análise filogenética relacionada à distribuição geográfica.....  | 42        |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>APÊNDICES</b>  | <b>54</b> |
| <b>APÊNDICE A</b> - População bovina do Estado de Pernambuco, Brasil, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012..... | <b>55</b> |
| <b>APÊNDICE B</b> - Alinhamento das sequências.....   | <b>56</b> |
| <b>ANEXO</b> - Documento de cessão do material biológico (Informação CRHE n. 15/2013 de 08/03/13).....                      | <b>60</b> |

## CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DA RAIVA EM BOVINOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

**RESUMO** - A raiva é uma antropozoonose de evolução letal causada por vírus do gênero *Lyssavirus*. É uma das doenças infecciosas responsáveis por causar prejuízos aos produtores rurais, levando a impactos econômicos significativos no agronegócio. Objetivou-se com o presente trabalho determinar o perfil epidemiológico da raiva em herbívoros no Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2007 a 2012. Foi realizado um estudo retrospectivo dos dados relativos aos casos positivos de raiva de herbívoros, levando em consideração o mês e o ano da ocorrência e a região geográfica. As análises moleculares foram desenvolvidas a partir de amostras de encéfalos provenientes das cinco Mesorregiões (Agreste, Mata, Sertão, Metropolitana e São Francisco) do Estado. No período estudado foram detectados 238 resultados positivos para o vírus da raiva em herbívoros, distribuídas espacialmente nas cinco mesorregiões, em 78 (42,1%) dos 185 municípios. Observou-se no decorrer do período uma diminuição significativa na taxa de incidência, com ausência de sazonalidade. Quando se analisou a taxa de incidência levando em consideração as Mesorregiões, observou-se que a Mata foi a que apresentou maior oscilação. Para complementar a análise epidemiológica, 16 amostras foram submetidas à técnica de RT-PCR para amplificação parcial do gene N. As sequências geradas foram alinhadas com sequências homólogas obtidas no GenBank para a construção da árvore filogenética, pelo método Bayesianana. Todas as amostras foram homólogas às sequências de vírus da raiva relacionadas à linhagem do morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Diante dos resultados obtidos, constata-se que o vírus da raiva está presente em todo o Estado de Pernambuco, relacionado à linhagem do morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Os focos de raiva em herbívoros estão distribuídos em graus diferenciados em todas as mesorregiões, porém não se constatou um aumento no número de casos que se repita de forma sistemática em uma mesma época do ano, indicando ausência de sazonalidade. Observou-se, também, uma significativa diminuição da incidência no decorrer do período estudado. Esse panorama enfatiza a importância da contínua realização das atividades de prevenção e controle pela Vigilância Agropecuária.

**Palavras-chave:** epidemiologia, filogenia, herbívoros, *Lyssavirus*, raiva

## EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF RABIES IN CATTLE IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL.

**ABSTRACT** -- Rabies is an anthroozoonosis with lethal evolution caused by genus lyssavirus viruses. It is one among infectious diseases who are responsible for causing losses to farmers, leading to a significant economic impacts on agribusiness. The objective of this study was to determine the epidemiological profile in herbivores within the State of Pernambuco, Brazil, from 2007 to 2012. A retrospective study was conducted based on data from positive cases of rabies of herbivores, considering the month, the year of occurrence and geographic region. The molecular analyzes were developed using brain samples from the five Mesoregions (Agreste, Mata, Sertão, Metropolitana and São Francisco) within the State. During the study period, were detected positive for rabies 238 from herbivores, spatially distributed in 78 (42.1%) of 185 municipalites from the five mesoregions. It was observed, during the period cited, a significant decrease in the incidence rate, with no seasonal nature. While analyzing the incidence rate considering the mesoregions, the Mata region showed the greatest oscillation. As a complement to the epidemiological analysis, 16 samples were subjected to RT-PCR for the partial amplification of the gene N. The generated sequences were aligned with homologous sequences obtained from the GenBank to build the phylogenetic tree by bayesian method. On the results, it was found that the rabies virus is present all over the state of Pernambuco, related to the lineage of vampire bat *Desmodus rotundus*. The rabies outbreaks in herbivores are distributed in different degrees throughout the mesoregions but it was not found an increase in cases numbers that repeats systematically during the same time of the years, indicating, therefore, the absence of seasonality. It was observed also a significant decrease in incidence over the studied period. This scenario emphasizes the importance of continued prevention and control activities by the Agricultural Surveillance.

Keywords: epidemiology, herbivores, *Lyssavirus*, phylogeny, rabies

**LISTA DE ABREVIATURAS**

|         |  |
|---------|--|
| ABLV    | Australian bat virus                           |
| ADAGRO  | Agência de defesa e fiscalização agropecuária  |
| ARAV    | Aravan virus                                   |
| BBLV    | Bokeloh bat virus                              |
| cDNA    | DNA complementar                               |
| DNA     | Ácido dexoxirribonucleico                      |
| DUW     | Duvenhage virus                                |
| EBLV-1  | European bat vírus-1                           |
| EBLV-2  | European bat vírus-2                           |
| ELISA   | Ensaio imunoenzimático                         |
| G       | Glicoproteína                                  |
| IC      | Inoculação em Camundongos                      |
| ICTV    | International Committee on Taxonomy of Viruses |
| IFD     | Imunofluorescência direta                      |
| IKOV    | Ikoma lyssavirus                               |
| IRKV    | Irkut virus                                    |
| KHUV    | Khujand virus                                  |
| LANAGRO | Laboratório nacional agropecuário              |
| LBV     | Lagos bat virus                                |
| M       | Proteína de Matriz                             |



|         |   |
|---------|---|
| MAPA    | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento                       |
| MOKV    | Mokola virus  |
| N       | Nucleoproteína  |
| OIE     | World organization for animal health/ Organização Mundial de Saúde Animal |
| P       | Fosfoproteína   |
| PNCRH   | Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros                     |
| RABV    | Rabies virus  |
| RFFT    | Teste de inibição rápida de focos fluorescentes                           |
| RNA     | Ácido ribonucleico  |
| rpm     | Rotação por minuto  |
| RT-PCR  | Reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa                    |
| SBV     | Shimoni bat virus   |
| SNC     | Sistema Nervoso Central   |
| TE      | Tris-Acetato-EDTA   |
| VR      | Vírus da raiva  |
| WHO/OMS | World Health Organization/ Organização Mundial de Saúde                   |
| µL      | Microlitro  |
| µM      | Micromolar  |

## LISTA DE QUADROS

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Espécies reconhecidas do gênero <i>Lyssavirus</i> . International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2015.....   | 04     |
| 2. Estudos de caracterização genética do vírus da raiva realizados no Brasil, nos anos de 2001 a 2014.....  | 13     |
| 3. Amostras de encéfalos de bovinos submetidas à caracterização molecular, de acordo com a procedência e o ano de isolamento, do Estado de Pernambuco, Brasil.....                              | 19     |
| 4. Primers utilizados para síntese de cDNA do gene N do vírus da raiva.....   | 21     |
| 5. Primers utilizados no sequenciamento do gene codificador da proteína N do vírus da raiva.....  | 21     |
| 6. Sequências disponíveis no Genbank utilizadas para a construção da árvore filogenética, de acordo com o número de acesso e local de isolamento (município/Estado, espécie, animal e ano)..... | 23     |

## LISTA DE TABELAS

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Número de casos de raiva bovina diagnosticados pelo LANAGRO, período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.....                               | 25     |
| 2. Distribuição dos focos de raiva bovina, por mesorregiões, no período de 2007 a 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.....  | 35     |
| 3. Taxa de incidência (por 1.000.000) de raiva bovina, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.....                                     | 36     |
| 4. Médias móveis trimestrais da taxa de incidência mensal (por 1.000.000) de raiva bovina, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil..... | 37     |
| 5. Taxa de incidência (por 100.000.000) de raiva bovina, de acordo com a mesorregião e o ano de ocorrência, no período de 2007 a 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.....       | 39     |

## LISTA DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| 1. Distribuição espacial das mesorregiões do Estado de Pernambuco, Brasil, indicando a origem das amostras utilizadas no presente estudo.....    | 16     |
| 2. Distribuição espacial dos focos de raiva em bovinos, por mesorregiões, no Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2007 a 2012.....        | 27     |
| 3. Distribuição espacial dos casos de raiva em bovinos, por municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2007 a 2012.....          | 27     |
| 4. Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2007.....                       | 28     |
| 5. Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2007..... | 28     |
| 6. Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2008.....                       | 29     |
| 7. Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2008..... | 29     |
| 8. Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2009.....                       | 30     |
| 9. Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2009..... | 30     |
| 10. Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2010.....                      | 31     |
| 11. Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, ano de 2010.....   | 31     |

|  |    |
|--|----|
| 12. Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2011.....  | 32 |
| 13. Distribuição espacial do número de casos positivos de raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2011 .....   | 32 |
| 14. Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2012.....  | 33 |
| 15. Distribuição espacial do número de casos de raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2012.....  | 33 |
| 16. Concentração de casos de raiva na superfície, de acordo com mesorregião e municípios do Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2007 a 2012.....   | 34 |
| 17. Taxa de incidência (por 1.000.000) de raiva bovina no Estado de Pernambuco, Brasil, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012.....  | 36 |
| 18. Médias móveis trimestrais da taxa de incidência mensal (por 1.000.000) de raiva bovina, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.....                     | 38 |
| 19. Árvore filogenética bayesiana obtida pelo alinhamento das sequências parciais do gene N de vírus da raiva provenientes do Estado de Pernambuco e das sequências virais depositadas no GenBank..... | 44 |

## 1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade de evolução letal que compromete principalmente o Sistema Nervoso Central (SNC), causada por um vírus do gênero *Lyssavirus* e considerada uma das antropozoonoses de maior importância mundial. Embora seja conhecida desde a antiguidade, ainda é considerada como uma doença negligenciada, gerando elevados custos sociais e econômicos.

No Brasil, a raiva dos herbívoros representa um grave problema e é considerada endêmica em todas as regiões do país, causando prejuízos aos produtores rurais e levando a impactos econômicos significativos para o agronegócio. A ocorrência da enfermidade está relacionada à população do morcego hematófago *Desmodus rotundus*, considerado o principal ator na manutenção da enfermidade no ambiente rural, e às condições que favoreçam a sua manutenção, como oferta de alimento, abrigos, variações climáticas e características topográficas e hidrográficas.

O Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) prevê ações para o controle das populações de morcego e a vacinação dos rebanhos, além de educação sanitária, em todos os estados brasileiros.

No Estado de Pernambuco, a responsabilidade pela execução do PNCRH é da Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária (ADAGRO). Embora a Agência informe sobre a ocorrência da raiva em herbívoros no Estado, não existem estudos que avaliem sua incidência e distribuição. Este fato é agravado se forem consideradas as subnotificações, devido à falta de conhecimento por parte dos produtores e às falhas na vigilância epidemiológica.

Considerando a importância da raiva dos herbívoros na cadeia produtiva e para a saúde pública, e pelo fato de o Estado de Pernambuco ocupar o oitavo lugar na produção de leite, no ranking nacional, a presente pesquisa propôs realizar uma caracterização epidemiológica que forneça informações fidedignas para se entender a real situação da raiva nesse Estado e, conseqüentemente, fornecer subsídios às tomadas de decisão para o estabelecimento de uma correta vigilância epidemiológica e de adequadas estratégias de prevenção.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A raiva é uma enfermidade infecciosa conhecida e estudada desde a antiguidade. É de distribuição cosmopolita, mundialmente endêmica, de evolução aguda, com capacidade de infectar todos os mamíferos e que compromete, principalmente, o Sistema Nervoso Central (SNC).

### 2.1. Etiologia

O agente etiológico da raiva é um vírus da ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (ICTV, 2015).

#### 2.1.1. Estrutura e propriedades do vírus da raiva (VR)

O VR tem cerca 130-180 nm de comprimento e entre 70-85 nm de diâmetro, com o formato de um cilindro e composto por ribonucleocapsídeo e envelope. O ribonucleocapsídeo contém o genoma não segmentado de RNA fita simples, com polaridade negativa (BANERJEE, 1987), e três proteínas: a N, uma nucleoproteína associada ao RNA viral; a proteína L, uma RNA-polimerase RNA dependente; e a proteína P (a proteína NS ou M1), uma fosfoproteína. O envelope é composto pelas proteínas G, uma glicoproteína que se projeta na parte externa do virion, e M ou M2, que é uma proteína de matriz. Dentre as proteínas, destacam-se a glicoproteína (G) e a nucleoproteína (N), que funcionam como antígenos principais e são os alvos da maioria dos estudos de epidemiologia molecular (NADIN-DAVIS et al., 1998; RUPPRECHT et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2007; KOTAIT et al., 2009).

A proteína G forma as espículas que se projetam na superfície da partícula viral, possui a capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes e é responsável pela adsorção às células do hospedeiro; qualquer variação no gene que a codifica afetará a imunogenicidade, a patogenicidade e o neurotropismo do vírus. A proteína M mantém a ligação entre o envelope e o nucleocapsídeo (BANERJEE, 1987; RODRIGUEZ et al., 2007).

A nucleoproteína, principal componente interno do virion, é constituída por 450 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 57.000 daltons. A proteína N está presente em grande quantidade na célula infectada, sendo responsável pela transcrição, replicação e encapsidação do RNA (BANERJEE, 1987; RODRIGUEZ et al., 2007), além de ser a região mais conservada e fortemente expressa (BOURHY et al., 1993).

O vírus da raiva é sensível a solventes lipídicos e detergentes. É inativado a temperaturas altas, sendo destruído a 50°C durante 15 minutos. É sensível à luz solar, ao dessecamento, aos raios ultravioleta e aos extremos de pH. Mantém-se estável a 4°C por dias e a -70°C ou temperaturas mais baixas, durante anos (BATISTA et al., 2007; BRASIL, 2008; RODRIGUEZ et al., 2007).

### **2.1.2. Características moleculares do vírus da raiva**

A diversidade genética entre os membros do gênero *Lyssavirus* foi avaliada em estudo de Badrane et al. (2001) utilizando o gene que codifica a glicoproteína G envolvida na interação vírus-hospedeiro, na patogenicidade e na imunogenicidade. A análise filogenética distinguiu sete genótipos: 1-*Rabies virus* (RABV), 2-*Lagos Bat virus* (LBV), 3-*Mokola virus* (MOKV), 4-*Duvenhage virus* (DUVV), 5-*European bat Lyssavirus tipo 1* (EBLV-1), 6-*European bat Lyssavirus tipo 2* (EBLV-2) e 7-*Australian bat Lyssavirus* (ABLV). O estudo de imunogenicidade demonstrou que a vacina que imuniza contra os genótipos 1, 4, 5, 6 e 7 não imuniza contra o 2 e o 3, propondo que os genótipos poderiam ser divididos em dois principais filogrupos.

Outros genótipos vem sendo estudados, ora denominados “espécies” pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV). No ano de 2015 o gênero *Lyssavirus* apresentava 14 espécies (Quadro 1) (ICTV, 2015).

A OMS e a OIE consideraram como raiva apenas a doença causada pela espécie 1, classificando as demais como “encefalites relacionadas”, e como “aparentados” os vírus pertencentes às outras espécies (WHO, 2008).

Dentro de uma espécie viral, o vírus da raiva (VR) pode ser classificado em variantes a partir de suas diferenças genéticas e antigênicas. Essas variantes permanecem estáveis quando infectam hospedeiros de uma mesma espécie animal;

quando a transmissão do vírus ocorre entre hospedeiros de espécies diferentes, que não são consideradas como reservatórios naturais da enfermidade, o vírus sofre mutações, o que é denominado de *spillover* (RUPPRECHT et al., 2002). Esse contato entre espécies animais pode levar à formação de uma nova variante do vírus (CARNIELI JR et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2007a).

**Quadro 1.** Espécies reconhecidas do gênero *Lyssavirus*.  
International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2015

| <b>Espécies</b>                  | <b>Abreviações</b> | <b>Origem Geográfica</b>    | <b>Reservatório</b>   |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------------|---|
| <i>Rabies Virus</i>              | RABV               | Distribuição Mundial        | Carnívoros e morcegos   |
| <i>Lagos-Bat-Virus</i>           | LBV                | África                      | Morcegos frugívoros ( <i>Megachiropter</i> )                                      |
| <i>Mokola-Virus</i>              | MOKV               | África (Nigéria)            | Mussaranhos   |
| <i>Duvenhage-Virus</i>           | DUVV               | África                      | Morcego insetívoro  |
| <i>European Bat Lyssavirus 1</i> | EBLV1              | Europa                      | Morcego insetívoro ( <i>Eptesicus serotinus</i> )                                 |
| <i>European Bat Lyssavirus 2</i> | EBLV2              | Europa                      | Morcego insetívoro ( <i>Myotis sp.</i> )  |
| <i>Australian Bat Lyssavirus</i> | ABLV               | Austrália                   | Morcego insetívoro ( <i>Megachiropter</i> ) e frugívoro ( <i>Microchiropter</i> ) |
| <i>Aravan virus</i>              | ARAV               | Ásia Central (Quirguistão)  | Morcego insetívoro ( <i>Myotis blythi</i> )                                       |
| <i>Khujand virus</i>             | KHUV               | Ásia Central (Tadjiquistão) | Morcego insetívoro ( <i>Myotis mystacinus</i> )                                   |
| <i>Irkut virus</i>               | IRKV               | Sibéria Ocidental           | Morcego insetívoro ( <i>Murina leucogaster</i> )                                  |
| <i>West Caucasian bat virus</i>  | WCBV               | Região do Cáucaso           | Morcego insetívoro ( <i>Miniopteros schreibersi</i> )                             |
| <i>Shimoni bat virus</i>         | SBV                | África (Kênia)              | Morcego insetívoro ( <i>Hipposideros commersoni</i> )                             |
| <i>Bokeloh bat lyssavirus</i>    | BBLV               | Alemanha                    | Morcego insetívoro ( <i>Myotis Nattereri</i> )                                    |
| <i>Ikoma lyssavirus</i>          | IKOV               | África                      | Mamífero ( <i>Civetticus civetta</i> )  |



No Brasil, Favoretto et al. (2002) realizaram um estudo antigênico com amostras de animais domésticos, animais de produção, animais silvestres e humanos utilizando um painel de anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína viral, e identificaram seis variantes antigênicas que foram compatíveis com o painel pré-estabelecido para tipificação de estirpes encontradas nas Américas: variante 2 (cão), 3 (*Desmodus rotundus*), 4 (*Tadarida brasiliensis*), 5 (morcego-vampiro da Venezuela), 6 (*Lasiurus cinereus*) e “Lab” (reagente a todos os anticorpos utilizados). Foram identificados também seis perfis não compatíveis com o painel utilizado.

Estudos subsequentes identificaram novas variantes relacionadas a morcegos insetívoros, raposas (MORAIS et al., 2000; ITO, 2005; SILVA et al., 2011), saguis (FAVORETTO et al., 2001) e cachorro-do-mato (CARNIELI JR et al., 2009).

## 2.2. Epidemiologia

O VR está presente em quase todo o mundo; as únicas exceções são o continente da Antártida e alguns países que erradicaram a enfermidade como Japão, Inglaterra, países escandinavos e Irlanda. Na América Latina, o vírus da raiva é encontrado em todos os países (BATISTA et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2007).

Esse vírus se mantém na natureza em várias espécies de mamíferos, denominados reservatórios (RUPPRECHT et al., 2002) e, devido a grande variedade deles, a cadeia epidemiológica da raiva foi dividida em quatro ciclos inter-relacionados: o ciclo urbano, que apresenta como hospedeiros naturais os animais domésticos, representados pelos cães e gatos; o ciclo silvestre, no qual a transmissão ocorre entre diferentes espécies como raposa, lobo, macaco, gambá, raccoon-dogs, coiotes, guaxinis (ITO, 2005; BATISTA et al., 2007) e sagui (FAVORETTO et al., 2001); o ciclo rural, que envolve principalmente hospedeiros herbívoros e tem como principal transmissor o morcego hematófago; e o ciclo aéreo, representado pelos morcegos (KOTAIT et al., 1998).

Os principais reservatórios do vírus da raiva são os carnívoros e os morcegos hematófagos (ITO et al., 2001), que foram identificados por meio da tipificação antigênica com anticorpos monoclonais como variante 2 (caninos) e variante 3 (morcegos hematófagos) (HEINEMANN et al., 2002).

Existem três espécies de morcegos hematófagos, as quais estão presentes apenas na América Latina: o *Diaemus youngi*, o *Diphylla ecaudata* e o *Desmodus rotundus* (SILVA; LANGONI, 2011). O *Desmodus rotundus* é considerado o principal responsável pela transmissão do VR no ambiente rural (GOMES, 2004). Esta espécie vive em colônias formadas por um macho alfa, várias fêmeas e seus filhotes, não é migratória, mas costuma mudar de abrigo. Sua taxa reprodutiva é baixa, gerando apenas um filhote por ano, mas não apresenta um período definido de reprodução, podendo gerar filhotes em qualquer época do ano (ALENCAR et al., 1994). De acordo com Gomes (2004), a maioria dos nascimentos ocorre nas estações mais quentes e chuvosas do ano. As fêmeas são as principais responsáveis pelo hábito de lambe outros indivíduos da colônia, dividindo o alimento e mantendo a integridade do grupo (BRASIL, 2009). Suas ações são noturnas e influenciadas pela claridade da lua (ALENCAR et al., 1994).

Essa espécie de morcego tem uma preferência pelo sangue de herbívoros, e os bovinos e equinos são as espécies mais afetadas (MERINI et al., 2010). Devido aos seus hábitos, permanece por um longo período em um mesmo local, sendo, portanto, uma presa fácil (JOHNSON et al., 2014). Além disso, essa espécie de morcego tem o hábito de retornar todas as noites para se alimentar do mesmo animal. Assim, mesmo quando não ocorre a transmissão do vírus, os ataques dos morcegos aos herbívoros podem gerar um grave impacto econômico à pecuária devido ao estresse gerado nos animais, o que se reflete na sua produção, além dos danos ao couro devidos às lesões causadas pela espoliação (BRASIL, 2009).

A raiva rural é endêmica em todas as regiões do país, porém sua ocorrência depende de variações definidas de acordo com cada região que está associada ao morcego hematófago, e sua distribuição está relacionada às variações climáticas e características topográficas e hidrográficas que afetam a ecologia dos morcegos (KOBAYASHI et al., 2006).

A manutenção da raiva no ambiente rural está ligada a alguns fatores, como: aumento da oferta de alimento, representada pelo significativo crescimento dos rebanhos; ocupação desordenada, caracterizada por grandes modificações ambientais, como desmatamento, construção de rodovias e de hidroelétricas, que alteraram o ambiente em que os morcegos viviam, obrigando-os a procurar novas

áreas e outras fontes de alimentação; oferta de abrigos artificiais, representados pelas construções, como túneis, cisternas, casas abandonadas, bueiros, fornos de carvão desativados e outros (BRASIL, 2009).

Nas primeiras décadas dos anos 2000 foram realizados estudos epidemiológicos com amostras suspeitas para a raiva em diferentes regiões do país: na região norte, Casseb et al. (2006) determinaram a ocorrência de casos de raiva, por meio do diagnóstico em 11.500 amostras de encéfalos de animais silvestres e domésticos no período de 2000 a 2004. Os resultados foram: 7,46% (704/9.448) de positividade em animais domésticos (cães e gatos); 32,25% (30/93) em bovídeos; 24% (6/25) em equinos; 16% (1/6) em suínos; e 0,12% (2/1670) em morcegos.

Na região sul (Paraná), Patrício et al. (2009) realizaram um estudo epidemiológico em 460 amostras de encéfalos de herbívoros e detectaram 42,8% (191/460) de bovinos e 23% (3/13) de ovinos positivos para a enfermidade. Rissi et al. (2008) relataram a ocorrência da raiva em ovinos no Rio Grande do Sul; os casos ocorreram em uma área endêmica para raiva bovina e durante um surto de raiva bovina, o que levou à conclusão que houve o envolvimento do mesmo vírus e que a transmissão aos ovinos também foi pelos morcegos hematófagos.

Na região sudeste, Queiroz et al. (2009) analisaram 10.579 amostras provenientes da região noroeste do Estado de São Paulo, durante o período de 1993 a 2007. Dos 42 municípios da região, 23 (55%) tiveram pelo menos um caso positivo da enfermidade. Entre as amostras positivas (518/10.579), identificou-se que 67% (346/518) eram cães, 16% (84/518), bovinos e 9,7% (50/518) eram morcegos.

Gomes e Monteiro (2011) realizaram uma pesquisa sobre a influência do relevo, da temperatura, da precipitação e da sazonalidade na distribuição espacial da raiva bovina no Estado de São Paulo. Observaram que há uma relação espacial entre a raiva bovina, o relevo montanhoso, o maior índice de precipitação e a menor temperatura, e que não havia relação entre a sazonalidade e raiva bovina no período analisado.

Menezes et al. (2008) estudaram a situação da raiva bovina em Minas Gerais no período de 1996 a 2008; constataram que a maioria dos casos ocorreu nos meses de abril a julho e que a enfermidade apresentava-se de forma regular nos municípios do Estado, com maior ou menor intensidade nas diferentes regiões.

Na região centro-oeste, Matta et al. (2010b) analisaram 2.225 amostras suspeitas de raiva oriundas dos três ecossistemas no Estado de Mato Grosso, no período de 1996 a 2006. Observaram que os focos estavam distribuídos em 95 dos 141 municípios do Estado e confirmaram a positividade de 745 (33,5%) das amostras. Concluíram que ocorreu uma variação crescente no número de casos positivos e que a maioria deles ocorreu na região do Cerrado, onde devem ser implementadas medidas mais rígidas de controle.

Na região Nordeste, Santos et al. (2009) estudaram os casos de raiva no período de 2006 a 2007 em herbívoros no Estado da Bahia, utilizando as técnicas de geoprocessamento. Estimaram que a espécie bovina foi a principal envolvida nos focos (87,3%), seguida da equina (12,6%) e, depois, da caprina e ovina (0,1%). Também observaram que havia áreas silenciosas cercadas por áreas de risco, o que sugeria subnotificação. Ressaltaram a necessidade de uma melhor vigilância epidemiológica nas áreas atingidas e a realização de educação sanitária para a população local.

Póvoas et al. (2012) determinaram a ocorrência de casos positivos para o vírus da raiva em herbívoros no Estado do Maranhão, no período de 2006 a 2010. Identificaram uma percentagem de 35,75% (69/193) de amostras positivas; destas, a espécie que apresentou o maior percentual de positividade foi a bovina com os seguintes valores de frequência relativa: 39,58% (2006), 55,56% (2007), 31,70% (2008), 25,92% (2009) e 24,42%(2010).

### **2.3. Patogenia e sinais clínicos**

A transmissão do vírus normalmente ocorre por meio da saliva dos animais infectados que penetra por arranhadura, mordedura e/ou lambedura (BRASIL, 2008). Existem alguns relatos da ocasional ocorrência por via aérea (pela inalação de partículas virais), transplante de córnea e de órgãos, vias transplacentária e mamária (KOTAIT et al., 2009).

Após a inoculação, o vírus replica-se nas células musculares locais; em seguida é conduzido, via terminações nervosas motoras, aos nervos periféricos (JACOB et al., 2000); pelo fluxo axonal retrógrado, em movimento centrípeto, atinge

o SNC, onde ocorre intensa multiplicação. Pelo Sistema Nervoso Periférico e Sistema Nervoso Autônomo ocorre a disseminação de forma centrífuga, especialmente para as glândulas salivares, por onde é eliminado, e também para a pele, músculo liso e estriado, folículos pilosos, coração, pulmão, rins, baço, timo, útero, ovários, glândula adrenal, fígado, retina, córneas, intestino e epitélio da língua (BRASIL, 2008).

O período de incubação do VR em herbívoros está entre 25 e 90 dias. Entre as diferentes espécies de mamíferos, esse período é variável e dependerá da variante do vírus, da susceptibilidade e do estado imunitário do animal, do local da mordedura (quanto mais próximo do SNC, mais rápida será a evolução da doença), da quantidade de vírus inoculado e da idade do animal (RODRIGUEZ et al., 2007; KOTAIT et al., 2009).

Após o período de incubação, o animal começará a apresentar os sinais característicos da enfermidade. Os aspectos clínicos da doença são muito variáveis entre as espécies, e a doença nos animais apresenta-se principalmente sob a forma paralítica e furiosa. Nos herbívoros a doença pode apresentar-se das duas formas, porém a forma paralítica é a mais observada; inicialmente os animais se isolam, apresentam dificuldade para defecar, sialorreia, andar cambaleante (REIS et al., 2003), sinais de engasgo, aumento da sensibilidade e prurido na região da mordedura, hiperexcitabilidade e aumento da libido. Evoluindo para uma paralisia dos membros posteriores e decúbito, os animais não conseguem mais se levantar e ocorrem movimentos de pedalagem (PEDROSO et al., 2009), dificuldade respiratória, opistótono, asfixia e morte (RIET-CORREA, 2001).

Os sinais clínicos da raiva não são patognomônicos, por isso a observação clínica só indica uma suspeita da enfermidade. Não existe tratamento para a doença e, uma vez iniciados os sinais clínicos, é invariavelmente fatal (BRASIL, 2008). Por isso, todos os animais suspeitos da enfermidade devem ser submetidos à necropsia, e torna-se essencial a realização de testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico e a identificação do vírus (OIE, 2015).

## 2.4. Diagnóstico

O material biológico utilizado para o diagnóstico da raiva é o encéfalo dos animais suspeitos. As amostras devem ser enviadas refrigeradas ou imersas em líquido de Vallé para um laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ou Ministério da Saúde (BRASIL, 2009). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconiza que o diagnóstico laboratorial seja realizado pela identificação do antígeno viral, por meio do teste de Imunofluorescência Direta (IFD), e pelo isolamento viral, por meio da inoculação em camundongos (IC) ou em cultivo celular (BRASIL, 2008).

Outros meios de diagnóstico são normalmente utilizados para avaliar a capacidade imunogênica das vacinas e a resposta imune de animais domésticos à vacinação, como as provas sorológicas por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e os testes de soroneutralização em cultivos celulares, como o teste de inibição rápida de focos fluorescentes (RFFT–Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) e o teste fluorescente de vírus neutralização.

No Brasil, na rotina laboratorial são utilizados os testes IFD e IC concomitantemente (BRASIL, 2005). De acordo com Kotait et al. (2009), essa associação de técnicas oferece resultados mais confiáveis.

A IFD é um teste rápido, barato, e pode propiciar resultados confiáveis em 90% a 99% dos casos (ZIMMER et al., 1990; OIE, 2015)

A IC é utilizada como teste biológico complementar e confirmatório do diagnóstico da raiva. É considerado sensível, porém oneroso e demorado (KOTAIT et al., 2009). Nos dias atuais, há uma propensão a substituir a IC pelo teste em cultura celular, por ser este mais rápido e barato, além de diminuir o uso de animais. Porém, é necessário um laboratório adequado e a otimização da técnica para ser usada na rotina de diagnóstico (OIE, 2015).

Com o advento das técnicas imunológicas e de biologia molecular, foram desenvolvidos testes mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da raiva (GERMANO, 1994), como aqueles que fazem uso de anticorpos monoclonais e a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR).

A RT-PCR apresenta alta especificidade e sensibilidade, além de oferecer um resultado rápido (OIE, 2015). Essa técnica possibilita caracterizar geneticamente o vírus da raiva, distinguindo estirpes dentro de regiões geográficas e permitindo o cruzamento entre os dados da variante viral, do hospedeiro e da área geográfica (NADIN-DAVIS, 1998).

## **2.5. Controle e profilaxia**

Após a confirmação do diagnóstico positivo, é de suma importância a implantação de medidas de vigilância epidemiológica para a realização do controle da raiva. No Brasil, em 1966 foi implantado o Plano de Combate à Raiva dos Herbívoros, denominado atualmente Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH), com o objetivo principal de diminuir a incidência da doença nos herbívoros domésticos. As principais atividades desenvolvidas são o controle populacional do morcego hematófago, a vacinação dos herbívoros domésticos, a vigilância epidemiológica e a educação em saúde animal (BRASIL, 2009). A eliminação da doença depende da vacinação continuada e efetiva do rebanho em áreas endêmicas e do controle residual de infestações de morcegos em áreas de risco (VUILLAUME et al., 1998).

O controle da população de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* é realizada por meio de métodos seletivos direto e indireto. O método seletivo direto consiste na captura do morcego com redes de neblina nos abrigos artificiais ou na fonte de alimento, aplicando o anticoagulante no dorso do animal capturado. Essa técnica tem como base o hábito desse animal de manter contato físico com os outros membros da colônia, espalhando a pasta para os demais morcegos da colônia, e também pelo hábito de se lamberem. O método seletivo indireto consiste na aplicação do produto ao redor das mordeduras dos herbívoros espoliados ou no dorso dos animais agredidos, sendo dessa forma eliminados apenas os morcegos que entram em contato com os herbívoros. Essa técnica tem como base o hábito dos morcegos *Desmodus rotundus* de retornarem ao mesmo animal para alimentar-se todas as noites (BRASIL, 2009).

Almeida et al. (2002), ao realizarem um estudo utilizando o método seletivo direto, observaram uma redução significativa na incidência de mordeduras em

bovinos e equídeos e na presença ou vestígios recentes de *Desmodus rotundus* em quatro abrigos dos 18 que estavam habitados no início do trabalho.

A vacinação dos herbívoros deve ser realizada utilizando vacina inativada, por via subcutânea ou intramuscular, na dosagem de 2 mL. Os animais devem ser revacinados 30 dias após a aplicação da primeira dose e revacinados anualmente (BRASIL, 2009).

A educação sanitária é a base dos programas de sanidade animal, por promover a conscientização do produtor rural e da sociedade em geral, com o objetivo de obter a participação efetiva desses segmentos, visto que, de acordo com o PNCRH, é responsabilidade do proprietário notificar imediatamente ao serviço veterinário oficial a suspeita de casos de raiva em herbívoros, bem como a presença de animais apresentando mordeduras por morcegos hematófagos, ou ainda informar a existência de abrigos desses morcegos. A não notificação coloca em risco a saúde dos rebanhos da região, podendo expor o próprio ser humano à enfermidade (BRASIL, 2009).

## **2.6. Estudos moleculares**

No Brasil, foram realizados diversos estudos filogenéticos com amostras de vírus rábico originárias de diferentes regiões, principalmente por meio do sequenciamento parcial ou completo das proteínas N e G (Quadro 2).

Ito et al. (2001), realizando o sequenciamento do gene da proteína N de diferentes mamíferos provenientes de diferentes regiões do Brasil, afirmaram que os isolados do vírus da raiva são agrupados em duas populações de reservatórios, geneticamente distintas, mantidas por cães e morcegos hematófagos.

Sato et al. (2004), também realizando o sequenciamento de amostras brasileiras, a partir do gene N ou do gene G, e pela região intergênica G-L, demonstraram que os isolados podem ser classificados, pelo sequenciamento, em dois grupos distintos mantidos, respectivamente, pela variante de morcego hematófago e pela variante canina.

Kobayashi et al. (2005), por meio do sequenciamento do gene N, analisaram filogeneticamente o vírus da raiva isolados de morcegos e afirmaram que o VR é geneticamente dividido dentro de cinco linhagens, que apresentam uma tendência a



dependerem das espécies de morcegos hospedeiras, o que sugere que as variantes de VR de morcegos, no Brasil, são espécie-específicas.

**Quadro 2.** Estudos de caracterização genética do vírus da raiva realizados no Brasil, nos anos 2001 a 2014.

| <b>Autores</b>     | <b>Ano</b> | <b>Estado</b>                              | <b>Especie</b>                                      | <b>Proteína</b> |
|--------------------|------------|--|---|-----------------|
| Ito et al.         | 2001       | GO, MG, SP, MT                             | Morcego, herbívoros, humanos e animais domésticos   | N               |
| Ito et al.         | 2003       | GO, MG, SP, MT                             | Morcego, herbívoros, humanos e animais domésticos   | N               |
| Sato et al.        | 2004       | Brasil                                     | Morcego, herbívoros, humanos e animais domésticos   | G; G-L          |
| Shoji et al.       | 2004       | SP   | Morcegos frugívoros                                 | N               |
| Sato et al.        | 2005       | SP; PB; GO; TO; MT                         | Morcego, herbívoros, humanos e animais domésticos   | G               |
| Kobayashi et al.   | 2005       | SP   | Morcego   | N               |
| Nociti             | 2005       | MT   | Bovino  | N               |
| Shoji et al.       | 2006       | PB   | Animais silvestres, herbívoros                      | N               |
| Sato et al.        | 2006       | MA; PA; TO                                 | Humanos, animais domésticos, silvestres, herbívoros | G               |
| Kobayashi et al.   | 2006       | DF; GO; MA; MT; MG; RO; PA; SP; TO         | Bovino; morcegos; cães                              | N               |
| Carnieli Jr et al. | 2006       | PB; PE; BA; PI                             | Cão; gato, canídeo silvestre                        | N               |
| Kobayashi et al.   | 2007a      | GO; MG; SP; RJ; MA;                        | Carnívoro   | N               |
| Kobayashi et al.   | 2007b      | RJ; SP; GO; PB                             | Morcego   | P; M            |
| Kobayashi et al.   | 2008       | DF; GO; MA; MG; MS; MT; PA; PB; RJ; SP; TO | Bovino; morcegos                                    | N               |
| Carnieli Jr et al. | 2009       | PB; PE; BA; PI; AL; SE; MA; PA             | Animais domésticos; canídeos silvestres e humanos   | N               |
| Mochizuki et al.   | 2009       | PB   | Raposa  | N, P, M, G e L  |
| Kobayashi et al.   | 2011       |  | Canino  | G               |
| Hirano et al.      | 2010       | GO   | Morcego   | G-L             |
| Matta et al.       | 2010b      | MT   | Bovino  | N               |
| Carneiro           | 2010       | BA   | Morcegos  | N               |
| Mochizuki et al.   | 2011       | SP   | Morcego   | N               |
| Mochizuki et al.   | 2012       | PE; PB                                     | Herbívoro   | N               |
| Allendorf et al.   | 2012       | SP   | Morcego insetívoro e frugívoro                      | N               |
| Vieira et al.      | 2013       | ES   | Herbívoro; morcego                                  | G               |
| Peixoto et al.     | 2014       | AM   | Herbívoro   | N e G           |

Utilizando amostras de vírus da raiva de herbívoros isoladas no período de 2003 a 2009, oriundas dos Estados da Paraíba e Pernambuco, Mochizuki et al. (2012) realizaram uma análise filogenética com base na nucleoproteína e observaram que os isolados pertenciam a uma única linhagem que circula nesta área há pelo menos sete anos, a do morcego hematófago. E que o padrão de distribuição da linhagem pode ser correlacionada com a de uma população de morcegos hematófagos isolada por barreiras geográficas.

Peixoto et al. (2014), por meio do sequenciamento parcial das proteínas N e G, realizaram uma análise filogenética de isolados de herbívoros, provenientes dos Estados do Acre, Pará, Tocantins e Rondônia. Observavam que o vírus da raiva de todos os isolados pertenciam à variante *Desmodus rotundus*, e que a análise filogenética baseada na proteína N resultou na presença de cinco sublinhagens (A1-A5), enquanto a análise baseada na proteína G resultou em 7 sublinhagens (A1-A7); quando comparadas, identificou-se a circulação de distintas linhagens nas regiões geográficas.

Reconhecendo a relevância da raiva no cenário nacional e a necessidade de conhecimento da realidade dessa enfermidade em herbívoros, é extremamente importante a realização de estudos epidemiológicos que ofereçam subsídios para entender o comportamento desta enfermidade nas diferentes localidades do Brasil.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Determinar o perfil epidemiológico da raiva em bovinos no Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2007 a 2012.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

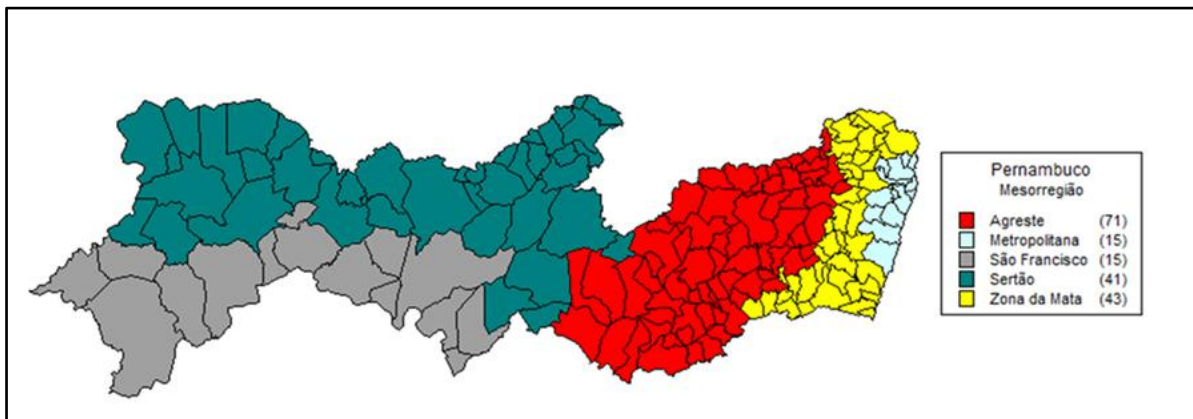
- Analisar a distribuição temporal e espacial da raiva dos bovinos
- Determinar a taxa de incidência e a sazonalidade da raiva dos bovinos
- Avaliar o risco nas áreas atingidas pelo vírus da raiva dos bovinos
- Caracterizar molecularmente o vírus rábico circulante, comparando com outras amostras do Brasil e do mundo depositadas no GenBank

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

O estudo foi desenvolvido a partir de amostras positivas para o vírus da raiva provenientes do Estado de Pernambuco, compreendendo as cinco mesorregiões: Metropolitana, Mata, Agreste, São Francisco e Sertão, compostas por 185 municípios (Figura 1).

O Estado situa-se na região Nordeste do Brasil, possui 9.277.727 habitantes e ocupa uma área de 98 311km<sup>2</sup> (IBGE, 2015).



**Figura 1.** Distribuição espacial das mesorregiões do Estado de Pernambuco, Brasil, indicando a origem das amostras utilizadas no presente estudo.

### 4.2. Levantamento de dados e análise da distribuição temporal dos casos de raiva em bovinos

Foi realizado um estudo retrospectivo com análise dos dados dos casos positivos de raiva em bovinos no Estado de Pernambuco, Brasil, no período 2007 a 2012, levando-se em consideração o mês, o ano de ocorrência da doença e a região geográfica. Para tanto, foram consultados arquivos do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os dados foram tabulados e distribuídos em tabelas.

### **4.3. Distribuição espacial dos casos de raiva em bovinos**

A partir dos casos notificados foi realizado o mapeamento para observar a distribuição espacial dos focos e, conseqüentemente, a identificação das áreas de risco, utilizando o software MapInfo Professional 7.0.

### **4.4. Determinação da taxa de incidência e da sazonalidade da raiva em bovinos**

Foram calculadas as taxas de incidência da raiva em bovinos considerando os casos positivos e o rebanho bovino efetivo do Estado de Pernambuco.

As informações sobre a população bovina nos meses de maio e novembro, de 2007 a 2012, foram fornecidas pela Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária do Estado de Pernambuco (ADAGRO). Para os demais meses da série, a população bovina foi estimada usando o método aritmético (MALETTA, 1981) (Apêndice A).

Os coeficientes mensais de incidência de raiva, por 1.000.000 bovinos, foram obtidos pela relação entre o número de casos relatados e a população bovina no respectivo mês. Para melhor visualização das tendências, foram calculadas também as médias móveis trimestrais das taxas de incidência (THRUSFIELD, 2005).

Para avaliar a ocorrência de tendência de longo prazo, analisou-se inicialmente a normalidade dos dados dos coeficientes de incidência, pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como não se observou normalidade, empregou-se um método não paramétrico, teste de Wald-Wofowitz.

Para investigar se os coeficientes de incidência apresentam variação sazonal, empregou-se a análise de variância (MORETTIN; TOLOI, 2006), uma vez que o teste de Bartlett mostrou que as variâncias são homogêneas ( $P > 0,05$ ), e o teste de Shapiro-Wilk mostrou normalidade do resíduo ( $P > 0,05$ ).

A comparação entre as taxas de incidência observadas nas mesorregiões foi feita com base no teste exato de Fisher.

Os cálculos foram efetuados utilizando o software R (R Core Team, 2013), e para a elaboração dos gráficos foi usado o software Microsoft Excel.

#### **4.5. Caracterização molecular do vírus da raiva**

Os métodos moleculares foram desenvolvidos no Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP, em parceria com o College of Bioresources Sciences – CBS da Nihon University, Japão.

##### **4.5.1. Amostras de encéfalos utilizadas na caracterização molecular**

O material biológico foi cedido pela Coordenação da Raiva e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA, e pela Coordenação do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Pernambuco, conforme documento Informação CRHE n. 15/2013 de 08/03/13 (Anexo A).

As amostras de encéfalos de bovinos, oriundas do Estado de Pernambuco foram encaminhadas ao LANAGRO entre os anos de 2007 e 2012, e diagnosticadas como positivas para o vírus da raiva por meio das técnicas de IFD e IC. As amostras estavam armazenadas a -20°C e foram enviadas, via aérea, para o Laboratório de Epidemiologia e Diagnóstico da Raiva, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp.

Das 238 amostras recebidas, 16 foram separadas para os testes moleculares, sendo provenientes das mesorregiões Agreste, Mata e Sertão (Quadro 3).

**Quadro 3.** Amostras de encéfalos de bovinos submetidas à caracterização molecular, de acordo com a procedência e o ano de isolamento. Estado de Pernambuco, Brasil.

| <b>Código da amostra</b> | <b>Ano</b> | <b>Município</b> | <b>Mesorregião</b> |
|--------------------------|------------|------------------|--------------------|
| BrPEAG11571              | 2011       | Venturosa        | Agreste            |
| BRPEAG9837               | 2011       | Pedra            | Agreste            |
| BRPEAG 6191              | 2011       | Itaíba           | Agreste            |
| BRPEAG 11573             | 2011       | Venturosa        | Agreste            |
| BRPEAG 49                | 2011       | Belo jardim      | Agreste            |
| BRPEAG 1742              | 2011       | Garanhuns        | Agreste            |
| BRPEAM2812               | 2011       | Macaparana       | Mata               |
| BRPEAM11030              | 2011       | Timbaúba         | Mata               |
| BRPEAM 1402              | 2011       | Rio formoso      | Mata               |
| BRPEAM 1834              | 2011       | Quipapá          | Mata               |
| BRPEAM 5604              | 2011       | Timbaúba         | Mata               |
| BRPEAM 4448              | 2011       | Timbaúba         | Mata               |
| BRPESE 3292              | 2011       | Bodocó           | Sertão             |
| BRPESE261                | 2012       | Sertânia         | Sertão             |
| BRPESE 1281              | 2012       | Sertânia         | Sertão             |
| BRPESE 12362             | 2012       | Mirandiba        | Sertão             |

#### **4.5.2. Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para o gene N**

A partir das amostras de campo obtiveram-se as suspensões virais a 10%, que foram impregnadas em FTA cards (Whatman) para armazenagem a -20°C até o momento da extração.

Inicialmente, o material era coletado dos FTA cards com o Uni-core punch Harris, e o disco obtido era colocado em um tubo de 1,5 mL. Em seguida adicionavam-se 200 µL do tampão TE e procedia-se a incubação à temperatura ambiente (15°C a 25°C) por 30 minutos. Posteriormente, eram adicionados ao tubo 560 µL do tampão AVL em seguida 140 µL do tampão TE e homogeneizado em vortex por 15 segundos. Essa solução era incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, o tubo era centrifugado rapidamente para remover as gotas da parte interna da tampa. Adicionavam-se 560 µL de etanol, submetendo a vortex por 15 segundos e novamente à centrifugação para remover as gotas da parte interna da tampa. Cuidadosamente, 630 µL da mistura eram aplicados na

coluna QIAamp Mini, sem molhar o aro interno e, com a tampa fechada, centrifugava-se a 8000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, a coluna era transferida para um tubo limpo de 2 mL e o tubo contendo o filtrado era descartado. A coluna era aberta, aplicavam-se os 630  $\mu$ L restantes e novamente era realizado o procedimento anterior. Em seguida, cuidadosamente, eram adicionados 500  $\mu$ L de tampão de lavagem AW1 na coluna QIAamp Mini e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Após esse tempo, a coluna era inserida em um tubo limpo de 2 mL e o tubo contendo o filtrado, descartado. Posteriormente, adicionavam-se 500  $\mu$ L de tampão de lavagem AW2 na coluna sem molhar o aro interno e centrifugava-se a 14.000 rpm por 3 minutos. A coluna QIAamp Mini era novamente inserida em um tubo de 2 mL limpo e o tubo contendo o filtrado, descartado. A coluna era centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto e transferida para um tubo de 1,5 mL. Com cuidado, abria-se a coluna e adicionavam-se 60  $\mu$ L de tampão de eluição AVE. A coluna era incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto.

#### **4.5.3. Síntese de cDNA do gene N**

Para a amplificação do gene N foi utilizado o Kit Superscript One-Step RT-PCR with Platinum Taq® (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, U.S.A.). O senso é P1 e o antisenso é o P2. Foram utilizados: 12,5  $\mu$ L do RNA total extraído; 1  $\mu$ L do primer senso-P1 (10  $\mu$ M) e 1  $\mu$ L do primer antisenso-P2 (10  $\mu$ M) (Quadro 4); 0,5  $\mu$ L do mix RT/Platinum Taq; e 9  $\mu$ L de água destilada autoclavada, em uma reação com volume final de 25  $\mu$ L.

As reações eram realizadas em um termociclador PTC-0200 DNA Engine (MJ Research Inc., Waltham, MA, E.U.A.). As soluções eram incubadas a 50°C por 30 minutos, seguido de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos a 94°C por 15 segundos, 51°C por 30 segundos, e uma extensão a 68°C por 2 minutos.

Os produtos amplificados, referentes ao tamanho de banda do gene N, eram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão T.A.E 1x (Tris 10 mM; Acetato 0,1 M; EDTA 1 mM Ph 7,2), corado com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL), sob luz UV em equipamento de fotodocumentação. O produto de PCR era submetido a purificação utilizando-se o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha).



**Quadro 4.** Primers utilizados na síntese de cDNA do gene N do vírus da raiva.

| Primer | Sequência (Sentido 5' - 3') | Posição no genoma |
|--------|-----------------------------|-------------------|
| P1     | 5'CTACAATggATgCCgACAAG3'    | 66-86             |
| P2     | 5'CCCATATAACATCCAACAAAgTG3' | 1029-1007         |

#### 4.5.4. Sequenciamento

Os primers utilizados no sequenciamento estão descritos no Quadro 5.

Após a purificação, o produto era encaminhado para as reações de sequenciamento utilizando-se o kit Big Dye Terminator v3.1® (Applied Biosystems). O volume final de cada reação era de 20 µL, contendo: 2 µL de DNA purificado, 5µL tampão 5x, 3,2 µL dos primers (1µM) e 8,8 µL de água destilada autoclavada. A reação era processada em um termociclador nas seguintes condições: 25 ciclos de 96°C por 10s, 50°C por 5s e 60°C por 75s.

**Quadro 5.** Primers utilizados no sequenciamento do gene codificador da proteína N do vírus da raiva.

| Primer | Sequência                 | Posição no genoma |
|--------|---------------------------|-------------------|
| Nes-S  | 5' ATGGATGCCGACAAGATTGT3' | 71-90             |
| Nes-C  | 5'GCWATCAGGATTCCATAGCT3'  | 360-341           |

#### 4.5.5. Análise das sequências de DNA

Os dados do sequenciamento foram analisados com o software ABI Analysis Data Collection e convertidos em sequências de nucleotídeos por meio do DNA Sequencyng Analysis Software versão 3.3. Os eletroferogramas gerados foram submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998;

GREEN, 1996; GORDON et al., 1998), para verificação da sua qualidade, alinhamento e corte das extremidades.

#### **4.5.6. Análise filogenética**

A qualidade de bases dos eletroferogramas e as sequências consenso foram obtidas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; GREEN, 1996; GORDON et al., 1998). Para as análises filogenéticas, as sequências da proteína N do vírus da raiva contido nas amostras selecionadas foram comparadas com sequências da mesma porção gênica do vírus depositadas no banco de dados GenBank (NCBI) relativas a herbívoros, cães, humanos e morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros, e demais sequências que compuseram o grupo externo, referentes aos vírus MOKV, ABLV e EBLV1 (Quadro 6). Todas as sequências foram alinhadas por MUSCLE (EDGAR, 2004) utilizando-se o software MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013) (Apêndice B). O mesmo software foi empregado na determinação do modelo evolutivo mais adequado para ser aplicado às sequências do estudo nas análises bayesianas, segundo o critério de informação de Akaike (AIC) (POSADA; BUCKLEY, 2004). Dessa forma, a árvore filogenética foi gerada pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utilizando-se o modelo de substituição T92 (TAMURA, 1992), distribuição G+I e o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC), programado para executar as análises em quatro cadeias simultaneamente, sendo três quentes e uma fria. Foram realizadas quatro corridas independentes com 4.000.000 de gerações, sendo as cadeias amostradas a cada 200 gerações. Ao final das análises, obtendo-se desvio padrão menor do que 0,01, 25% das árvores geradas foram descartadas como burn-in. O filograma gerado foi editado graficamente pelo software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010) (Anexos 1 e 2).

**Quadro 6.** Sequências disponíveis no Genbank utilizadas para a construção da árvore filogenética, de acordo com o número de acesso e local de isolamento (município/Estado, espécie animal e ano)

| <b>Genbank</b> | <b>Ano</b> | <b>Espécie</b>           | <b>Município</b>            | <b>Estado</b> |
|----------------|------------|--------------------------|-----------------------------|---------------|
| AB206416       | 2003       | Molossus sp.             | Patos                       | PB            |
| AB675604       | 2002       | Bovino                   | Xinguará                    | PA            |
| AB675606       | 2001       | Bovino                   | Nova Crixas                 | GO            |
| AB675608       | 2000       | Bovino                   | Natividade                  | TO            |
| AB675612       | 2002       | Bovino                   | Nobres                      | MT            |
| AB206424       | 2003       | Bovino                   | Patos                       | PB            |
| AB206430       | 2003       | Bovino                   | Patos                       | PB            |
| AB675614       | 2002       | Bovino                   | Pirapozinho                 | SP            |
| AB675616       | 2000       | Bovino                   | Miguel Pereira              | RJ            |
| AB675617       | 2004       | Bovino                   | Itapecuru Mirim             | MA            |
| AB675618       | 2004       | Bovino                   | Nossa Senhora do Livramento | MT            |
| AB675620       | 2002       | Bovino                   | Nova América                | GO            |
| AB675626       | 2005       | Bovino                   | Godofredo Viana             | MA            |
| AB675629       | 2005       | Bovino                   | Cocalzinho de Goiás         | GO            |
| AB675630       | 2006       | Bovino                   | Itapaci                     | GO            |
| AB675631       | 2005       | Bovino                   | Bandeirantes                | MS            |
| AB623082       | 2004       | Bovino                   | São José do Bonfim          | PB            |
| AB623086       | 2005       | Bovino                   | Santa Luzia                 | PB            |
| AB623090       | 2006       | Bovino                   | Junco do Seridó             | PB            |
| AB623094       | 2007       | Bovino                   | Patos                       | PB            |
| AB623106       | 2007       | Bovino                   | Brejinho                    | PE            |
| AB623101       | 2008       | Bovino                   | Patos                       | PB            |
| AB623107       | 2008       | Bovino                   | Vitória de Stº Antão        | PE            |
| AB623110       | 2008       | Bovino                   | Venturosa                   | PE            |
| AB623112       | 2008       | Bovino                   | Venturosa                   | PE            |
| AB623114       | 2008       | Bovino                   | Venturosa                   | PE            |
| AB623117       | 2009       | Bovino                   | Lajedo                      | PE            |
| AB623077       | 2008       | Caprino                  | São Mamede                  | PB            |
| AB623076       | 2007       | Equino                   | Patos                       | PB            |
| AB623078       | 2004       | Ovino                    | Santa Terezinha             | PB            |
| KF805574       | 2009       | Bovino                   | Caldas                      | MG            |
| FJ649171       | 2001       | Bovino                   | Atibaia                     | SP            |
| AB201804       | 2000       | <i>Desmodus rotundus</i> | Lindoia                     | SP            |

|          |      |                           |                        |           |
|----------|------|---------------------------|------------------------|-----------|
| GQ160952 | 2008 | Bovino                    | Serra Negra            | SP        |
| FJ649157 | 2001 | Equino                    | Itapuã                 | SP        |
| GQ160921 | 2008 | Bovino                    | Belo Horizonte         | MG        |
| GQ160933 | 2008 | Bovino                    | Iacri                  | SP        |
| GQ160934 | 2008 | Bovino                    | Iacri                  | SP        |
| AB201805 | 2001 | <i>Desmodus rotundus</i>  | São José do Barreiro   | SP        |
| GQ160943 | 2008 | Bovino                    | Salesópolis            | SP        |
| GQ160913 | 2007 | Bovino                    | Itirapuã               | SP        |
| AB201802 | 2002 | <i>Desmodus rotundus</i>  | Dracena                | SP        |
| AB201808 | 2001 | <i>Nyctinomops ssp.</i>   | São José do Rio Preto  | SP        |
| AB297628 | 2004 | <i>Artibeus sp</i>        | Mesquita               | RJ        |
| AB297631 | 2004 | <i>Artibeus lituratus</i> | Vargem Grande Paulista | SP        |
| AB297635 | 2003 | <i>Desmodus rotundus</i>  | Tambaú                 | SP        |
| AB297638 | 2005 | <i>Desmodus rotundus</i>  | Cocalzinho de Goiás    | GO        |
| AB297642 | 2005 | <i>Desmodus rotundus</i>  | Niquelândia            | GO        |
| AB297644 | 2006 | <i>Desmodus rotundus</i>  | Nova Iguaçu de Goiás   | GO        |
| EF363748 | 2004 | Humano                    | Portel                 | PA        |
| EF363752 | 2005 | Humano                    | Augusto Corrêa         | PA        |
| EU159381 | 2005 | Canino                    | Sem informação         | China     |
| EU086205 | 2004 | Canino                    | Sem informação         | Filipinas |
| JX944599 | 2010 | Canino                    | Sem informação         | Nepal     |
| JX944572 | 2010 | Bovino                    | Sem informação         | Nepal     |
| AB357291 | 2001 | Bovino                    | Sem informação         | SP        |
| AB083811 | 1999 | Bovino                    | Sem informação         | TO        |
| AB083814 | 1999 | Bovino                    | Sem informação         | MT        |

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Distribuição temporal dos casos de raiva em bovinos

No período de 2007 a 2012 foram diagnosticadas 238 amostras positivas para o vírus da raiva em herbívoros, no Estado de Pernambuco, por meio de análises laboratoriais no LANAGRO em Recife/PE. A tabela 1 demonstra a distribuição dos casos de raiva em bovinos, mês a mês, no período estudado.

**Tabela 1.** Número de casos de raiva bovina diagnosticados pelo LANAGRO, período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.

| Ano          | Mês |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Total |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
|              | JAN | FEV | MAR | ABR | MAI | JUN | JUL | AGO | SET | OUT | NOV | DEZ |       |
| <b>2007</b>  | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 7   | 3   | 3   | 3   | 9   | 5   | 4   | 35    |
| <b>2008</b>  | 8   | 10  | 5   | 8   | 4   | 3   | 4   | 3   | 4   | 13  | 4   | 5   | 71    |
| <b>2009</b>  | 9   | 4   | 1   | 7   | 9   | 3   | 4   | 3   | 5   | 5   | 3   | 3   | 56    |
| <b>2010</b>  | 5   | 3   | 4   | 5   | 2   | 4   | 2   | 3   | 2   | 5   | 1   | 3   | 39    |
| <b>2011</b>  | 1   | 4   | 4   | 3   | 2   | 1   | 2   | 1   | 3   | 3   | 4   | 1   | 29    |
| <b>2012</b>  | 2   | 2   | 2   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 8     |
| <b>Total</b> | 25  | 24  | 16  | 24  | 17  | 18  | 15  | 13  | 17  | 35  | 17  | 17  | 238   |

Conforme os dados analisados, constatou-se que 100% das amostras diagnosticadas positivas para raiva eram da espécie bovina. De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no período de 2000 a 2012, foram registrados 29.865 casos de herbívoros positivos para a raiva no país e, deste total, 27.218 (91,13%) eram de bovinos.

Os estudos epidemiológicos sobre raiva em herbívoros no país relatam maior ocorrência da raiva em bovinos, seguida de equinos. Segundo Neves (2008), que analisaram laboratorialmente 2.467 amostras do Estado do Mato Grosso do Sul, no período de 1998 a 2006, dos 584 diagnósticos positivos, 533 foram da espécie bovina. Santos et al. (2009) realizaram uma caracterização da raiva em herbívoros

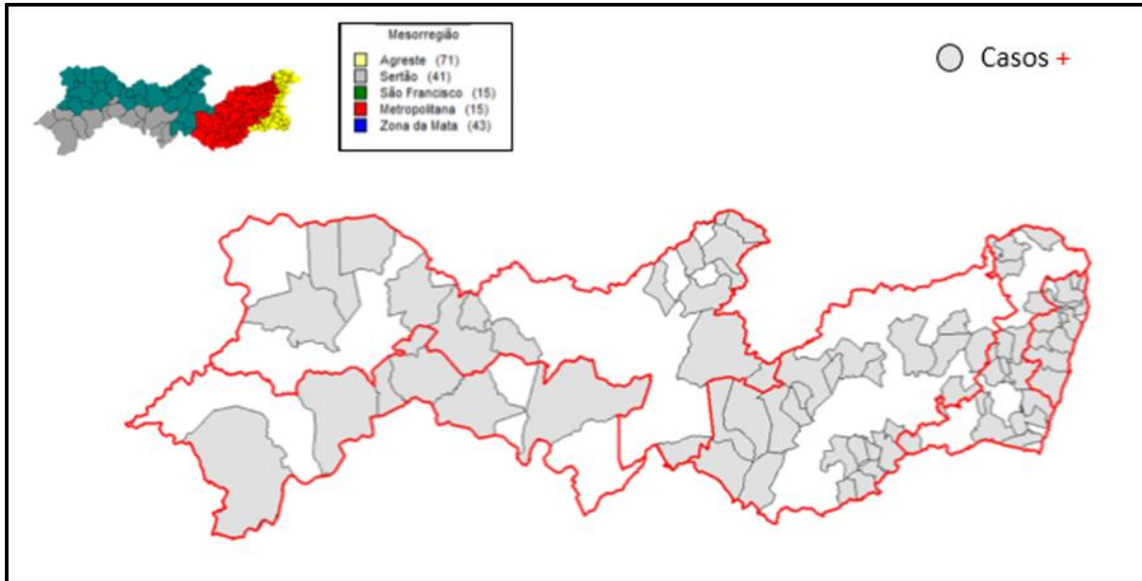
no Estado da Bahia, e constataram que dos 81 casos de raiva em herbívoros no período estudado, a maioria ocorreu na espécie bovina, ou seja, 87,3% (67/81). Póvoas et al. (2012) avaliaram 193 amostras de herbívoros (174 de bovinos, 9 de equinos, 4 de asininos, 3 de ovinos, 2 de caprinos e 1 de muar) no Estado do Maranhão e observaram que, das 69 amostras positivas, 63 também eram de bovinos.

Observou-se no presente estudo que, apesar de o Estado de Pernambuco ser detentor do segundo maior rebanho de caprinos do país, não foi diagnosticado nenhum caso de raiva nessa espécie, no período estudado. Rodriguez et al. (2007) afirmam que a ocorrência da enfermidade em caprinos na região Nordeste representa uma parte significativa dos diagnósticos positivos; contrariando essa afirmação, alguns autores relatam que a raiva é uma doença rara em caprinos e ovinos (GOMES, 2004; LIMA et al., 2005).

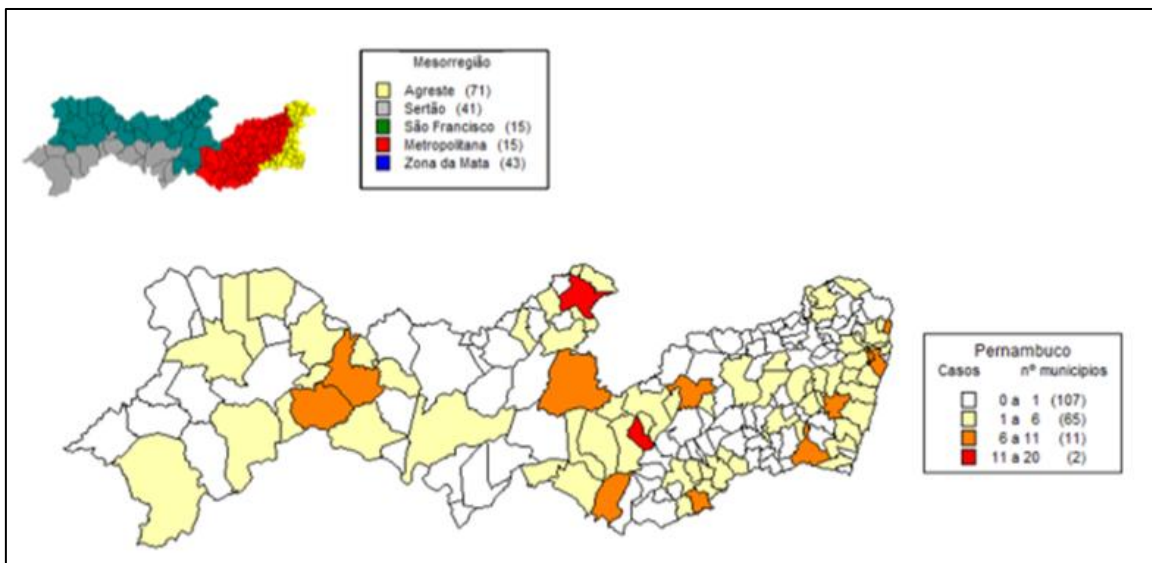
Essa maior ocorrência da raiva nos bovinos provavelmente se deve ao fato de a população ser superior à de outras espécies de herbívoros e ao tipo de manejo realizado, tornando-os uma presa fácil para o morcego hematófago. Também é possível que o quantitativo de casos seja reduzido em outras espécies de herbívoros pelo fato de normalmente os produtores rurais não notificarem casos em outras espécies, muitas vezes por falta de conhecimento e por falhas nas ações do Programa Estadual de Controle da Raiva.

## **5.2. Distribuição espacial dos casos de raiva em bovinos**

Pela análise da distribuição espacial dos focos de raiva por mesorregiões no período de 2007 a 2012, constatou-se que os mesmos estão presentes em todas as mesorregiões, em 78 dos 185 municípios do Estado de Pernambuco (Figuras 2 e 3).

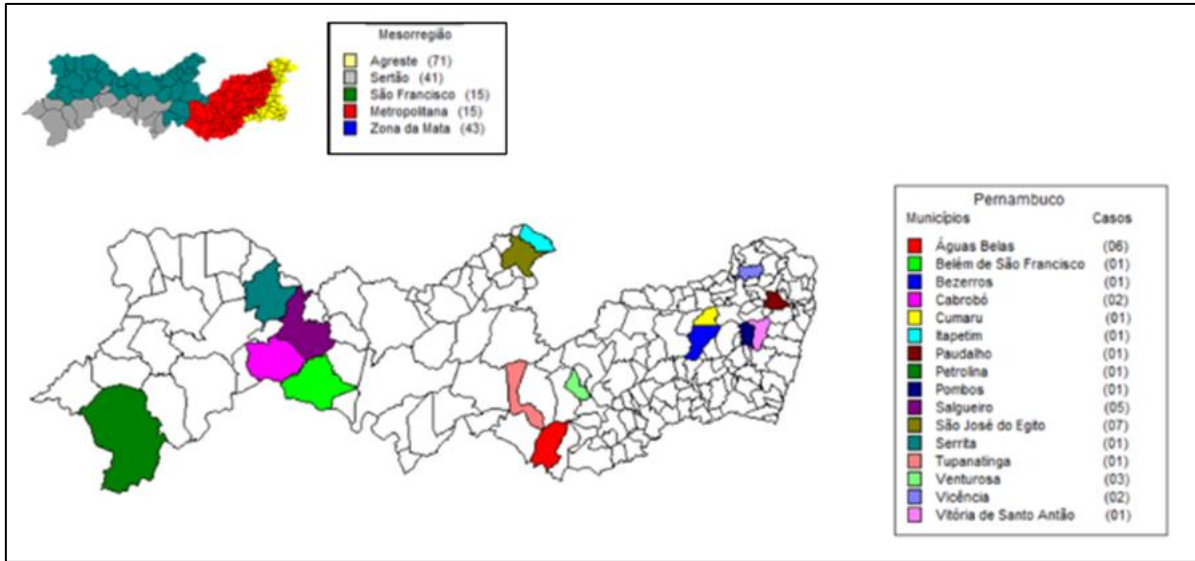


**Figura 2.** Distribuição espacial dos focos de raiva em bovinos, por mesorregiões, no Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2007 a 2012.

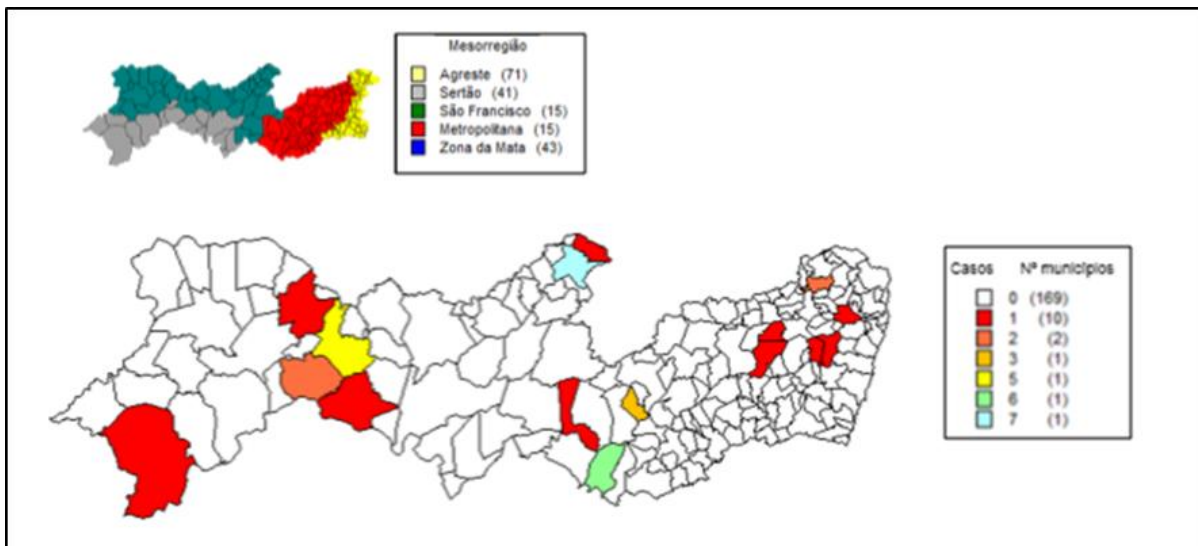


**Figura 3.** Distribuição espacial dos casos de raiva em bovinos, por municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2007 a 2012.

**Ano de 2007-** Observando-se a ocorrência da raiva, constatou-se que no ano de 2007 foram atingidos 16 (8,6%) dos 185 municípios do Estado de Pernambuco. Os focos estavam distribuídos em 6 (8,5%) dos 71 municípios da Mesorregião do Agreste de Pernambuco, em 4 (9,3%) dos 43 municípios da Mesorregião da Mata, em 3 (20%) dos 15 municípios da mesorregião de São Francisco, em 3 (7,3%) dos 41 municípios da mesorregião do Sertão (Figuras 4 e 5).



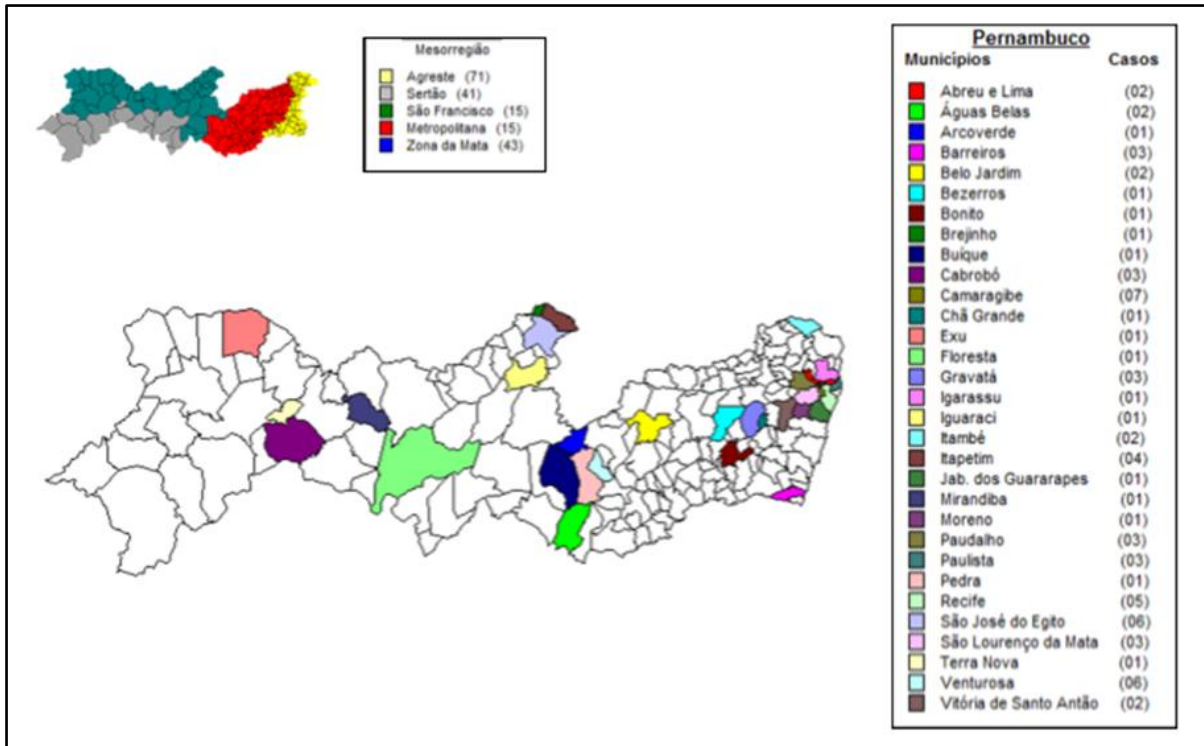
**Figura 4.** Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2007.



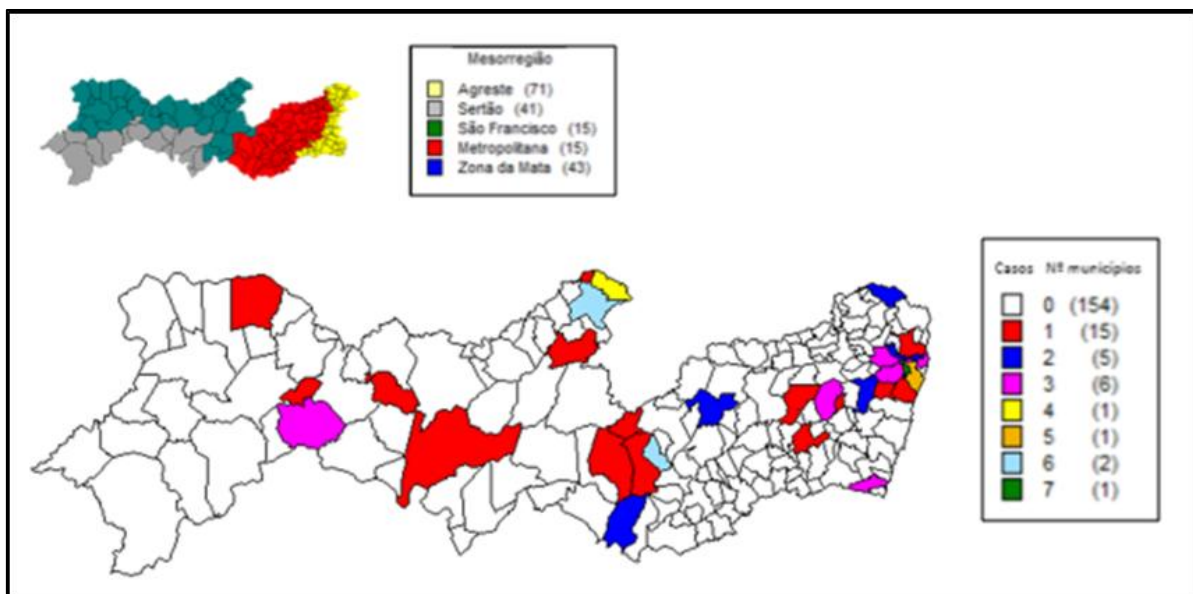
**Figura 5.** Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2007.

**Ano de 2008** - os focos de raiva distribuíram-se em 31 (17%) dos 185 municípios do Estado de Pernambuco. Ocorreram em 8 (11,3%) dos 71 municípios da mesorregião do Agreste de Pernambuco, em 5 (11,3%) dos 43 municípios da mesorregião da Mata, em 8 (53,3%) dos 15 municípios da mesorregião Metropolitana, em 2 (13,3%) dos 15 municípios da mesorregião de São Francisco, em 8 (19,5%) dos 41 municípios da mesorregião do Sertão (Figuras 6 e 7).



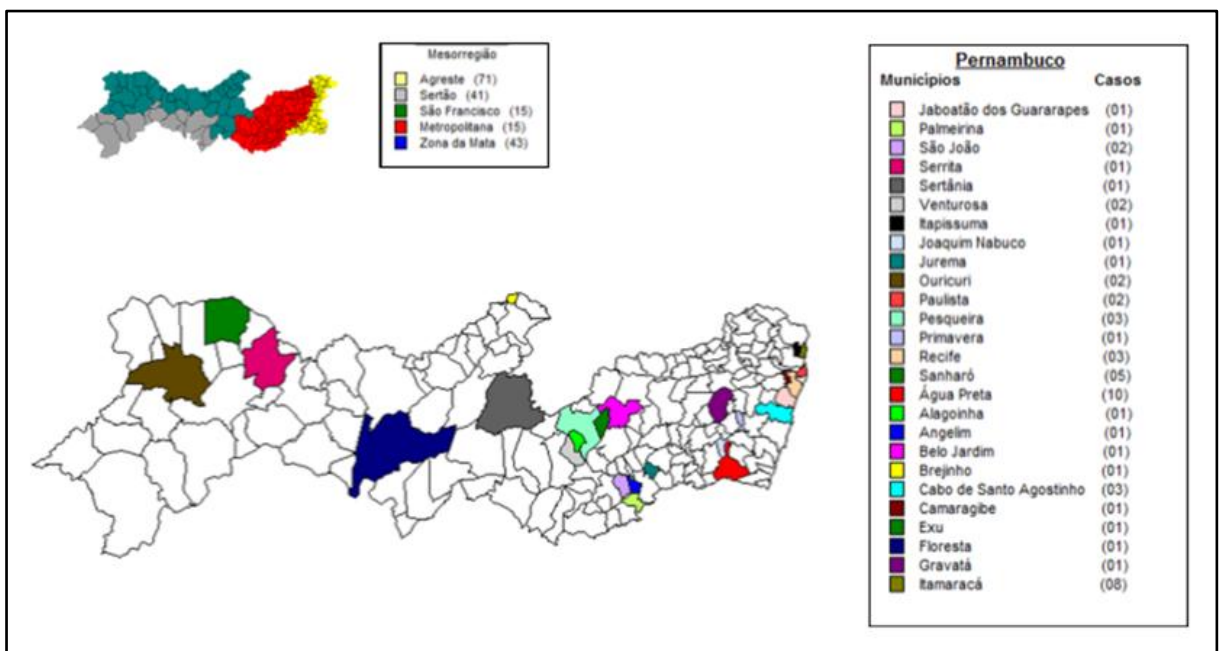


**Figura 6.** Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2008.

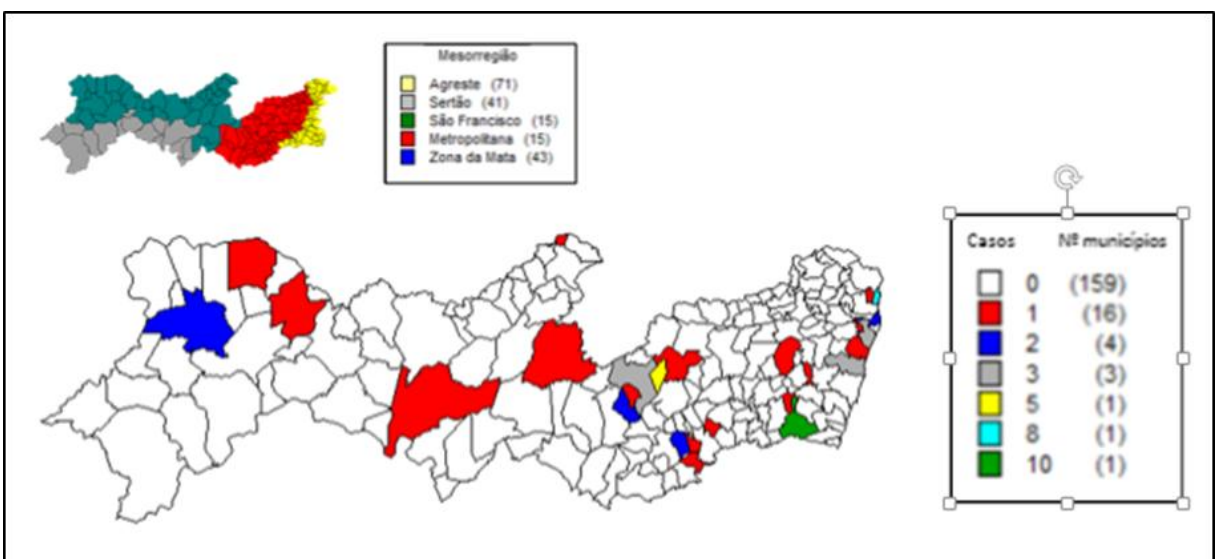


**Figura 7.** Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2008.

**Ano de 2009** - observa-se que foram atingidos pelo vírus da raiva 26 (14%) dos 185 municípios dos Estado. Ocorreram focos em 10 (14,3%) dos 71 municípios da mesorregião do Agreste de Pernambuco, em 3 (7%) dos 43 municípios da mesorregião da Mata, em 7 (46,7%) dos 15 municípios da mesorregião Metropolitana, em 1 (6,7%) dos 15 municípios da mesorregião de São Francisco, em 5 (12,2%) municípios dos 41 da mesorregião do Sertão (Figuras 8 e 9).

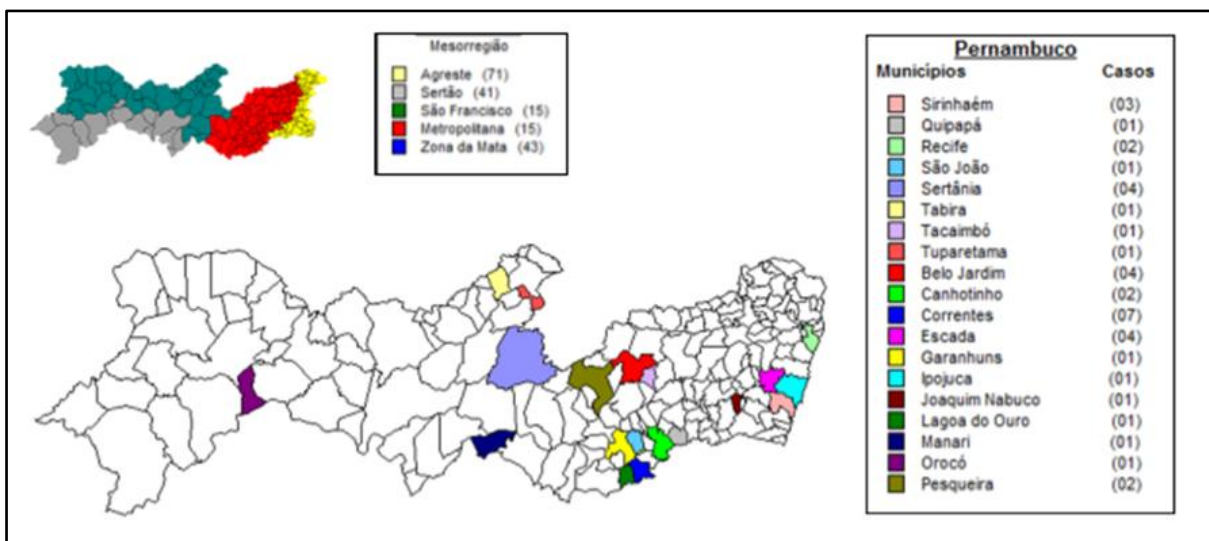


**Figura 8.** Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2009

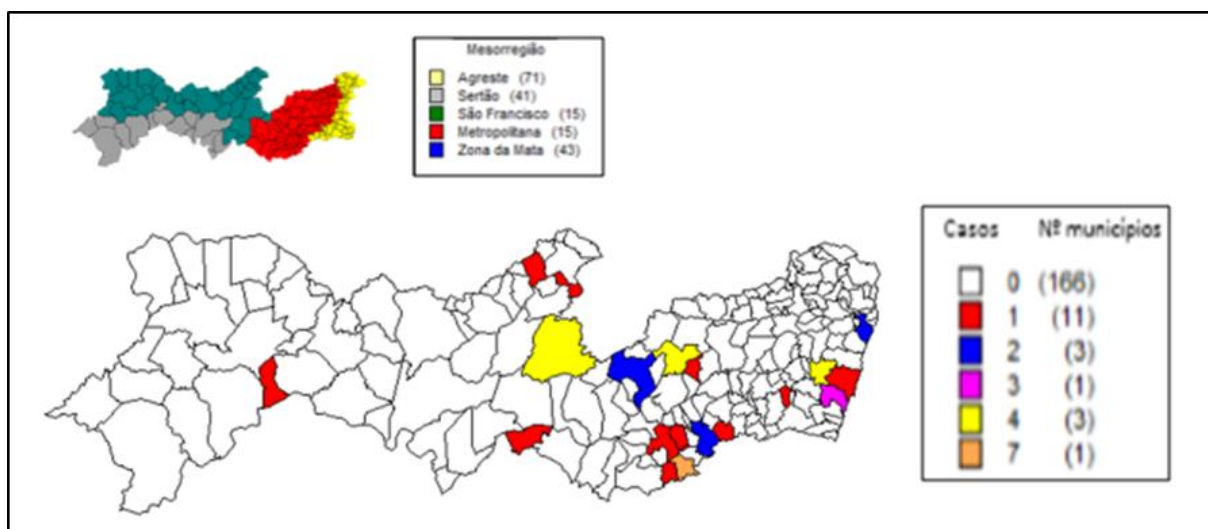


**Figura 9.** Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2009.

**Ano de 2010** - constatou-se que os focos estavam distribuídos em 19 (10%) dos 185 municípios do Estado. Foram atingidos 8 (11,3%) dos 71 municípios da Mesorregião do Agreste de Pernambuco, em 4 (9,3%) dos 43 municípios da Mesorregião da Mata, em 2 (13,3%) dos 15 municípios da mesorregião metropolitana, em 1 (6,7%) dos 15 municípios da mesorregião de São Francisco, em 4 (9,8%) dos 41 municípios da mesorregião do Sertão (Figuras 10 e 11).

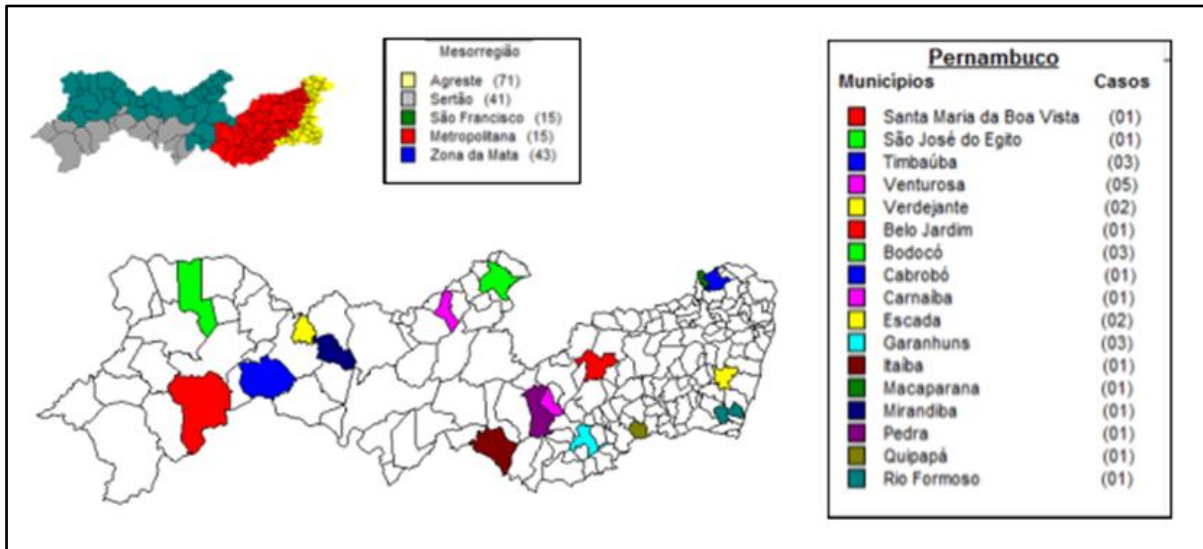


**Figura 10.** Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2010.

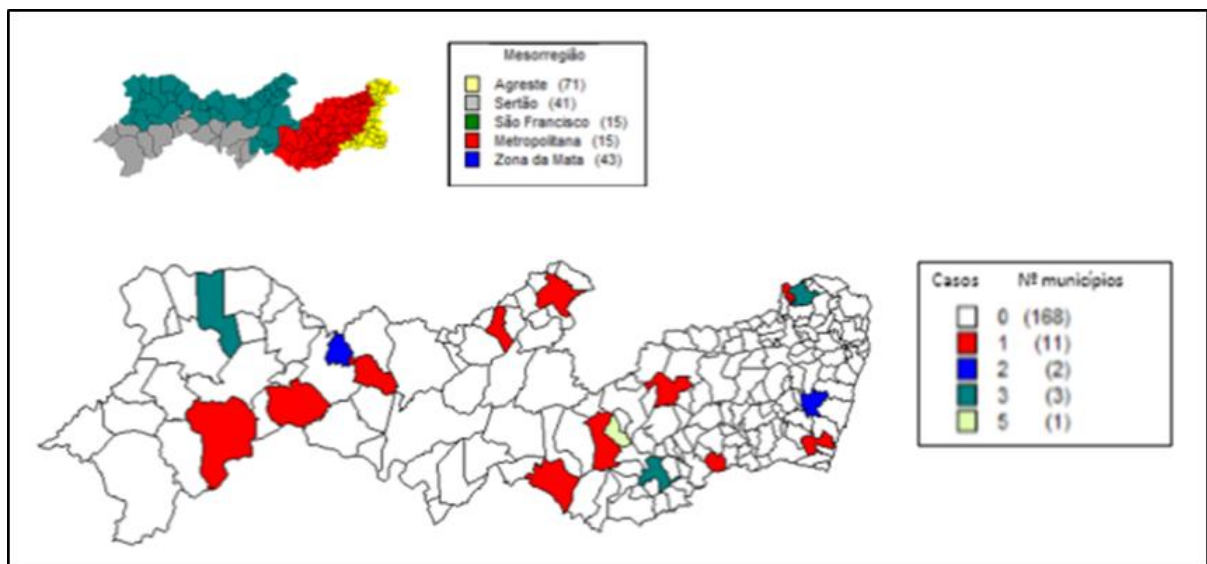


**Figura 11.** Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2010.

**Ano de 2011** - constatou-se a ocorrência de focos em 17 (9%) dos 185 municípios do Estado, distribuídos em 5 (7%) dos 71 municípios da Mesorregião do Agreste de Pernambuco, em 5 (4,6%) dos 43 municípios da Mesorregião da Mata, em 2 (13,3%) dos 15 municípios da mesorregião de São Francisco, em 5 (12,2%) dos 41 municípios da mesorregião do Sertão (Figuras 12 e 13).



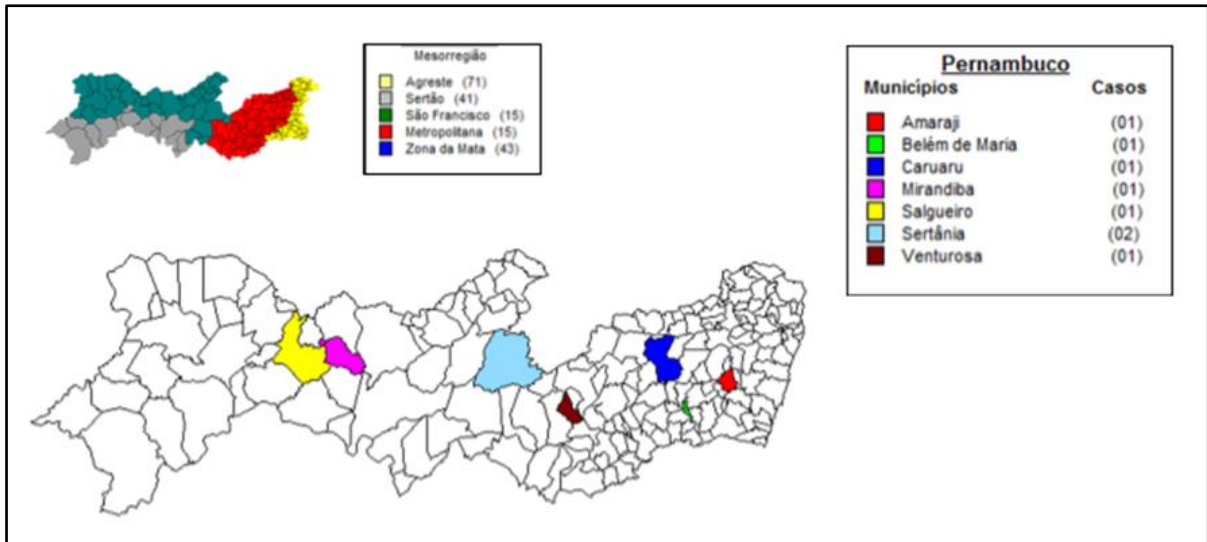
**Figura 12.** Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2011.



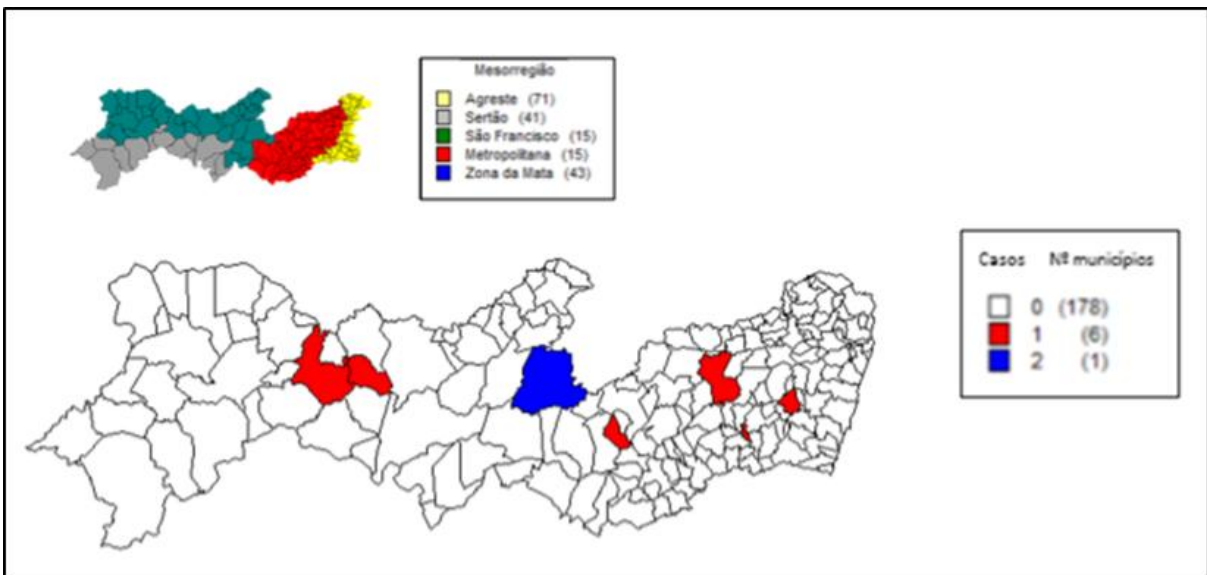
**Figura 13.** Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2011.



**Ano de 2012** - foram atingidos pela enfermidade 7 (4%) dos 185 municípios do Estado. Os focos ocorreram em 3 (4,2%) dos 71 municípios da Mesorregião do Agreste de Pernambuco, em 2 (4,7%) dos 43 municípios da Mesorregião da Mata, em 2 (4,9%) dos 41 municípios da mesorregião do Sertão (Figuras 14 e 15).



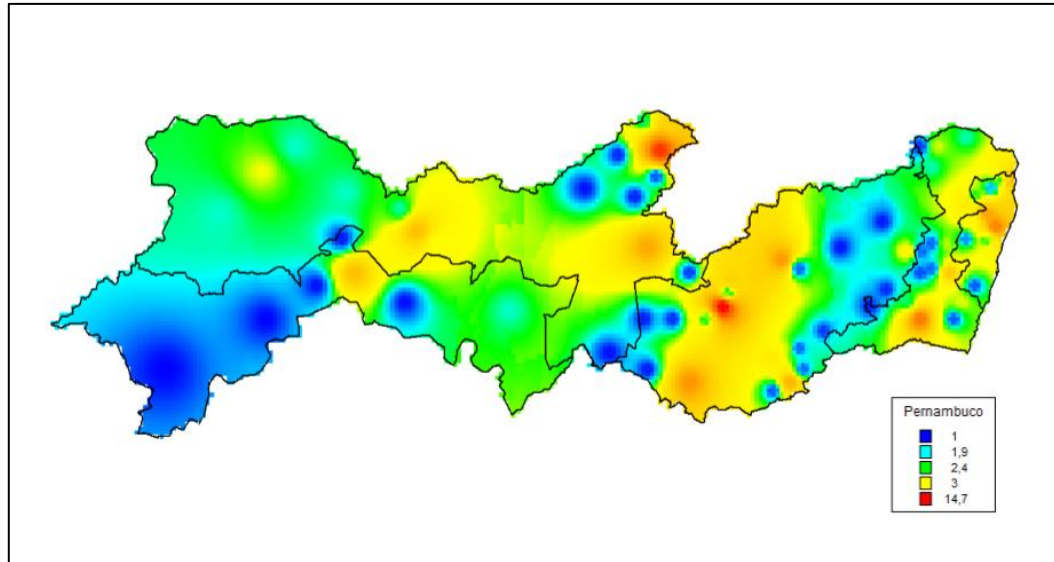
**Figura 14.** Distribuição espacial de municípios com casos de raiva em bovinos, no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2012.



**Figura 15.** Distribuição espacial do número de casos positivos para raiva em bovinos nos municípios, no Estado de Pernambuco, Brasil, 2012.

Na figura 16, pelo Mapa de kernel, observa-se que a concentração de casos de raiva na superfície ocorreu nas mesorregiões da Mata, Agreste, Sertão e Metropolitana. Porém, a maior concentração de municípios com casos positivos está

localizada nas mesorregiões do Agreste e Sertão. Essa maior quantidade de casos pode ser atribuída ao fato de essas regiões possuírem, juntas, a maior população de bovinos do Estado.



**Figura 16.** Concentração de casos de raiva na superfície, de acordo com mesorregiões e municípios do Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2007 a 2012.

É evidente que no período estudado há uma diminuição dos casos de raiva no decorrer dos anos; porém, ao analisar os municípios atingidos, observa-se que alguns apresentaram focos em quase todos os anos (Tabela 2; Figuras 4 a 14).

Considerando o Município de Venturosa, onde só não ocorreram casos positivos no ano de 2010 (Figura 10): está localizado na mesorregião do Agreste e faz limite ao norte com os municípios de Alagoinha, que apresentou foco no ano de 2009 (Figura 8), e de Pesqueira, que apresentou positividade em 2009 e 2010 (Figuras 6 e 12); ao sul com Caetés, que não apresentou nenhum foco; a oeste com Garanhuns, que apresentou casos positivos nos anos de 2010 e 2011 (Figuras 10 e 12) e com Capoeira, que não teve focos. O Município de Pedra faz limite com Venturosa ao norte e a leste e foi atingido nos anos de 2008 e 2011. Esse panorama sugere uma área silenciosa, sem ações eficientes de controle da raiva em herbívoros, o que é preocupante, visto que nessa região está inserida a bacia leiteira do Estado de Pernambuco, que, segundo o IBGE (2015), ocupa o 8º lugar na produção de leite do país.

**Tabela 2.** Distribuição dos focos de raiva bovina, por mesorregiões, no período de 2007 a 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.

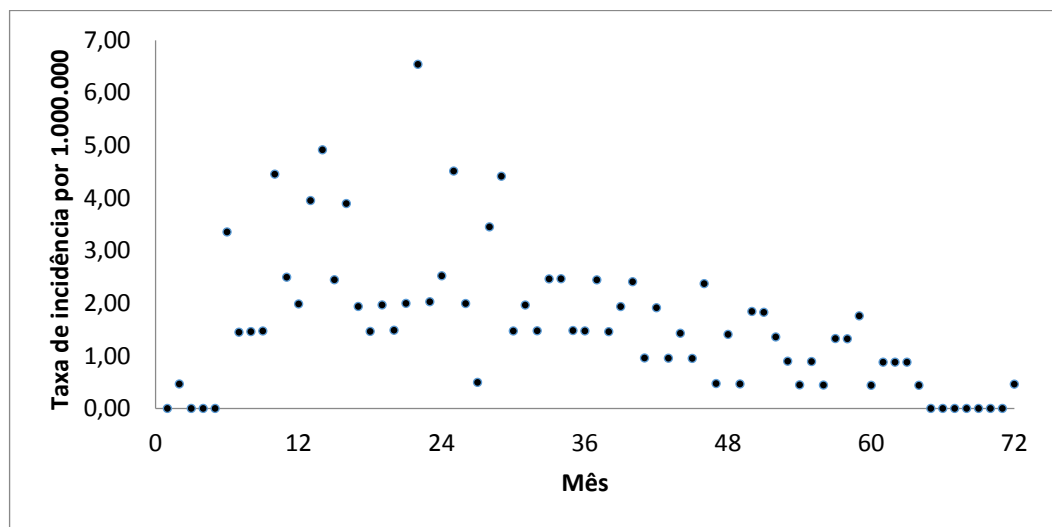
| Ano                           | 2007                     | 2008      | 2009       | 2010      | 2011      | 2012     |
|-------------------------------|--------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|----------|
| Mesorregião<br>(nº de munic.) | Número de municípios (%) |           |            |           |           |          |
| Agreste (71)                  | 6 (8,5%)                 | 8 (11,3%) | 10 (14,3%) | 8 (11,3%) | 5 (7%)    | 3 (4,2%) |
| Mata (43)                     | 4 (9,5%)                 | 5 (11,3%) | 3 (7%)     | 4 (9,3%)  | 5 (4,6%)  | 2 (4,7%) |
| São Francisco (15)            | 3 (20%)                  | 2 (13,3%) | 1 (6,7%)   | 1 (6,7%)  | 2 (13,3%) | -----    |
| Sertão (41)                   | 3 (7,3%)                 | 8 (19,5%) | 5 (12,2%)  | 4 (9,8%)  | 5 (12,2%) | 2 (4,9%) |
| Metropolitana (15)            | -----                    | 8 (53,3%) | 7 (46,7%)  | 2 (13,3%) | -----     | -----    |
| Total (185)                   | 16 (8,6%)                | 31 (17%)  | 26 (14%)   | 19 (10%)  | 17 (9%)   | 7 (4%)   |

### 5.3. Taxas de incidência e sazonalidade da raiva dos bovinos

As taxas de incidência da raiva dos bovinos nos anos de 2007 a 2012, no Estado de Pernambuco, estão expressas na tabela 3 e na figura 17.

**Tabela 3.** Taxa de incidência (por 1.000.000) de raiva bovina, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.

| Ano  | Mês  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|      | JAN  | FEV  | MAR  | ABR  | MAI  | JUN  | JUL  | AGO  | SET  | OUT  | NOV  | DEZ  |
| 2007 | 0,00 | 0,46 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,35 | 1,45 | 1,46 | 1,47 | 4,45 | 2,49 | 1,99 |
| 2008 | 3,95 | 4,91 | 2,45 | 3,89 | 1,94 | 1,46 | 1,97 | 1,49 | 2,00 | 6,54 | 2,03 | 2,52 |
| 2009 | 4,51 | 1,99 | 0,50 | 3,45 | 4,41 | 1,47 | 1,97 | 1,48 | 2,46 | 2,46 | 1,48 | 1,47 |
| 2010 | 2,44 | 1,46 | 1,94 | 2,41 | 0,96 | 1,91 | 0,95 | 1,43 | 0,95 | 2,37 | 0,47 | 1,41 |
| 2011 | 0,46 | 1,84 | 1,83 | 1,36 | 0,90 | 0,45 | 0,89 | 0,44 | 1,33 | 1,32 | 1,76 | 0,44 |
| 2012 | 0,88 | 0,88 | 0,88 | 0,44 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,46 |



**Figura 17.** Taxa de incidência (por 1.000.000) de raiva bovina no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.



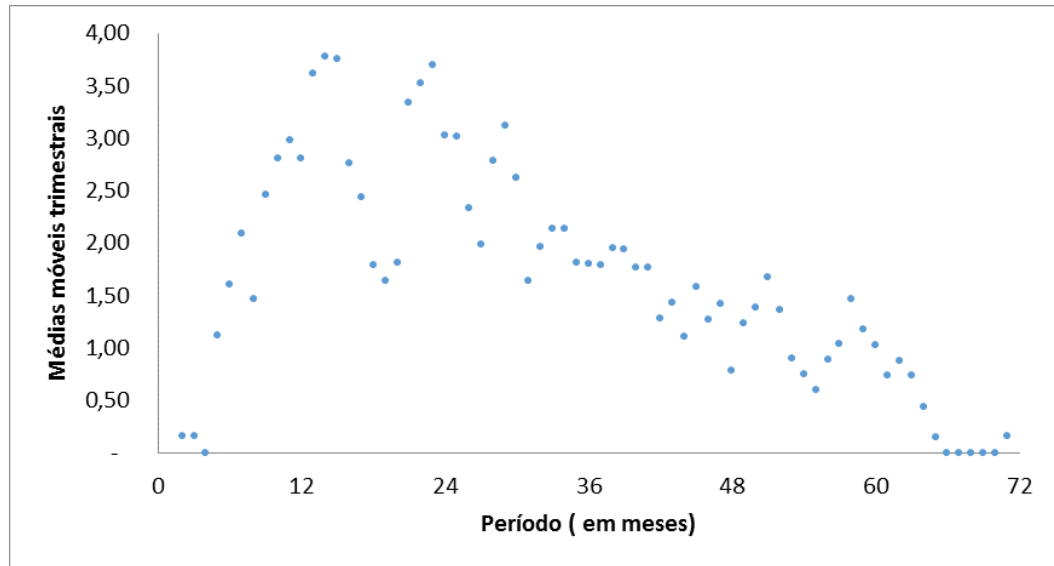
A figura 17 permite observar aumento na taxa de incidência até o final do segundo ano, seguido de acentuada redução até o final do período analisado. A figura 18, com as médias móveis trimestrais da taxa de incidência, mostra com mais clareza o aumento da incidência no início do período e a redução no final. No conjunto da série, constata-se tendência de redução significativa na taxa de incidência, pelo teste não paramétrico de Wald-Wofowitz ( $P = 3,52 \times 10^{-7}$ ).

A redução na taxa de incidência pode estar relacionada a uma melhoria das ações do Programa de Controle da Raiva dos Herbívoros, devido ao aumento da vacinação dos herbívoros, a captura e tratamento de morcegos hematófagos com pasta vampiricida, e a diminuição de casos clínicos. Mas também podem estar ocorrendo falhas na vigilância epidemiológica e, com isso, o aumento das áreas silenciosas. É importante salientar que a subnotificação é uma realidade no país. Segundo Kotait et al. (1998), para cada caso notificado, 10 outros não o são, o que torna quase impossível avaliar as perdas reais com essa enfermidade e dificultam as ações do programa de controle. De acordo com Matta et al. (2010b), essa lacuna no programa pode ocorrer devido a problemas de logística e a falta de pessoal.

Também foram calculadas as médias móveis trimestrais da taxa de incidência, demonstradas na tabela 4 e na figura 18.

**Tabela 4.** Médias móveis trimestrais da taxa de incidência mensal (por 1.000.000) de raiva bovina, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.

| Ano  | Mês   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |
|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
|      | JAN   | FEV  | MAR  | ABR  | MAI  | JUN  | JUL  | AGO  | SET  | OUT  | NOV  | DEZ   |
| 2007 | ----- | 0,15 | 0,15 | 0,00 | 1,12 | 1,60 | 2,09 | 1,46 | 2,46 | 2,81 | 2,98 | 2,81  |
| 2008 | 3,62  | 3,77 | 3,75 | 2,76 | 2,43 | 1,79 | 1,64 | 1,82 | 3,34 | 3,52 | 3,70 | 3,02  |
| 2009 | 3,01  | 2,33 | 1,98 | 2,79 | 3,11 | 2,62 | 1,64 | 1,97 | 2,13 | 2,14 | 1,81 | 1,80  |
| 2010 | 1,79  | 1,95 | 1,93 | 1,77 | 1,76 | 1,28 | 1,43 | 1,11 | 1,58 | 1,27 | 1,42 | 0,78  |
| 2011 | 1,24  | 1,38 | 1,68 | 1,36 | 0,90 | 0,75 | 0,59 | 0,89 | 1,03 | 1,47 | 1,17 | 1,03  |
| 2012 | 0,73  | 0,88 | 0,73 | 0,44 | 0,15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,15 | ----- |



**Figura 18.** Médias móveis trimestrais da taxa de incidência mensal (por 1.000.000) de raiva bovina, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.

A observação das figuras 17 e 18 sugere que não há variação sazonal, uma vez que não se constata aumento da taxa de incidência que se repita de forma sistemática na mesma época do ano. A ausência de sazonalidade é confirmada pela análise de variância, a qual apontou não haver diferença significativa entre as taxas de incidência segundo o mês ( $P = 0,6243$ ).

Resultados semelhantes de análise de sazonalidade foram encontrados por Póvoas et al. (2012) que, ao realizarem análise epidemiológica no Estado do Maranhão, não observaram a ocorrência de casos de raiva em épocas específicas do ano, e por Gomes e Monteiro (2011), que também não identificaram em seu estudo uma relação entre a sazonalidade e a raiva bovina.

Entretanto, alguns estudos confirmaram uma tendência à sazonalidade na raiva, com a maioria dos casos ocorrendo na primavera e no verão (PEREIRA et al., 2011; BATISTA et al., 2007). Menezes et al. (2008), no Estado de Minas Gerais, observaram que a maior incidência da raiva ocorreu nos meses de março a agosto, com a maioria dos casos no final do período chuvoso e início do período seco; os autores sugeriram que essa tendência pode sofrer influência tanto das condições climáticas quanto da oferta de alimento e abrigo para os morcegos hematófagos.

A distribuição da raiva em herbívoros está diretamente ligada a alterações ambientais (BRASIL, 2009), que determinam o comportamento dos morcegos. Não haverá sazonalidade se os morcegos não conseguirem realizar o movimento de ida e volta para lugares mais secos ou mais úmidos (GOMES et al., 2011). Concordando com essa afirmação anterior, alguns estudos apontam que as epidemias nas épocas chuvosas e secas dependem do deslocamento dos morcegos à procura de novos abrigos.

Kobayashi et al. (2008) afirmaram que os padrões de distribuição dos morcegos hematófagos, no Brasil, estão associados às variações climáticas, montanhas e rios que afetam a ecologia dos morcegos. As regiões montanhosas são mais propícias para a localização de abrigos de morcegos, e normalmente nessas áreas as temperaturas são mais baixas e com maiores índices pluviométricos (Kotait et al., 2003).

#### 5.4. Taxa de incidência da raiva bovina por mesorregião

Analisando a taxa de incidência da raiva de acordo com a mesorregião no período de 2007 a 2012 (Tabela 5), observa-se que, em 2009, a mesorregião Metropolitana continuou apresentando a maior incidência (22,31), e a mesorregião do Sertão a menor taxa (0,92). No ano de 2010, a mesorregião Mata teve a maior (8,88), e a mesorregião Sertão a menor incidência (1,00).

**Tabela 5.** Taxa de incidência (por 100.000.000) de raiva bovina, de acordo com a mesorregião e o ano de ocorrência, no período de 2007 a 2012, no Estado de Pernambuco, Brasil.

| Mesorregião          | 2007              | 2008                | 2009               | 2010                | 2011                | 2012              |
|----------------------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| <b>Agreste</b>       | 1,50 <sup>a</sup> | 1,50 <sup>a</sup>   | 1,61 <sup>a</sup>  | 1,68 <sup>a</sup>   | 1,97 <sup>a</sup>   | 0,23 <sup>a</sup> |
| <b>Mata</b>          | 5,37 <sup>b</sup> | 11,60 <sup>b</sup>  | 12,85 <sup>b</sup> | 8,88 <sup>b</sup>   | 17,13 <sup>b</sup>  | 1,81 <sup>a</sup> |
| <b>Metropolitana</b> | 0,00 <sup>a</sup> | 26,69 <sup>c</sup>  | 22,31 <sup>b</sup> | 3,69 <sup>a,b</sup> | 0,00 <sup>a</sup>   | 0,00 <sup>a</sup> |
| <b>São Francisco</b> | 5,41 <sup>b</sup> | 5,24 <sup>b,d</sup> | 1,22 <sup>a</sup>  | 1,15 <sup>a</sup>   | 4,90 <sup>a,b</sup> | 0,00 <sup>a</sup> |
| <b>Sertão</b>        | 1,45 <sup>a</sup> | 2,55 <sup>a,d</sup> | 0,92 <sup>a</sup>  | 1,00 <sup>a</sup>   | 2,44 <sup>a</sup>   | 0,42 <sup>a</sup> |

Letra igual na coluna indica diferença não significativa ( $P > 0,05$ ).

No ano de 2011, a mesorregião Mata continuou com a maior incidência (17,13), enquanto na Metropolitana a taxa de incidência foi zero. Já em 2012, a

mesorregião Mata também apresentou a maior taxa (1,81), enquanto Metropolitana e São Francisco tiveram taxas zero.

Ao analisar estes dados, observa-se que no decorrer do período a maior taxa de incidência ocorreu no ano de 2008 na mesorregião Metropolitana, e nos anos posteriores a incidência foi diminuindo nessa mesorregião, sugerindo que as ações de controle foram efetivas. Porém, a mesorregião da Mata apresentou oscilação nas taxas de incidência no período analisado, o que sugere que esta seja uma área endêmica no Estado e que necessita de um plano de controle populacional de morcegos hematófagos mais efetivo, com a utilização de métodos seletivos diretos e indiretos. Essas técnicas baseiam-se nos hábitos dos morcegos hematófagos e o ideal é que sejam associadas, aumentando a eficácia do controle populacional.

Constatou-se que, no período analisado no presente estudo, apenas no ano de 2012 não foi observado diferença significativa entre as taxas de incidência nas mesorregiões. As taxas na mesorregião da Mata, em todos os anos estudados, foram significativamente maiores que as taxas de incidência da Mesorregião Sertão e da Mesorregião Agreste. Isso pode estar relacionado à existência de abrigos de morcegos; talvez essa região apresente condições ambientais e climáticas que favoreçam o maior número de abrigos. Isso sugere que esta seja uma área propícia para a manutenção da enfermidade.

### **5.5. Análise filogenética do gene N**

Pelo sequenciamento do gene N, confirmou-se a positividade para o vírus da raiva das 16 amostras de bovinos do Estado de Pernambuco. As sequências obtidas neste estudo, com 820pb em média, apresentaram identidade de 99% com sequências do vírus da raiva depositadas no Genbank.

Pela análise filogenética, observou-se que as amostras do estudo foram homólogas à sequências de vírus da raiva, relacionadas à linhagem de morcego hematófago *Desmodus rotundus*.

De acordo com Ito et al. (2001), no Brasil circulam variantes de vírus da raiva pertencentes a pelo menos dois grupos de genótipos diferentes, e esses dois grupos são mantidos de forma independente entre cães e morcegos hematófagos. Esse resultado confirma a importância do *Desmodus rotundus* na manutenção da raiva,

no ambiente rural do Estado de Pernambuco, visto que esta espécie é considerada a principal transmissora do vírus da raiva aos herbívoros.

Outros estudos realizados no Brasil com isolados de herbívoros encontraram resultados semelhantes. Mochizuki et al. (2012) realizaram uma análise filogenética em isolados pertencentes aos Estados de Pernambuco e Paraíba e constataram que todos as amostras analisadas pertenciam à linhagem do morcego hematófago, assim como Peixoto et al. (2014), que estudaram amostras pertencentes aos Estados de Pará, Rondônia e Tocantins.

Para a construção da árvore filogenética, foram utilizadas as sequências deste estudo, juntamente com as outras retiradas do Genbank, relativas a isolados de herbívoros, cães, humanos, e morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros.

A análise filogenética das sequências resultou na formação de quatro grupos: o grupo 1 corresponde aos isolados relacionados ao morcego hematófago *Desmodus rotundus*; o grupo 2, no qual estão agrupados os isolados de morcego insetívoro; o grupo 3, referente aos isolados de cães; e o grupo 4, correspondente às amostras utilizadas como grupo externo. A figura 19 demonstra a árvore filogenética obtida com o sequenciamento parcial do gene N.

No grupo 1, agruparam-se todas as 16 amostras sequenciadas neste estudo, que foram denominadas como: BRPEAG11571, BRPEAG9837, BRPEAG 6191, BRPEAG 11573, BRPEAG49, BRPEAG1742, BRPEAM2812, BRPEAM11030, BRPEAM1402, BRPEAM1834, BRPEAM5604, BRPEAM4448, BRPESE3292, BRPESE261, BRPESE1281, BRPESE12362, e os isolados pertencentes a Estados das regiões Nordeste, Norte e Centro-oeste do Brasil.

No grupo 4 estão as amostras usadas como grupo externo, identificadas como: GU992313.1 (*Mokola vírus*), GU992312.1 (*Australian bat lyssavirus*), AY062089.1 (*European bat lyssavirus*), que são utilizadas para dar sustentação à árvore.

Quando se observa o agrupamento da árvore filogenética no grupo 1, identifica-se a formação de subgrupos, com uma nítida divisão geográfica entre as amostras de vírus obtidas dos diferentes estados brasileiros: Paraíba (PB) e Pernambuco (PE); Goiás (GO); Pará (PA) e Tocantins (TO); São Paulo (SP); Mato Grosso (MT); Mato Grosso do Sul (MS); Maranhão (MA) e Pará; Rio de Janeiro (RJ)

e São Paulo (SP), e que não há distinção entre os vírus isolados de bovinos, equinos, ovinos ou caprinos, pois estes procedem da mesma fonte, morcegos hematófagos.

### **5.5.1. Análise filogenética relacionada à distribuição geográfica**

Quanto a distribuição geográfica, verifica-se que as sequências das amostras do estudo foram agrupadas juntamente com aquelas do banco de dados provenientes de Pernambuco (AB623106.1, AB623107.1, AB623117.1, AB623110.1) e da Paraíba (AB623082.1, AB623086.1, AB623101.1, AB623078.1, AB206430.1, AB623076.1), coincidindo assim com a sua procedência (Figura 19).

O Estado de Pernambuco faz limite ao norte com o Estado da Paraíba, e não há barreiras geográficas e topográficas significativas que separem os Estados, o que facilita o deslocamento dos morcegos *Desmodus rotundus*. A nítida divisão geográfica observada entre os isolados de Pernambuco e dos outros estados, provavelmente ocorre devido a barreiras geográficas que separam esses estados.

Os isolados são, inclusive, específicos para cada mesorregião, pois na árvore pode-se observar que as amostras provenientes da mesorregião da Mata (BRPAM1402, BRPEAM1834; BRPEAM2812, BRPEAM4448, BRPEAM5604 e BRPEAM11030) estão agrupadas separadamente das demais amostras do Agreste e Sertão (BRPESE1281 e BRPEAG6191; BRPESE2621, BRPEAG1742, BRPEAG9837, BRPEAG11573, BRPEAG11571, BRPESE32), as quais estão separadas em agrupamento específico, dada a proximidade dessas mesorregiões. As amostras provenientes das mesorregiões da Mata e Agreste estão agrupadas com as amostras do GenBank isoladas na região do Sertão da Paraíba.

As amostras BRPEAM2812, oriunda do Município de Macaparana, e BRPEAM4448, BRPEAM5604 e BRPEAM11030, pertencentes ao Município de Timbaúba, estão segregadas em um subgrupo separado do restante das amostras deste estudo, assim como as amostras BRPEAG9837 e BRPEAG11573, sugerindo que seja um ciclo de transmissão independente, entre municípios próximos.

De acordo com Kobayashi et al. (2008), a raiva transmitida pelo morcego hematófago apresenta aspectos epidemiológicos que estão associados às

características geográficas e topográficas das áreas ocupadas pelo rebanho e aos fatores que influenciam a ecologia dessa espécie de morcego. No presente estudo, as mesorregiões Mata, Sertão e Agreste possuem algumas características geográficas e topográficas que favorecem os hábitos dos morcegos hematófagos e propiciam a manutenção da enfermidade no ambiente.

Na mesorregião da Mata, o relevo aumenta a sua altitude quando segue em direção à mesorregião Agreste do Estado, além de apresentar índice pluviométrico elevado com temperaturas sem oscilações ao longo do ano. Essa região é cortada pelos principais rios do Estado, o Capibaribe, o Ipojuca e o Ipanema.

A mesorregião do Agreste está localizada entre as mesorregiões da Mata e Sertão e está situada sobre o Planalto da Borborema, que apresenta altitude entre 400 e 1.000 metros; o relevo elevado faz com que essa região tenha um clima ameno, com temperatura entre 8°C e 37°C.

A mesorregião do Sertão apresenta um índice pluviométrico baixo e altas temperaturas, que variam entre 10°C e 41°C, sendo cortada pelos rios Moxotó, Pajeú e Brígida.

Segundo Gomes e Monteiro (2011), existe uma relação espacial entre a raiva bovina, o relevo montanhoso, o maior índice de precipitação e a menor temperatura. Essas características estão associadas a alterações nos ecossistemas provocadas pelos humanos, como a oferta de alimento. De fato, nas três mesorregiões aqui estudadas encontra-se a maior parte do rebanho bovino do Estado de Pernambuco, e a formação de abrigos artificiais, que influenciam diretamente a ecologia dos morcegos.

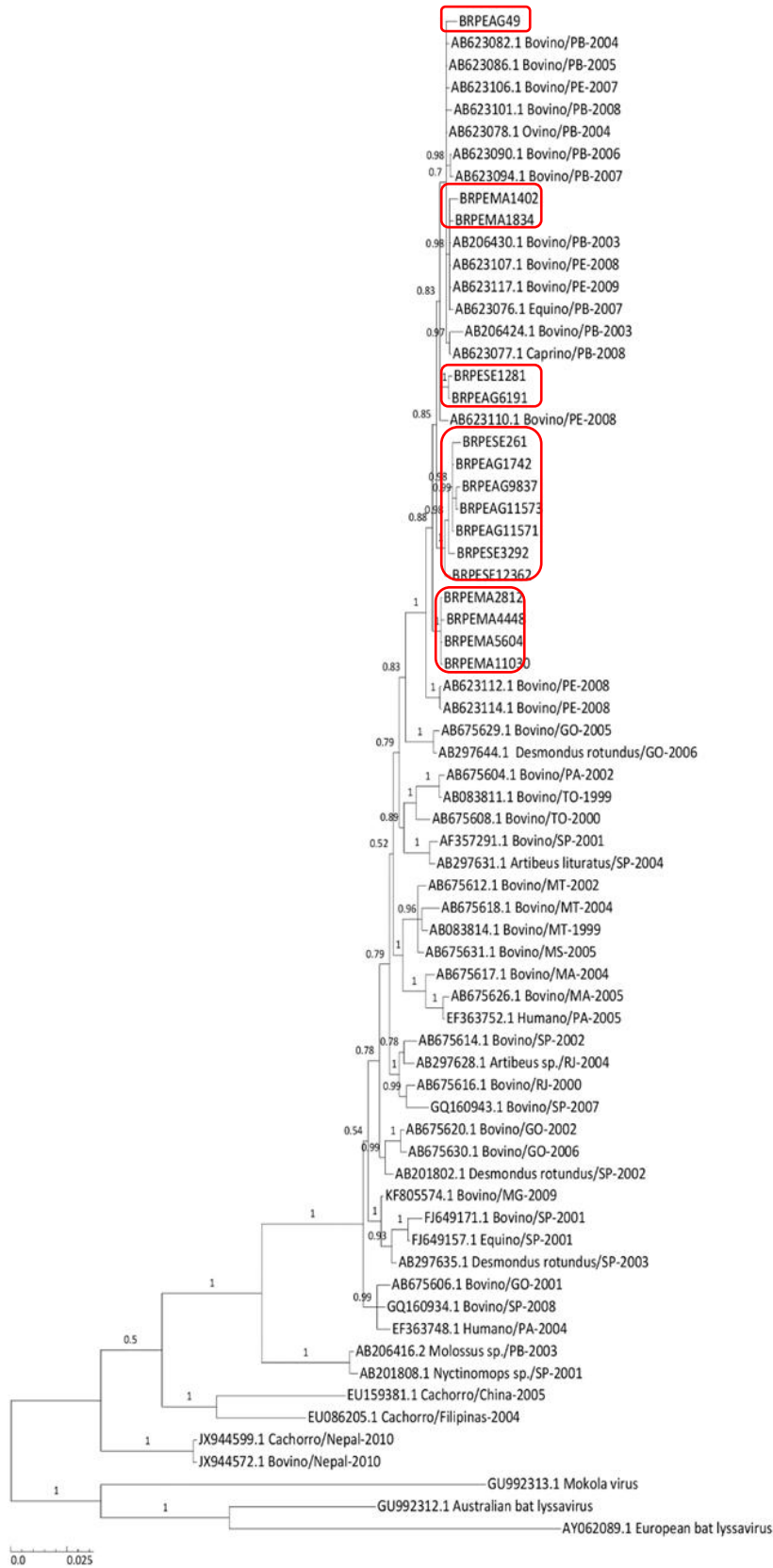


Figura 19 - Árvore filogenética bayesiana obtida pelo alinhamento das sequências parciais do gene N de vírus da raiva provenientes do Estado de Pernambuco e das sequências virais depositadas no GenBank.



## 6. CONCLUSÃO

1- A distribuição temporal demonstra que houve um aumento do número de casos no segundo ano, decaindo gradativamente nos anos seguintes. A redução foi acentuada no último ano, sugerindo ações muito efetivas do Programa de controle ou falhas na vigilância epidemiológica e aumento das áreas silenciosas.

2- Os focos de raiva de herbívoros, no período de 2007 a 2012, estavam distribuídos por todo o Estado de Pernambuco, em 78 dos 185 municípios. A maior ocorrência foi observada nas mesorregiões Metropolitana, Mata, Sertão e Agreste, porém a maior concentração de municípios com casos positivos ocorreu nas regiões Agreste e Sertão.

3- A taxa de incidência aumentou até o final do segundo ano, seguido de acentuada redução até o final do período analisado.

4- Houve diferença significativa entre as taxas de incidência nas mesorregiões. Na mesorregião da Mata, em todos os anos estudados, as taxas foram significativamente maiores que aquelas nas mesorregiões Sertão e Agreste. Na mesorregião da Mata houve oscilação das taxas de incidência no período analisado, sugerindo que se mantenha como uma área endêmica no Estado de Pernambuco pois pode apresentar as condições ambientais e climáticas que favorecem o maior número de abrigos do reservatório *Desmodus rotundus*.

5- Não se constatou um aumento do número de casos que se repita de forma sistemática em uma mesma época do ano, indicando ausência de sazonalidade.

6- A área de maior risco para a manutenção e transmissão da raiva é a mesorregião da Mata, seguida por Agreste e Sertão.

7- Nos estudos filogenéticos, todas as amostras virais sequenciadas enquadraram-se no grupo 1, correspondente aos isolados relacionados com a variante *Desmodus rotundus*. Na árvore filogenética, as amostras provenientes da região da Mata estão agrupadas separadamente das amostras de Sertão e Agreste, as quais compõem um agrupamento específico, sugerindo que haja ciclos de transmissão independentes.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ALENCAR, A. O.; SILVA, G. A. P.; ARRUDA, M. M.; SOARES, A.J.; GUERRA, D. Q. Aspectos biológicos e ecológicos de *Desmodus rotundus* (Chiroptera) no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 95-103, 1994.
- ALLENDORF, S. D.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; HARARY, C. M. A.; ANTUNES, J. M. A. P.; PERES, M. G.; VICENTE, A. F.; SODRE, M. M.; ROSA, A. R.; MEGID, J. Rabies virus distribution in tissues and molecular characterization of strains from naturally infected non-hematophagous bats. **Virus Research**, v. 165, p. 119-125, 2012.
- ALMEIDA, E.O.; MOREIRA, E.C.; NAVEDA, L.A.B., HERRMANN, G.P. Combate ao *Desmodus rotundus rotundus* (E. Geoffroy, 1810) na região cárstica de Cordisburgo e Curvelo, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n.2, p. 117-126, 2002.
- BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, O.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v.75, n. 7, p. 3268-3276, 2001.
- BANERJEE, A. K. Transcription and replication of Rhabdoviruses **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 66-87, 1987.
- BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.
- BOTVINKIN, A. D.; POLESCHUK, E. M; KUZMIN, I. V; BOSISOVA, T. I; GAZARYAN, S. V; YAGER, P, RUPPRECHT, C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.12, p.1623-5, 2003.
- BOURHY, H.; KISSI, B; TORDO, N. Molecular diversity of the Lyssavirus Genus. **Virology**, v. 194, n. 1, p. 70-81, 1993.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 816.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. 1.ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. p. 108.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Controle de Raiva dos Herbívoros**. 2.ed. Brasília: MAPA/ACS, 2009. p. 124. (Manual Técnico)

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

Disponível: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>> Acesso em 10 abr. 2012.

CARNEIRO, A. J. B. **Detecção molecular, filogenia e quantificação do vírus da raiva em quirópteros do Estado da Bahia**. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

CARNIELI JR, P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERIA, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; MACHADO, L.M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R. C.; CARVALHO, V. A.; MONTEBELLOE, L.; WADAE, M.; KOTAIT, K. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 120, p. 113-120, 2006.

CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W. O.; VÉRAS, N. M. C.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Molecular characterization of rabies isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 141, p. 81-89, 2009.

CASSEB, L. M. N.; BARBOSA, T. F.; PEREIRA, A. S.; VIEIRA, C. A. MEDEIROS, D. B.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; CASSEB, A. R. Prevalência de raiva em amostras procedentes da região Norte do Brasil, diagnosticadas no Instituto Evandro Chagas de 2000 a 2004. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 46, p. 261-274, 2006.

EDGAR, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186–94, 1998.

FAVORETTO, S. R.; MATTOS, C. C.; MORAIS; N. B., ARAÚJO; F. A. A.; MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p.1062-1065, 2001.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; CUNHA, E. M. S.; AGUIAR, E. A. C.; SILVA, L. H. Q.; SODRÉ, M. M.; SOUZA, M. C. A. M.; KOTAIT, I. Antigenic typing of brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91-95, 2002.

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

GOMES, A. A. B. **Epidemiologia da raiva: caracterização do vírus isolados em animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil**. 2004. 107p. Tese, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2004.

GOMES, M. N.; MONTEIRO, A. M. V. Raiva bovina no Estado de São Paulo e sua distribuição espacial entre 1992 e 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 279-286, 2011.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.195-202, 1998.

GREEN, P. PHRAD documentation, 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 04 Fev. 2015.

HEINEMANN, M. B.; FERNANDES-MATIOLO, F. M. C.; CORTEZ, A., SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H.; MADEIRA, A. M. B. N.; RICHTZENHAIN, L. J. Genealogical analysis of rabies virus strain from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiology and Infection**, v. 128, p. 503-511, 2002.

HIRANO, S.; ITOU, T.; CARVALHO, A. A. B.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Epidemiology of vampire bat-transmitted rabies vírus in Goiás, central Brazil: re-evaluation based on G-L intergenic region. **BMC Research Notes**, v.3, n. 288, p. 1-8, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 21set. 2015.

ICTV. International Committee Taxonomy of Viruses. Disponível em: <http://www.ictvonline.org>. Acesso em: 06 set. 2015.

ITO, M., ARAI, Y. T.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F.H.; TAKASAKI, T.; KURANET, I. Genetic Characterization and Geographic distribution of rabies vírus isolates in Brazil: Identification of two reservoirs, dog and vampire bats. **Virology**, v. 284, p. 214-222, 2001.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; ARAI, Y. I.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viroses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, p. 317-330, 2003.

ITO, F.H. Programa nacional do controle da raiva em herbívoros: Revisão sobre raiva em herbívoros. 2005.

JACOB, Y.; BADRANE, H.; CECCALDI, P.E.; TORDO, N. Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. **Journal of Virology**, v. 74, p.10217-10222, 2000.

JOHNSON, N.; CEBALLOS, N. A.; AGUILAR, A. Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. **Viruses**. v.6, n. 5, p. 1911–1928, 2014.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; TOU, T.; CUNHA, E. M. S.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular

Epidemiological Analysis of Bat Rabies Viruses in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.

KOBAYASHI, Y.; OGAWA, A.; SATO, G.; SATO, T.; ITOU, T.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. **Virology**, v. 68, n. 10, p. 1097-1100, 2006.

KOBAYASHI, Y.; INOUE, N.; SATO, G.; ITOU, T.; SANTOS, H. P.; BRITO, C. J. C.; GOMES, A. A. B.; SANTOS, M. F. C.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from carnivore in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 69, n. 7, p. 691-696, 2007a.

KOBAYASHI, Y.; OKUDA, H.; NAKAMURA, K.; SATO, G.; ITOU, T.; CARVALHO, A. A. B.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic analysis of phosphoprotein and matrix protein of rabies viroses isolated in Brazil. **Virology**, v. 69, n. 11, p. 1145-1154, 2007b.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; MOCHIZUKI, N.; HIRANO, S.; TAKUYA, I.; CARVALHO, A. A. B.; ALBAS, A.; SANTOS, H.P.; ITO, F. M.; SAKAI, T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 44, 2008.

KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, Y.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SAKAI, T.; GOJOBORI, T. Evolutionary history of dogs rabies in Brazil. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 85-90, 2011.

KOTAIT, I.; GONÇALVES, A.; PERES, N. F.; SOUZA, M. C. A. M.; TARGUETA, M. C. Controle da raiva dos herbívoros. São Paulo: Instituto Pasteur; 1998. (Manual Técnico do Instituto Pasteur n. 1). Disponível em: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/institutopasteur/pdf/manuais/manual\\_01.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/institutopasteur/pdf/manuais/manual_01.pdf). Acesso em 10 ago. 2012.

KOTAIT, I.; HARMANI, N. M. S.; CARRIERI, M. L.; AGUIAR, E. A. C. Manejo de Quirópteros em Áreas Urbanas. São Paulo: Instituto Pasteur; 2003. (Manual Técnico do Instituto Pasteur, n. 7). Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/institutopasteur>. Acesso em: 10 ago. 2012.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. Raiva—Aspectos gerais e clínica. São Paulo: Instituto Pasteur; 2009. (Manual Técnico do Instituto Pasteur n.8). Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/menu.htm>. Acesso em 10 ago. 2012.

LIMA, E. F.; RIET-CORREA F.; CASTRO, R. S.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 250-264, 2005.

MALETTA, C. H. M.; BRANDÃO, L. L. **Bioestatística-Saúde Pública**. Belo Horizonte: Cooperativa Editora e de Cultura Médica Ltda., 1981. 175p.

MATTA, G.C.A.; NOCITI, D. L. P.; CARVALHO, A. A. B.; SAMARA, S. I.; ITO, F. H.; SAKAI, T.; ITOU, T.; SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; MOCHIZUKI, N. Caracterização genética e distribuição geográfica do vírus rábico isolado de bovinos no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 1, p. 019-024, 2010a.

MATTA, G.C.A.; NOCITI, D. L. P.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, R. P.; SAMARA, S. I. Caracterização epidemiológica da raiva bovina no Estado de Mato Grosso, Brasil, no período de 1996 a 2006. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.601-607, 2010b.

MENEZES, F. L.; SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C; MENESES, D. F.; MAGALHÃES, A. D.; BARBOSA, A. D.; OLIVEIRA, C. S. F. Distribuição espaço-temporal da raiva bovina em Minas Gerais, 1998 a 2006. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 566-573, 2008.

MERINI, L. P.; TISO CORMELATO, A.; DE CASTRO BECK, C. A.; GARBADE, P.; UMPIERRE BUENO, F.; OCAMPOS PEDROSO, P. M.; CARNESELLA, S. Raiva em equino no município de Porto Alegre-RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 213-216, 2010.

MOCHIZUKI, N.; KOBAYASHI, N.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; GOMES, A. B.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Complete genome analysis of a rabies virus isolate from brazilian wild fox. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1475-1488, 2009.

MOCHIZUKI, N.; KOBAYASHI, I.; SATO, G.; HIRANO, S.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type Rabies viruses isolated from a haematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 73, n. 6, p. 759-766, 2011.

MOCHIZUKI, N.; KAWASAKI, H.; SILVA, M. L. C.R.; AFONSO, J. A. B.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of livestock rabies viroses isolated in the northeastern brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003-2009. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 32, 2012.

MORAIS, N. B.; ROLIM, B. N.; CHAVES, H. H. M.; BITO-NETO, J.; SILVA, L. M. Rabies in Tamaris (*Callithrix jacchus*) in the State of Ceará, Brazil, a distinct viral variant? **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 609-610, 2000.

MORETTIN, P.A.; TOLOI, C.M. **Análises de séries temporais**. 2 ed. Editora Blucher, 2006. 538 p.

NADIM-DAVIS, S.A. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.75, p.1-8, 1998.

NEVES, A. N. **Sazonalidade e ciclicidade da raiva em herbívoros domésticos no Estado do Mato Grosso do Sul, 1998 a 2006.** 2008. 84p. Dissertação, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul–UFMS, Campo Grande, 2008.

NOCITI, D.L.P. **Caracterização epidemiológica, genética molecular e da patogenicidade do vírus da raiva de bovinos, nos diferentes ecossistemas do Estado do Mato Grosso,** Brasil. 2005.103f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em 15 de agosto de 2015.

PATRÍCIO, M. A. C.; RICHARTZ, R. T. B.; WILLING, F. H.; SPONCHIADO, D.; DITTRICH, R. L. Prevalência da raiva em bovinos, ovinos e caprinos no ano de 2007 no Estado do Paraná. **Revista Ciência Animal Brasileira**, 2009. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br>. Acesso em 15 ago. 2013.

PEDROSO, P. M. O.; COLODEL, E. M.; PESCADOR, C. A.; ARRUDAS, L. P. DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos e patológicos em bovinos afetados por raiva com especial referência ao mapeamento do antígeno rábico por imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 899-904, 2009.

PEIXOTO, H. C.; GARCIA, A. I. E.; SILVA, S. O. S.; RAMOS, O. S.; SILVA, L.P.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Molecular epidemiology of rabies virus isolated f herbivores from Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 2, p. 122-130, 2014.

PEREIRA, C. M., SALLIS, E. S. V., GRECO, F.B., RAFFI, M. B., SOARES, M.P., SCHILD, A. L. Raiva em bovinos na região sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imunoistoquímico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n. 4, p. 331-335, 2011.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

PÓVOAS, D.R.; CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; ALMEIDA, V. M.; SARAIVA, L.Q. Raiva em herbívoros no estado do Maranhão: um estudo retrospectivo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.19, n. 2, p. 86-89, 2012.

QUEIROZ, L. H., CARVALHO, C., BUSO, D. S., FERRARI, C. I. L., PEDRO, W. A. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 9-14, 2009.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 03 jun 2016.

REIS, M.C., COSTA, J. N., PEIXOTO, A. P. C., FIGUEIREDO, L. J. C., MENEZES, R. V., FERREIRA, M. M., SÁ, J. E. U. Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística da Clínica de Bovinos (Oliveira dos Campinhos, Santo Amaro, Bahia), Universidade Federal da Bahia, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 4, n. 1, p. 12-17, 2003.

RIET-CORREA F.; SCHILD A.L.; MENDEZ M.C. & LEMOS R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. 2ª ed. Varela, São Paulo. 2001. v.1, p. 425.

RISSI, D. R.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Ocorrência de raiva em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 495-500, 2008.

RODRIGUEZ, L. L.; ROEHE, P.M.; BATISTA, H.; KURATH, G. Rhabdoviridae. In:\_\_\_\_\_ **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p. 888.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

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

SANTOS, J. C. M.; CAMPANA, M. G. O. G; MAIA, T. A. C.; MOURA, L. G.; ALVES, J. N. M.; PENELUC, T.; RIBAS, J. R. L. **Caracterização da raiva dos herbívoros no estado da Bahia, no período de 2006 a 2007, utilizando técnicas de geoprocessamento**, v. 6, n. 2, p. 128-133, 2009

SATO, G.; I.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.

SATO, G.; TANABE, H.; SHOJI, Y.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SATO, T.; SAKAI, T. Rapid discrimination of rabies viroses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription- polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, p. 267-273. 2005.

SATO, G.; KOBAYASSHI, Y.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; ITO, F. H.; SANTOS, H. P.; BRITO, C. J.C.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. **Archives of Virology**, v.151, p. 2243-2251, 2006.



SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; CUNHA, E. M. S.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; KURANE, I.; SAKAI, T. Genetic characterization of rabies virus isolated from frugivorous bat (*Artibeus spp.*) in Brazil. **Virology**, v. 66, n. 10, p. 1271-1273, 2004.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; GOMES, A. A. B.; ITOU, T. ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies vírus isolated from wildlife and livestock in Paraíba Brazil. **Acta Virologica**, v.50, p. 33-38, 2006.

SILVA, R. C.; LANGONI, H. Epidemiologia da raiva em quirópteros e os avanços em biologia molecular. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n.1, p. 19-37, 2011.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, v.11, n. 7, 2010.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, n.4, p. 678-687, 1992.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2<sup>a</sup> ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2005. 610p.

VIEIRA, L. F. P.; PEREIRA, S. R. F. G.; CARNIELI Jr, P.; TAVARES, C. B.; KOTAIT, I. Phylogeography of rabies vírus isolated from herbivores and bats in the Espírito Santo State, Brazil. **Virus Genes**, v. 46, p. 330-336, 2013.

VUILLAUME, P.; BRUYERE, V.; AUBERT, M. Comparison of the effectiveness of two protocols of antirabies bait distribution for foxes. **Veterinary Research**, v. 29, n. 6, p. 537-547, 1998.

WHO. World health organization. World survey of rabies, n. 34, 1998. Disponível em: [http://www.who.int/rabies/resources/en/wsr98\\_a12.pdf](http://www.who.int/rabies/resources/en/wsr98_a12.pdf). Acesso em: 20 set. 2014.

ZIMMER, K.; Wiegand, D.; Manz, D.; Frost, J. W.; Reinacher, M.; Frese, K. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 5, p. 392-400, 1990.

## APÊNDICES

APÊNDICE A – População bovina do Estado de Pernambuco, Brasil, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012.

| <b>Ano</b>  | <b>Mês</b> |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|             | <b>JAN</b> | <b>FEV</b> | <b>MAR</b> | <b>ABR</b> | <b>MAI</b> | <b>JUN</b> | <b>JUL</b> | <b>AGO</b> | <b>SET</b> | <b>OUT</b> | <b>NOV</b> | <b>DEZ</b> |
| <b>2007</b> | 2.169.359  | 2.152.909  | 2.136.458  | 2.120.008  | 2.103.558  | 2.087.108  | 2.070.658  | 2.054.208  | 2.037.757  | 2.021.307  | 2.004.857  | 2.014.770  |
| <b>2008</b> | 2.024.683  | 2.034.596  | 2.044.508  | 2.054.421  | 2.064.334  | 2.049.030  | 2.033.725  | 2.018.421  | 2.003.116  | 1.987.812  | 1.972.507  | 1.983.756  |
| <b>2009</b> | 1.995.004  | 2.006.253  | 2.017.501  | 2.028.750  | 2.039.489  | 2.037.750  | 2.035.501  | 2.033.253  | 2.031.005  | 2.028.756  | 2.026.508  | 2.036.423  |
| <b>2010</b> | 2.046.338  | 2.056.253  | 2.066.168  | 2.076.083  | 2.085.998  | 2.090.421  | 2.094.844  | 2.099.267  | 2.103.690  | 2.108.113  | 2.112.536  | 2.131.702  |
| <b>2011</b> | 2.150.868  | 2.170.035  | 2.189.201  | 2.208.367  | 2.227.533  | 2.235.340  | 2.243.148  | 2.250.955  | 2.258.762  | 2.266.570  | 2.274.377  | 2.274.372  |
| <b>2012</b> | 2.274.367  | 2.274.362  | 2.274.357  | 2.274.352  | 2.274.347  | 2.258.789  | 2.243.231  | 2.227.673  | 2.212.114  | 2.196.556  | 2.180.998  | 2.165.440  |

Maio e novembro: dados fornecidos pela ADAGRO, PE, Brasil. Demais meses: valores estimados por meio do método aritmético

# APÊNDICE B- Alinhamento das seqüências

```

-----
:49          --TCTACAAT GGATGCCGAC AAGATTGTAT TCAAGGTCAA TAATCAGGTG GTTTCCTAA AGCCTGAAAT TATCGTGGAC
:261          -----
:1281          -----
:1402          -----
:1742          -----
:1834          -----
:2812          -----
:3292          -----
:4448          CC-----
:5604          -----
:6191          -----
:9837          -----
:11030         -----
:11571         -----
:11573         -----
:12362         -----

```

```

#49          CAATATGAGT ACAAGTATCC GGCTATCAAA GACCTGAGA AGCCAGTAT AACCTTAGGA AAAGCTCCTG ATTGAGTAA
#261          -----
#1281          -----
#1402          -----
#1742          -----
#1834          -----
#2812          -----
#3292          -----
#4448          -----
#5604          -----
#6191          -----
#9837          -----
#11030         -----
#11571         -----
#11573         -----
#12362         -----

```

```

#49          AGCATACAAA TCAATTTTAT CTGGCAIGAA GCGAGCCAAA CTGGACCCCTG ATGATGTATG CTGTAATCTG GCTGCCACAA
#261          -----
#1281          -----
#1402          -----
#1742          -----
#1834          -----
#2812          -----
#3292          -----
#4448          -----
#5604          -----
#6191          -----
#9837          -----
#11030         -----
#11571         -----
#11573         -----
#12362         -----

```

```

#49          TGCAGTTCIT TGAAGGATCA TGTCCTGAGG ACTGGACTAG CTAIGGAATC CTGATAGCTC GGAAGGGAGA TAAGATCACC
#261          -----
#1281          -----
#1402          -----
#1742          -----
#1834          -----
#2812          -----
#3292          -----
#4448          -----
#5604          -----
#6191          -----
#9837          -----
#11030         -----
#11571         -----
#11573         -----
#12362         -----

```

```

#49          CCGATTCTC TTGTGGACAT AAAACGTACT GATGTGGAAG GGAATTGGGC TCTAACAGGG GGCATGGAGT TGACAAGGGA
#261          .....G.....
#1281         .....G.....
#1402         .....G.....G.....
#1742         .....G.....
#1834         .....G.....
#2812         .....G.....
#3292         .....G.....C.....A.....
#4448         .....G.....
#5604         .....G.....
#6191         .....G.....
#9837         .....G.....
#11030        .....G.....
#11571        .....G.....
#11573        .....G.....
#12362        .....GG.....

```

```

#49          CCTACTGTT TCAGAGCATG CATCTCTGGT TGGCCTTCTC TTGAGTTTGT ATAGGTTGAG CAAAATCTCT GGACAGAATA
#261          .....
#1281         .....
#1402         .....
#1742         .....
#1834         .....
#2812         .....T.....T.....
#3292         .....
#4448         .....T.....T.....
#5604         .....
#6191         .....T.....T.....
#9837         .....
#11030        .....T.....T.....
#11571        .....
#11573        .....
#12362        .....

```

```

#49          CCGGCAATTA CAAGACAAC AICGCGSATA GARTAGASCA GATCITTGAG ACAGCCCCCT TTACAAGAT  CGTAGAACAT
#261          .....T.....
#1281         .....T.....
#1402         .....T.....
#1742         .....T.....
#1834         .....T.....
#2812         .....T.....
#3292         .....T.....
#4448         .....
#5604         .....
#6191         .....T.....
#9837         .....T.....
#11030        .....
#11571        .....T.....
#11573        .....T.....
#12362        .....T.....

```

```

#49          CATACTTTGA TGACGACCCA CAAAATGTC GCTAACTGGA GTACCATACC AAATTCAGA TTCITGGCTG GAACTTATGA
#261          .....T.....
#1281         .....
#1402         .....
#1742         .....T.....
#1834         .....
#2812         .....T.....
#3292         .....T.....
#4448         .....T.....
#5604         .....T.....
#6191         .....
#9837         .....T.....
#11030        .....T.....
#11571        .....T.....
#11573        .....T.....
#12362        .....T.....

```

```

#49          CAITTTTTIC TCCGGGATG AACATCTGTA TTCAGCTATT AGAGTAGGCA CAGTTIGCAC TGCITATGAG GACTGCTCAG
#261          .....A.....C.....
#1281         .....
#1402         .....
#1742         .....A.....C.....
#1834         .....
#2812         .....A.....C.....
#3292         .....A.....C.....
#4448         .....
#5604         .....
#6191         .....A.....C.....
#9837         .....A.....C.....
#11030        .....
#11571        .....A.....C.....
#11573        .....A.....C.....
#12362        .....A.....C.....

```

```

#49 GATTGGTGC ATTTACAGG TTTATAAAGC AAATAAATCT CACTGCGAGA GAAGCACTAT TATACTTCTT TCACAAGAA-
#261 .....C.....C
#1281 .....C.....C
#1402 .....C.....C
#1742 .....C.....C
#1834 .....C.....C
#2812 .....G.....C
#3292 .....C.....C
#4448 .....G.....C
#5604 .....G.....C
#6191 .....C.....C
#9837 .....C.....C
#11030 .....G.....C
#11571 .....C.....C
#11573 .....C.....C
#12362 .....C.....C

```

```

#49 -----
#261 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTCAITCC TAITTCAT
#1281 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTCATI-----
#1402 TTCGAGGAAG AAATAAGAAG ACTGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT -----
#1742 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT-----
#1834 TTCGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCCATICC TATI----
#2812 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTCAITCC TAITTCAT
#3292 -----
#4448 TTTGAGGAAG AAA-----
#5604 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTCAITCC TAITTCAT
#6191 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTCATI-----
#9837 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTC-----
#11030 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTCAITCC TAITTCAT
#11571 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTCAITCC TAITTCAT
#11573 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTG-----
#12362 TTTGAGGAAG AAATAAGAAG AATGTTGAG CCTGGGCAAG AGACTGCTGT TCCTCAITCC TAITTCAT

```

## **ANEXO**



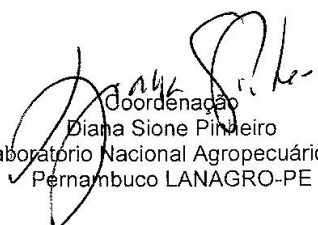
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA  
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - SDA  
COORDENAÇÃO GERAL DE APOIO LABORATORIAL - CGAL  
LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM PERNAMBUCO - LANAGRO/PE

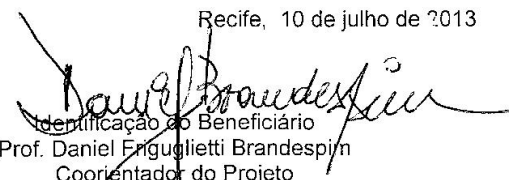
Página 1 de 1

**TERMO DE DOAÇÃO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS  
ENTRE  
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA)  
LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM PERNAMBUCO (LANAGRO/PE)  
E  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP) - CAMPUS JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E REPRODUÇÃO ANIMAL  
(BENEFICIÁRIO)**

Concordam com o seguinte:

1. O MAPA/LANAGRO-PE irá prover ao Beneficiário com o seguinte material:  
Volumes: 10 caixas de transporte de produto biológico. Embalagem conforme instrução 650 - IATA.  
Total de amostras: 235 frascos contendo fragmentos de tecido de sistema nervoso animal, positivos para Raiva (amostras de campo), para fins de pesquisa. Classificação UN 3373 da IATA.  
Refrigerado com gelo reciclável.
2. O uso do material, descrito no item 1, é limitado ao objetivo específico de caráter científico, descrito no projeto de pesquisa "Caracterização Epidemiológica e Genética Molecular do Vírus da Raiva de Herbívoros, no Estado de Pernambuco, Brasil". O material não tem valor comercial e não poderá ser transferido a terceiros. O local de execução dos ensaios será Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Med. Veterinária Preventiva, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal.
3. É de responsabilidade do beneficiário os cuidados com o transporte, após a saída do estabelecimento de origem (Lanagro/PE), bem como a utilização do material em conformidade com todas as leis e ordenanças, bem como quaisquer outros regulamentos aplicáveis e regras de biossegurança. A manipulação do material requer cuidados de biossegurança risco 3 (vírus rábico de rua) e há necessidade de controle de vacinação/sorologia antirrábica para a manipulação do mesmo. O Beneficiário garante que obtém todas as autorizações necessárias das autoridades regulatórias. O MAPA/LANAGRO-PE não é responsável: pelo transporte do material; pela adequação de normas de biossegurança ao uso do material; pela segurança ou eventual contaminação do material; por danos causados pelo material ou seu uso.
4. O beneficiário compromete-se em manter estritamente confidenciais todas as informações que citam nomes de proprietários ou instituições, mesmo após o término da pesquisa.
5. Os resultados da pesquisa serão de propriedade do beneficiário. O beneficiário é autorizado a publicar os resultados da pesquisa citando que o material foi fornecido pelo MAPA/LANAGRO-PE. Todas as citações/publicações requerem o consentimento oficial do MAPA/LANAGRO-PE.

  
Coordenação  
Diana Sione Pinheiro  
Laboratório Nacional Agropecuário em  
Pernambuco LANAGRO-PE

Recife, 10 de julho de 2013  
  
Identificação do Beneficiário  
Prof. Daniel Enguglietti Brandespim  
Coordenador do Projeto  
Universidade Federal Rural De Pernambuco - UFRPE  
Epidemiologia/Higiene Veterinária e Saúde Pública  
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UAG

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA  
Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/PE Bacteriologia  
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº - Dois Irmãos - Campus da UFRPE  
CEP: 52171-030 - Recife - PE  
Fone: (81) 3441-8311 Fax: (81) 3441-6477