

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

**FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO VÍRUS DA RAIVA DE
MORCEGOS INSETÍVOROS *Nyctinomops* spp. NO BRASIL**

Ana Paula Rodomilli Grisolio

Médica Veterinária

2017

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

**FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO VÍRUS DA RAIVA DE
MORCEGOS INSETÍVOROS *Nyctinomops* spp. NO BRASIL**

Ana Paula Rodomilli Grisolio

Orientadora: Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

Coorientadores: Dra. Andressa de Souza Pollo

Dr. Luiz Fernando Pereira Vieira

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

2017

Grisolio, Ana Paula Rodomilli
G869f Filogenia e filogeografia do vírus da raiva de morcegos
insetívoros *Nyctinomops* spp. no Brasil / Ana Paula Rodomilli Grisolio.
-- Jaboticabal, 2017
xix, 62 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

Banca examinadora: Ricardo Augusto Dias, Hélio José
Montassier, Luzia Helena Queiroz, Ingrid Bortolin Affonso Lux Hoppe
Bibliografia

1. Biologia molecular. 2. Quirópteros. 3. *Rabies lyssavirus*. 4.
Vigilância epidemiológica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993:599.4

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO VÍRUS DA RAIVA DE MORCEGOS INSETÍVOROS *Nyctinomops* spp. NO BRASIL

AUTORA: ANA PAULA RODOMILLI GRISOLIO

ORIENTADORA: ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO

COORIENTADOR: LUIZ FERNANDO PEREIRA VIEIRA

COORIENTADORA: ANDRESSA DE SOUZA POLLO

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



p/ Prof. Dr. RICARDO AUGUSTO DIAS - VIDEOCONFERÊNCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública (VPS) / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP



Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. LÚZIA HELENA QUEIROZ
Câmpus de Araçatuba / Faculdade de Medicina Veterinária - Unesp



Pós-doutoranda INGRID BORTOLIN AFFONSO LUX HOPPE
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de outubro de 2017

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA PAULA RODOMILLI GRISOLIO – nasceu em São Paulo, São Paulo, no dia 27 de fevereiro de 1988. Em dezembro de 2005 concluiu o ensino médio e o ensino técnico em química na Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antônio Prado” (ETECAP) em Campinas/SP. Em 2007 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP. Entre os anos de 2008 a 2011 fez parte, na mesma instituição, do Programa de Educação Tutorial (PET) do Curso de Medicina Veterinária. No período de 01/08/2010 a 01/08/2011, participou do Programa de Iniciação Científica, com bolsa FAPESP processo 2009/18475-0, desenvolvendo a pesquisa “Avaliação do conhecimento das relações entre o ser humano e os animais de estimação (cães e gatos) no Município de Jaboticabal, SP”, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Sergio Ferraudo e coorientação da Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho. Em 2011, no período de agosto a dezembro, realizou seu estágio curricular junto ao MAPA, no Serviço de Saúde Animal (SSA), em São Paulo, e no Serviço de Vigilância Agropecuária (SVA) do Aeroporto Internacional de Viracopos, em Campinas/SP. Defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso com o tema “Exportação e importação de ovos férteis e pintos de 01 dia”, sob orientação da Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP. Em fevereiro de 2012 recebeu o grau de Médico Veterinário. Registrada no Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo (CRMV-SP) sob o número 32.931. Em janeiro de 2014 recebeu o título de Mestre pelo Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, com a dissertação intitulada: “Atendimento Antirrábico Humano Pós-exposição: Proposta de intervenção e estudo da percepção do comportamento de cães e gatos envolvidos nos agravos”, sob orientação da Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho e coorientação da Profa. Dra. Ceres Berger Faraco, com bolsa FAPESP processo 2012/10447-0. Em março de 2014 iniciou o curso de Doutorado pelo Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, com auxílio à pesquisa FAPESP processo 2015/10258-0, sob orientação da Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho e coorientação do Dr. Luiz Fernando Pereira Vieira e da Dra. Andressa de Souza Pollo.

*“Nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis,
a próxima tentativa pode ser a vitoriosa...”*

(Albert Einstein)

Dedico...

*Aos meus queridos pais José Angelo e Silmari,
pela vida, por todo o incentivo, por serem essenciais nos meus dias,
por acreditarem e investirem nesse sonho junto comigo...*

Amo vocês eternamente...

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pelas oportunidades.

A Nossa Senhora Desatadora dos Nós, mãezinha querida, que sempre está à frente e nunca abandona. Muito obrigada por toda proteção dada a mim e a minha família e pelas graças alcançadas durante esses anos de minha vida.

Aos meus pais, mais uma vez, Silmari e José Angelo, pelo apoio e carinho que sempre me proporcionaram, permitindo que eu cumprisse mais uma etapa em minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Às minhas irmãs, Grazielle e Claudia, pela amizade e por compartilharem muitos momentos de alegria comigo.

Ao meu noivo, futuro esposo, João Paulo Ferreira de Assis, pelo companheirismo, pela paciência, carinho, amizade, incentivo e compreensão, ao longo de todos esses anos, fundamentais para a minha vida.

À minha querida avó Lourdes, que não canso de agradecer sempre. Muito presente na minha vida, apoiando minhas decisões e torcendo por mim. Que Deus lhe dê muita saúde e lucidez para que possamos continuar trocando muitas conversas!

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, que se tornou uma grande amiga e conselheira. Muito obrigada por acreditar em mim e no meu trabalho, possibilitando a concretização deste Doutorado. A senhora é um exemplo de profissional, de dedicação e de amor. Muito obrigada por tudo!

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur, São Paulo, em especial ao Dr. Rafael de Novaes Oliveira. Muito obrigada, por aceitarem a nossa parceria, por terem cedido as amostras para a pesquisa e por sempre se

mostrarem dispostos a ajudar e discutir os resultados. Ao Rafael, muito obrigada por toda a atenção que sempre nos deu, por nos ajudar em todos os momentos e por acreditar e confiar no trabalho, permitindo que eu tivesse essa oportunidade. Fazer parte dessa parceria foi a realização de um sonho!

Ao meu coorientador Dr. Luiz Fernando Pereira Vieira, por aceitar o nosso convite e participar deste trabalho. Agradeço a atenção, a paciência e todos os ensinamentos que foram essenciais para a conclusão da pesquisa. Muito obrigada por permitir que eu compreendesse melhor o universo da filogeografia!

À Dra. Andressa de Souza Pollo, também coorientadora do trabalho, por abrir as portas do Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, permitindo que as análises pudessem ser realizadas. Também agradeço o apoio, a atenção, os ensinamentos, a amizade, a ajuda em todas as etapas da filogenia e todos os conselhos que somaram para a minha completa formação como Doutora.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio financeiro a esta pesquisa, fundamental para a sua completa realização.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, especialmente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, por permitir a realização deste Doutorado.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal por sempre me incentivarem e apoiarem.

Aos professores, Prof. Dr. Hélio José Montassier, Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias, Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz e à pós-doutoranda Ingrid Bortolin Affonso Lux Hoppe, membros das comissões examinadoras de qualificação e defesa, por aceitarem o convite de participação. A participação de todos na banca foi essencial e

suas sugestões e considerações foram muito importantes para o enriquecimento desta pesquisa.

Aos meus grandes amigos: Raquel (Vagi), Mariana (Sô), Guilherme (Angélica), Ana Carolina (Guampa), Mônica (Ex), Paulo Victor (Margoso) e Cyro (Sirola), que mesmo distantes, sempre me incentivaram. Agradeço a amizade, o carinho, todas as vezes que me acolheram em suas casas e os momentos de alegrias que sempre me proporcionam.

Às minhas amigas, quase irmãs, Cecília Rodrigues Alves Silveira e Amanda Pedreschi Stefarolli, que ao longo de toda a pós-graduação foram o meu porto seguro, nos momentos difíceis e também nos de alegria. Muito obrigada por dividirem os seus dias comigo, pelo incentivo, apoio e amizade de todos os dias... Vocês são especiais!

Às minhas queridas amigas e colegas de pós-graduação, Mirelle Andréa de Carvalho Picinato e Juliana Olivência Ramalho Nunes, pelo respeito, pela amizade e confiança de sempre.

Aos colegas e amigos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Gabriel Augusto Marques Rossi, Laryssa Ribeiro, Carlos Eduardo Gamero Aguilar, Henrique Almeida, Eric Matheus Nascimento de Paula, Carolina de Alvarenga Cruz, Bruna Ferreira Izola, Marina Beanucci, pela companhia e conversas e também pelas parcerias e ajuda.

À República "Choppiana", suas moradoras e ex-moradoras, minhas "irmãs" de coração, que sempre me apoiaram em minhas decisões. Às atuais moradoras, por me acolherem novamente na república durante o meu último ano do Doutorado, me proporcionando dias muito felizes e me fazendo me sentir como se estivesse em casa. Agradeço a todas, os conselhos, as amizades e as risadas.

À LASP, Liga Acadêmica de Saúde Pública Veterinária, pela experiência que me proporcionaram, por todos os ensinamentos e por enriquecerem minha formação acadêmica. Desejo sucesso ao grupo!

À minha cachorrinha Fibi, querida companheira, que está comigo desde o primeiro ano da faculdade. Somamos 10 anos distantes de casa e só posso agradecer todo carinho que sempre demonstra.

E a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste Doutorado. A realização dessa pesquisa foi a concretização de um sonho... e só posso agradecer a todos os envolvidos e a todos que sempre me apoiaram e acreditaram no meu trabalho. Vocês foram essenciais para que eu pudesse seguir em frente...

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xviii
LISTA DE TABELAS	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Histórico da Raiva.....	2
2.2. A raiva.....	4
2.2.1. Etiologia.....	4
2.2.2. Patogenia, sinais clínicos e diagnóstico.....	9
2.2.3. Ciclo epidemiológico.....	11
2.3. A raiva em morcegos não hematófagos.....	12
2.4. Morcegos <i>Nyctinomops</i> spp.....	14
2.5. Controle e prevenção da raiva em áreas urbanas.....	16
2.6. Importância da filogenia e da filogeografia para o estudo da raiva.....	17
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Amostras.....	22
4.2. Caracterização Molecular.....	24
4.2.1. Extração de RNA.....	25
4.2.2. Obtenção de DNA complementar (cDNA).....	25
4.2.3. Amplificação parcial do gene codificador da nucleoproteína (N).....	25
4.2.4. Sequenciamento do fragmento amplificado do gene codificador da nucleoproteína (N).....	26
4.3. Análise dos dados.....	27
4.3.1. Análise filogenética.....	27
4.3.2. Análise filogeográfica.....	30

5. RESULTADOS	33
5.1. Análise filogenética.....	33
5.2. Análise filogeográfica.....	37
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	49
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
9. REFERÊNCIAS	51



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

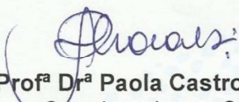


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 021916/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Filogeografia do vírus da raiva em morcegos insetívoros no 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 07 de novembro de 2014.

Jaboticabal, 07 de novembro de 2014.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO VÍRUS DA RAIVA DE MORCEGOS INSETÍVOROS *Nyctinomops* spp. NO BRASIL

RESUMO – A raiva é uma doença viral infecciosa aguda, de caráter zoonótico, que atinge todas as espécies de mamíferos. No meio urbano, os cães e os morcegos, em especial os insetívoros e os frugívoros, são vistos como principais agentes transmissores da enfermidade, e ao pensar na sua interação com os seres humanos, os cuidados se intensificam, tendo em vista o risco de propagação da doença. O avanço nos estudos epidemiológicos baseados na análise molecular do vírus da raiva, nas últimas décadas, permitiu a identificação de reservatórios e a distribuição geográfica das variantes. No entanto, dada a constante adaptação genética do vírus aos seus hospedeiros, o presente estudo objetivou realizar uma análise filogenética e filogeográfica do vírus da raiva (RABV) de amostras provenientes de diferentes estados do Brasil, identificados como positivos pelo Instituto Pasteur, São Paulo/SP. Para tanto, foram analisadas sequências parciais do gene codificador da nucleoproteína de 71 amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp. Observou-se na análise filogenética que 65 das 71 amostras agruparam-se em um mesmo clado juntamente com amostras de morcegos insetívoros do banco de dados, representando uma variante específica desse gênero de quiróptero. As outras seis amostras dividiram-se em outros clados mostrando haver proximidade genética entre isolados de morcegos hematófagos e não hematófagos e também entre estes e outros mamíferos silvestres. Ainda foi possível encontrar um morcego proveniente do Município de Tabuleiro do Norte/RN com RABV pertencente à variante relacionada ao cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), indicando ser esse um primeiro relato dessa transmissão. Na filogeografia, observou-se a importância que a localização geográfica e as características de relevo exercem na distribuição das variantes do RABV, havendo predomínio de relação genética em localidades próximas e com altitudes semelhantes. As características biológicas do morcego *Nyctinomops* também influenciam na distribuição do vírus entre seus exemplares, pois, por ser tratar de uma espécie não migratória e que se adaptou facilmente ao ambiente urbano, nota-se uma tendência de uma linhagem do vírus circular em uma mesma região por um longo tempo. Dessa forma, as análises filogenética e filogeográfica são importantes ferramentas para ajudar a compreender a origem, a distribuição e a transmissão das diferentes variantes do RABV no Brasil, especialmente entre morcegos não hematófagos, cada vez mais importantes como reservatórios da raiva na área urbana. Assim, com esses resultados é possível auxiliar nas medidas de controle e prevenção da raiva em centros urbanos, reforçar as medidas educativas que mostrem para a população os riscos envolvidos na interação com quirópteros e outros mamíferos silvestres, fornecer subsídios para os Serviços de Vigilância Epidemiológica dos diferentes municípios e colaborar com as atividades do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur em São Paulo/SP, referência em diagnóstico e em estudos sobre a raiva no Brasil.

Palavras-chave: biologia molecular, quirópteros, *Rabies Lyssavirus*, vigilância epidemiológica

PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY OF RABIES VIRUS FROM INSEktivOROUS BATS *Nyctinomops* spp. IN BRAZIL

ABSTRACT - Rabies is an acute infectious viral disease of a zoonotic character that affects all the mammalian species. In the urban area, dogs and bats, especially the insectivorous and frugivorous, are seen as the main transmitters of the disease, and when their interaction with humans is analyzed, care is intensified according to the risk of rabies propagation. Advances in epidemiological studies based on the molecular analysis of the rabies virus in recent decades have allowed the identification of reservoirs and the geographical distribution of variants. However, given the constant genetic adaptation of the virus to the hosts, the present study aimed to perform a phylogenetic and phylogeographic analysis of rabies virus (RABV) from different states of Brazil, identified as positive by Pasteur Institute, São Paulo/SP. For this, partial sequences of the nucleoprotein gene of 71 samples from insectivorous bats *Nyctinomops* spp were analyzed. It was observed in the phylogenetic analysis that 65 of the 71 samples were grouped in the same cluster with samples of insectivorous bats from the GenBank database, representing a specific variant of this bat genus. The other six samples were divided into other clusters showing genetic proximity between hematophagous and non-hematophagous bats isolates and also between these and other wild mammals. It was possible to find a bat from the municipality of Tabuleiro do Norte/RN with RABV belonging to a variant related to crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), indicating that this result can be a first report of this transmission. In phylogeography, it was observed the importance that the geographical location and the relief characteristics have in the distribution of RABV variants, with a predominance of genetic relation in nearby localities with similar altitudes. The biological characteristics of the *Nyctinomops* bat also influence the distribution of the virus among its specimens because it is a non-migratory species and easily adapted to the urban area, which causes a tendency of a virus lineage to circulate in the same region for a long time. Thus, phylogenetic and phylogeographic analyzes showed to be important tools to help understand the origin, distribution and transmission of different variants of RABV in Brazil, especially among non-hematophagous bats, which are increasingly important as hosts of rabies in the urban area. The results allow to assist in measures of control and prevention of rabies in urban areas; to reinforce educational activities that show to the population the risks involved in interacting with bats and other wild mammals; to provide subsidies for the Epidemiological Surveillance Services from different Brazilian municipalities and to collaborate with the activities of the Molecular Biology Laboratory from Pasteur Institute, São Paulo/SP, reference in diagnosis and rabies studies in Brazil.

Keywords: molecular biology, bats, *Rabies Lyssavirus*, epidemiological surveillance

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABL – *Australian bat lyssavirus*
- AIC – Critério de Informação de Akaike
- ARAV – *Aravan lyssavirus*
- BA – Bahia
- BBLV – *Bokeloh bat lyssavirus*
- cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
- CE – Ceará
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CVS – Challenge Virus Standard
- CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DNase – Desoxirribonuclease
- DUVV – *Duvenhage lyssavirus*
- EBLV-1 – *European bat 1 lyssavirus*
- EBLV-2 – *European bat 2 lyssavirus*
- ESS – Effective Sample Size
- EUA – Estados Unidos da América
- FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
- FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
- GARC – Aliança Global para o controle da raiva
- IC – Inoculação em camundongos
- ICTV – Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus
- IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza
- IFD – Imunofluorescência direta
- IKOV – *Ikoma lyssavirus*
- KHUV – *Khujand lyssavirus*
- KML – Keyhole markup language
- LBV – *Lagos bat lyssavirus*
- MAbs – Anticorpos monoclonais

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCMC – Markov Chain Monte Carlo
MG – Minas Gerais
MMC – Credibilidade máxima do clado
MOKV – *Mokola lyssavirus*
MRCA – Mais recente ancestral comum
MS – Ministério da Saúde
MS – Mato Grosso do Sul
NCBI – National Center for Biotechnology Information
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
ORF – Open reading frame
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PNPR – Programa Nacional de Profilaxia da Raiva
PR – Paraná
RABV – *Rabies lyssavirus*
RN – Rio Grande do Norte
RNA – Ácido ribonucleico
RNase – Ribonuclease
RT – Transcrição reversa
RT-PCR – Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SHIBV – *Shimoni bat lyssavirus*
SNA – Sistema Nervoso Autônomo
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
SP – São Paulo
SSA – Serviço de Saúde Animal
SVA – Serviço de Vigilância Agropecuária
Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
WCBV – *West Caucasian bat lyssavirus*
XML – Extensible markup language

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vírus da raiva. A) Esquema com representação das cinco proteínas virais, genoma, ribonucleocapsídeo e envelope. Nucleoproteína (N), glicoproteína (G), proteína matrix (M), fosfoproteína (P) e proteína RNA polimerase RNA-dependente (L). B) Vírus da raiva visto por foto de microscopia eletrônica, demonstrando seu formato cilíndrico.....	5
Figura 2. Representação do genoma completo do vírus da raiva.....	6
Figura 3. Morcego insetívoro <i>Nyctinomops laticaudatus</i> , comum em áreas urbanas no Brasil.....	16
Figura 4. Região de origem e número das amostras de vírus da raiva de morcegos insetívoros <i>Nyctinomops</i> spp. utilizadas no presente estudo.....	22
Figura 5. Árvore filogenética de 72 sequências da região codificadora da proteína N do vírus da raiva de morcegos insetívoros <i>Nyctinomops</i> spp. e de canídeo silvestre, de diferentes estados do Brasil. Destaque em vermelho para 65 amostras do presente estudo.....	35
Figura 6. Árvore filogenética de 72 sequências da região codificadora da proteína N do vírus da raiva de morcegos insetívoros <i>Nyctinomops</i> spp. e de canídeo silvestre, de diferentes estados do Brasil. Destaque em vermelho para 7 amostras do presente estudo.....	36
Figura 7. Árvore filogenética do tempo de sequências parciais do gene da proteína N do RABV de morcegos insetívoros <i>Nyctinomops</i> spp. de estados das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, nos anos de 2008 a 2016. Destaque para os anos de formação dos clusters e sub-clusters.....	40
Figura 8. Dispersão das amostras de vírus da raiva provenientes de morcegos insetívoros <i>Nyctinomops</i> spp., no período de 2008 a 2016, em municípios das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, segundo a análise filogeográfica e visualização obtida pelo software Google Earth.....	41
Figura 9. Dispersão das amostras de vírus da raiva provenientes de morcegos insetívoros <i>Nyctinomops</i> spp., no período de 2008 a 2016, demonstrando nítida divisão entre os grupos de amostras provenientes de municípios das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste daquelas originárias da região Nordeste do Brasil. Mapa visualizado pelo software GIMP 2.2.8.22.....	41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Amostras do vírus da raiva utilizadas no estudo, diagnosticadas como positivas pela técnica de imunofluorescência direta e pela prova biológica de inoculação em camundongos no Instituto Pasteur, São Paulo, no período de 2008 a 2016.....	23
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do gene codificador da proteína N das amostras de RABV provenientes de morcegos insetívoros do gênero <i>Nyctinomops</i> spp.....	26
Tabela 3. Relação de sequências disponíveis no banco de dados GenBank, utilizadas para a construção da árvore filogenética.....	28

1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma antropozoonose caracterizada por uma encefalomielite aguda e fatal que acomete os mamíferos, inclusive os seres humanos. Os cães e os morcegos, em especial os insetívoros e os frugívoros, são destaque como transmissores do vírus no ambiente urbano.

O desmatamento, a urbanização, a atividade agropecuária e a mineração têm contribuído para a diminuição dos abrigos naturais de quirópteros que, por sua vez, passam a alojar-se em construções antropogênicas, aumentando as chances de contato entre essas espécies e os humanos e seus animais de estimação. Essas relações inter-espécies são importantes para o contexto do estudo da raiva, pois podem facilitar o carreamento de diferentes variantes do vírus pelo país.

No Brasil, uma mudança do perfil de ocorrência e transmissão da raiva no ambiente urbano vem sendo observada. Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2011 a 2017, houve um aumento nos casos humanos de raiva transmitida por morcegos e por outras espécies silvestres, que representaram 37% dos casos no período relatado. Em período anterior, de 2000 a 2010, esses casos somavam 12%. Esses dados alertam para a importância dos quirópteros na transmissão da raiva, fazendo com que a forma silvestre ganhe destaque no cenário nacional.

Diante desse quadro, a filogenia e a filogeografia surgem como modalidades eficazes para uma compreensão mais aprofundada da dinâmica da propagação do vírus da raiva em quirópteros, o que é fundamental para auxiliar nas estratégias de controle e prevenção da doença e também orientar a implantação de medidas educativas para a população, com informações importantes sobre os riscos contidos na interação com morcegos e outros animais, hospedeiros da raiva.

Assim, o presente estudo teve por objetivo realizar análises filogenética e filogeográfica do vírus da raiva a partir de amostras de morcegos insetívoros do gênero *Nyctinomops* spp. diagnosticadas positivas pelo Laboratório de Diagnóstico da Raiva Animal do Instituto Pasteur, São Paulo, a fim de caracterizar as variantes e suas linhagens e conhecer a sua dispersão geográfica, buscando auxiliar nas medidas de controle e prevenção da raiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da raiva

A raiva ainda é uma enfermidade que gera grande preocupação mundial, embora seja uma das zoonoses mais antigas de que se tem conhecimento, descrita há mais de quatro mil anos (BABBONI; MODOLO, 2011).

Na mitologia grega há referência à raiva na Ilíada quando Homero associava a constelação “Sirius” a cães raivosos do Mediterrâneo Oriental, do Egito e de Roma, além de mencionar a deusa Ártemis como curadora da raiva e o deus Aristeo, filho de Apolo, como combatente dos efeitos da raiva (RADOT, 1942).

Os filósofos Demócrito, Aristóteles e Hipócrates foram os primeiros a reconhecer a raiva como uma doença de animais. No livro “História Natural dos Animais”, Aristóteles reconhece a transmissão da raiva pela mordedura de cães, afirmando que os mesmos podem tornar outros animais raivosos (BAER, 2007). Hipócrates descreveu a sintomatologia da raiva em uma de suas obras (ROSEN, 1958). Porém, até esse momento, não se acreditava que a doença pudesse acometer o ser humano (BABBONI; MODOLO, 2011).

Somente na Escola de Alexandria foram feitas as primeiras observações sobre a raiva humana, classificando-a como uma doença cruel (STEELE, 1975). Ainda, no primeiro século a.C., o filósofo Celsus, em seu livro, relaciona o sintoma de hidrofobia em humanos com a raiva canina, afirmando que uma mordida, causada por humanos, cães, macacos ou outro animal selvagem, poderia conter um “veneno”, em latim “*virus*”, reforçando as formas de transmissão, incluindo os seres humanos no contexto da enfermidade (BAER, 2007).

No final da Idade Média e início da Renascença, estudos e experimentos relacionados à raiva foram iniciados, buscando uma possível cura para a enfermidade (DE MATTOS et al., 2001; VIEIRA, 2012). O médico Girolamo Fracastoro, em 1546, em seu tratado “A Ferida Incurável”, detalhou a raiva e acompanhou diversos casos concluindo que, uma vez os sinais clínicos apareçam, a doença não tem mais cura (KOPROWSKI, 1996).

O primeiro surto de raiva descrito ocorreu na França, em 1271, em que uma vila foi atacada por lobos raivosos e 30 pessoas morreram com sinais típicos da doença, incluindo os sinais de mordeduras causadas pelos animais. Existem também referências de surtos de raiva na Espanha em 1500, em Paris em 1614, e em quase toda a Europa central no mesmo período. Em Londres, nos anos de 1752 a 1762, foi ordenado o sacrifício de todos os cães errantes, incluindo uma recompensa para aqueles que apresentassem um animal morto. Essa prática levou outras localidades a sacrificarem um número exorbitante de animais, incluindo proibir pessoas pobres de terem cães (STEELE, 1975).

Nas Américas, acredita-se que a doença já existia antes da chegada dos europeus. O bispo Petrus Martyr-Anglerius, no período da colonização, relatou a morte de seres humanos por mordidas de morcegos que os atacavam. Porém, somente 200 anos após a invasão espanhola, casos de raiva foram relatados nas Américas. No México, em 1709, houve relatos de casos; em 1753, na América do Norte, a raiva foi descrita em cães e, mais tarde, em raposas (DE MATTOS et al., 2001; VIEIRA, 2012).

A raiva é uma enfermidade cuja forma de transmissão, identificada desde tempos remotos, é pela saliva dos cães ou de outros mamíferos selvagens, como os lobos. A utilização da palavra *virus* para definir o agente etiológico compõem conceitos e descrições que foram aprimorados ao longo das décadas, porém estão presentes nas definições atuais da doença (SCHNEIDER; BURGOA, 1994; BABBONI; MODOLO, 2011).

Em 1885, o cientista francês Louis Pasteur aplicou pela primeira vez uma vacina contra a raiva em um paciente humano. Ele foi o responsável por apresentar o primeiro método de profilaxia pós-exposição, desencadeando posteriormente uma série de estudos experimentais. Também apresentou a teoria da predileção do vírus pelo sistema nervoso central e demonstrou que a inoculação intracerebral é uma forma eficaz de transmissão de doença. A tentativa de vacinação implantada pelo cientista veio a partir da descoberta da possibilidade de atenuação do vírus por passagens seriadas em cérebros de coelhos. O cientista verificou que, após várias passagens, o vírus perdia o tropismo pelo sistema nervoso central (FERREIRA, 1976). A partir dessa época, com todas as descobertas e consequentes estudos

futuros, a raiva entrou no domínio das preocupações populares, permanecendo nas gerações atuais (WILKINSON, 2002; BAER, 2007, BABBONI; MODOLO, 2011).

2.2. A raiva

A raiva é uma antropozoonose caracterizada por uma encefalomielite aguda e fatal que acomete os mamíferos, inclusive os seres humanos (SÃO PAULO, 2000; ACHA; SYFRES, 2003). É uma doença perpetuada na natureza por diversas espécies de animais silvestres, consideradas reservatórios, incluindo-se nessa categoria os morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros, que têm destaque como transmissores (SCHEFFER et al., 2007).

A enfermidade ocorre de maneira endêmica em todo o mundo, presente em mais de 150 países e territórios, salvo em algumas áreas específicas em que é considerada erradicada, como Antártida, Japão, Reino Unido, Nova Guiné, Havaí, Taiwan, Finlândia, Suécia, Portugal, Grécia, algumas ilhas das Antilhas e do Atlântico (WHO, 2017).

2.2.1. Etiologia

A raiva é causada por um vírus neurotrópico pertencente à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus*, que apresenta forma cilíndrica, semelhante a uma bala de revólver (Figura 1), com diâmetro variando entre 45nm e 100nm e comprimento entre 100nm e 300nm, de acordo com a amostra considerada. O vírus é sensível a solventes lipídicos e detergentes; é inativado por temperaturas altas, podendo ser destruído a 50°C durante 15 minutos. É sensível a luz solar, ao dessecamento, aos raios ultravioletas 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).

O *virion* é envelopado, composto por um envoltório com dupla membrana lipoproteica, da qual emergem espículas de composição glicoproteica e contém de 1% a 2% de ácido nucleico. O seu ribonucleocapsídeo mede 700nm de comprimento

e 20nm de diâmetro e possui conformação helicoidal (FAUQUET et al., 2004; VIEIRA 2012).

O material genético é constituído por RNA de fita simples, não segmentado, com polaridade negativa (ITO, 2014).

Estudos têm demonstrado que, além do RNA genômico, existem cinco proteínas estruturais do *virion*: uma RNA polimerase RNA-dependente (proteína L de 190KDal), uma glicoproteína de superfície (proteína G de 65KDal a 80KDal), uma nucleoproteína (proteína N de 57KDal a 62KDal), uma fosfoproteína (proteína NS ou M1 de 35KDal a 41KDal) e uma proteína matriz (proteína M ou M2 de 22KDal a 25KDal) (Figura 1). Duas dessas proteínas são de especial interesse para os estudos de epidemiologia molecular e o desenvolvimento de proteção contra os *Lyssavirus*: a nucleoproteína (N) do RNA, que é um antígeno grupo específico, e a glicoproteína (G) das projeções encontradas na superfície do *virion*, contendo também os principais epítomos vírus neutralizantes dos Rhabdovirus (OLIVEIRA, 2009).

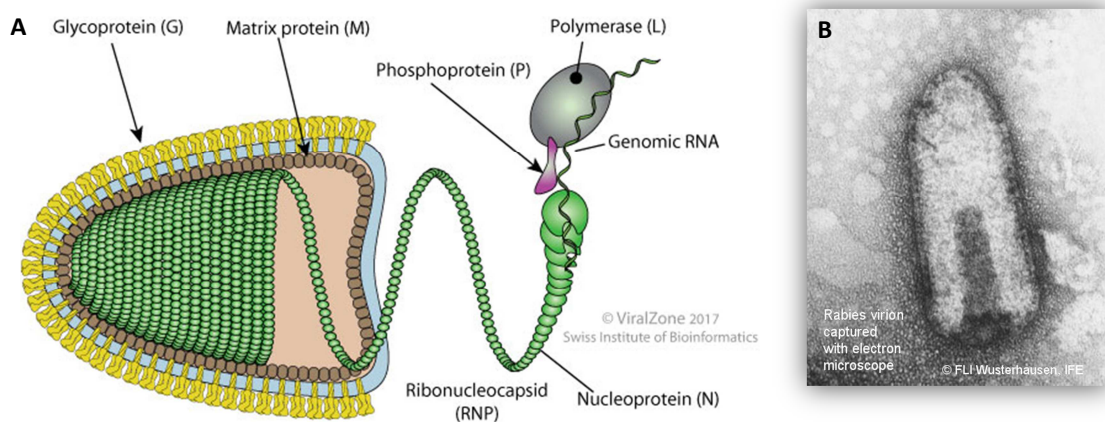


Figura 1. Vírus da raiva. A) Esquema com representação das cinco proteínas virais, genoma, ribonucleocapsídeo e envelope. Nucleoproteína (N), glicoproteína (G), proteína matriz (M), fosfoproteína (P) e proteína RNA polimerase RNA-dependente (L). B) Vírus da raiva visto por foto de microscopia eletrônica, demonstrando seu formato cilíndrico. (Fonte: ViralZone 2017; LYLES; RUPPRECHT, 2007).

A nucleoproteína (N), principal componente viral e principal proteína no ribonucleocapsídeo, é constituída por 450 aminoácidos e tem 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). É a proteína mais conservada em similaridade de sequência de aminoácidos entre as espécies do vírus da raiva, apesar de ocorrer uma diversidade em uma pequena região do seu gene. Por essa razão, na biologia molecular, para detecção do vírus, tem-se utilizado o gene da nucleoproteína (BOURHY; KISSI; TORDO, 1993; OLIVEIRA, 2009).

O envelope viral é composto pela glicoproteína (G) e pela proteína matriz (M). A proteína G forma as espículas que se projetam na superfície da partícula viral, possui capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva, é responsável pela adsorção viral a receptores específicos nas células dos hospedeiros e pela patogenicidade e patogênese da enfermidade (WUNNER, 2007; OLIVEIRA, 2009). Assim, uma variação no gene que a codifica pode afetar a imunogenicidade, a patogenicidade e o neurotropismo do vírus. A proteína M, por sua vez, mantém a ligação entre o envelope e o ribonucleocapsídeo (Figura 1) (BANERJEE, 1987; RODRIGUEZ et al., 2007).

De uma maneira geral, os *Lyssavirus* possuem um genoma bastante simples e compacto, com pouco desperdício de espaço. O genoma do vírus da raiva é composto por RNA de sentido negativo e apresenta o tamanho de 12 kb, contendo cinco ORFs que codificam, na sequência, as seguintes proteínas: 3' - N, P, M, G e L - 5'. No caso da nucleoproteína, a ORF possui 1350 bases (posição 71 a 1421 no genoma completo), o que resulta em uma proteína de 450 aminoácidos. O genoma completo do vírus da raiva possui 11843 bases de nucleotídeos (Figura 2) (TORDO et al., 1988; VIEIRA, 2012).



Figura 2. Representação do genoma completo do vírus da raiva. (Fonte: CDC, 2017).

O gênero *Lyssavirus* possui 14 espécies, conforme a última resolução do Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (ICTV), sendo assim apresentado: espécie I, *Rabies lyssavirus* (RABV), considerado o vírus clássico da raiva, distribuído mundialmente e com grande importância na saúde pública e veterinária; espécie II, *Lagos bat lyssavirus* (LBV), isolado na África de morcegos frugívoros; espécie III, *Mokola lyssavirus* (MOKV), isolado na Nigéria; espécie IV, *Duvenhage lyssavirus* (DUVV), isolado na África de morcegos insetívoros; espécie V, *European bat 1 lyssavirus* (EBLV-1) isolado na Europa de morcegos insetívoros; espécie VI, *European bat 2 lyssavirus* (EBLV-2), isolado na Europa de morcegos insetívoros; espécie VII, *Australian bat lyssavirus* (ABL), isolado na Austrália de morcegos frugívoros e insetívoros; espécie VIII, *Aravan lyssavirus* (ARAV), isolado na Ásia Central de morcegos insetívoros; espécie IX, *Khujand lyssavirus* (KHUV), isolado na Ásia Central de morcegos insetívoros; espécie X, *Irkut lyssavirus* (IRKV), isolado na Rússia de morcegos insetívoros; espécie XI, *West Caucasian bat lyssavirus* (WCBV), isolado na região Caucásica de morcegos insetívoros; espécie XII, *Shimoni bat lyssavirus* (SHIBV), isolado de morcegos no Quênia; espécie XIII, *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV), isolado do morcego insetívoro *Myotis nattereti* na Alemanha; e a espécie XIV, *Ikoma lyssavirus* (IKOV), isolado do mamífero carnívoro *Civeta-africana* (*Civetticus civetta*) na Tanzânia em 2009 (ICTV, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), é considerada como raiva apenas a enfermidade causada pela espécie I, classificando as demais como “encefalites relacionadas” e considerando como “aparentados” os vírus pertencentes às outras espécies (WHO, 2017).

Ainda, dentro de uma mesma espécie, pode haver uma nova classificação do vírus da raiva, em variantes, de acordo com as diferenças genéticas e antigênicas. As variantes permanecem estáveis quando infectam hospedeiros de uma mesma espécie animal; quando a transmissão ocorre entre espécies diferentes de hospedeiros, que não são consideradas reservatórios naturais da enfermidade, o vírus sofre mutações, caracterizando o *spillover* (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). Esse contato entre espécies animais diferentes pode ocasionar o surgimento de novas variantes do vírus da raiva (CARNIELI JR et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2007).

No Brasil, desde 1996, foram identificados cinco variantes para o vírus da raiva: variante 2, do cão, também isolada de humanos e animais silvestres terrestres; variante 3, do morcego *Desmodus rotundus*, também isolada de outras espécies de quirópteros, animais de companhia, domésticos, silvestres terrestres e humanos; variante 4, do morcego *Tadarida brasiliensis*, também isolada de outras espécies não hematófagas e animais de companhia; uma variante semelhante à variante 5, também relacionada a isolamentos de morcegos hematófagos em outros países, morcegos não hematófagos e em animais de companhia; variante 6, isolada de morcego insetívoro *Lasiurus cinereus*. Além desses, ainda foram encontrados no Brasil, outras três variantes do vírus da raiva sem proximidade antigênica ou qualquer relação genética conhecida com as variantes encontradas em morcegos ou mamíferos terrestres nas Américas, sendo a variante do sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), isolada no Estado do Ceará (FAVORETTO et al., 2001) e as variantes Raposa-1 e Raposa-2, que possuem como reservatório o cachorro-domato (*Cerdocyon thous*), isoladas no Estado da Paraíba (FAVORETTO et al., 2006) e outras variantes específicas de morcegos insetívoros (FAVORETTO et al., 2002; ITO, 2005; KOBAYASHI et al., 2005; LIMA et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007; CARNIELI JR et al., 2009; SÃO PAULO, 2009). Entre os quirópteros, também foram descritas variantes genéticas para as espécies de quirópteros insetívoros *Lasiurus* spp., *Histiotus* spp., *Eptesicus furinalis*, *Molossus* spp. e *Nyctinomops laticaudatus*, *Tadarida brasiliensis*, *Myotis* spp. (KOBAYASHI et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

No Brasil, em 2006, foi registrada a introdução da variante viral 1 (canina) no Município de Corumbá/MS. Essa variante não havia sido registrada até aquele momento em território brasileiro. Posteriormente, em 2009, entre os 26 casos caninos notificados naquele ano, a mesma variante foi identificada em um cão no Município de Ladário/MS. Recentemente, em 2015, outro caso de cão doméstico positivo com essa variante foi encontrado no Município de Corumbá/MS. A variante 1 é comum em países da América Latina que fazem fronteira com o Brasil, indicando a necessidade de cuidados mais rigorosos nessas áreas do país (WADA et al., 2011; BRASIL, 2017a).

2.2.2. Patogenia, sinais clínicos e diagnóstico

A transmissão do agente etiológico se dá por meio da saliva de um animal infectado, inoculada no organismo da vítima pela mordedura, arranhadura ou lambadura de mucosas íntegras ou pele previamente lesada. O vírus é considerado neurotrópico; instala-se e se multiplica inicialmente no ponto de inoculação, atingindo as terminações nervosas periféricas e, posteriormente, o sistema nervoso central (SNC), causando uma encefalomielite aguda (MURRAY et al., 2000; BATISTA et al., 2007; FORTES et al., 2007).

Pelo Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) 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).

Na saliva de cães e gatos, o vírus da raiva pode ser detectado entre quatro e dois dias antes do aparecimento dos sinais clínicos, persistindo durante toda a evolução da doença, levando o animal à morte entre cinco e sete dias após a apresentação dos sinais clínicos (REICHMANN, 2007; ITO, 2008).

O período de incubação da enfermidade é bastante variável, podendo se prolongar de dias até anos, com média de 45 dias no ser humano, de 10 dias a dois meses em cães, gatos e morcegos, podendo para os últimos, estender-se por mais tempo. A intensidade dos sinais clínicos também varia muito, conforme o local e a gravidade da lesão provocada pelo animal transmissor, a proximidade de troncos nervosos e a concentração de partículas virais inoculadas (ALVES et al., 2003; FORTES et al., 2007; ITO, 2008; BRASIL, 2009; SÃO PAULO, 2009).

Com relação à sintomatologia no animal doente, didaticamente a raiva pode se apresentar de duas formas. A raiva furiosa (“síndrome do cachorro louco”), muito conhecida no meio urbano, caracterizada pela inquietação, anorexia devido à dificuldade de deglutição, e latido bitonal com posterior paralisia, coma e consequente morte do animal; no transcorrer da evolução da doença, ocorre uma excitação do SNC, exacerbando as sensações dolorosas, pois afeta também o centro da dor, promovendo uma resposta caracterizada pela agressividade do

animal. A raiva parálitica ou muda, em que não há inquietação ou indícios de agressividade, o animal tende a se isolar e se esconder em locais escuros, apresentando, em linhas gerais, uma paralisia progressiva que se inicia pelas patas traseiras, levando à morte (MURRAY et al., 2000; BRASIL, 2009). É importante lembrar que, em todas as formas de manifestação da doença, os animais de qualquer espécie apresentam o potencial de transmitir o vírus (SÃO PAULO, 2000).

Em morcegos predominam os sintomas da raiva parálitica, fazendo com que esses animais fiquem paralisados e sejam vistos em situações e locais não habituais, como voando durante o dia ou caídos no chão das residências, calçadas das ruas ou parques, em muros ou batentes de janelas, especialmente nas áreas urbanas. Nessas situações, as chances de ocorrer uma agressão do morcego a humanos ou animais são remotas, mas não podem ser desprezadas. Os casos de raiva humana transmitida por morcegos ocorre geralmente por manipulação indevida do animal doente (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995).

O diagnóstico laboratorial é utilizado para confirmar uma suspeita clínica de raiva. O material biológico utilizado é o encéfalo dos animais suspeitos. No caso de animais silvestres, existe a recomendação de enviar o exemplar inteiro, para que seja feita a correta identificação da espécie animal; o mesmo é válido para os quirópteros (BRASIL, 2008).

As amostras devem ser enviadas refrigeradas para um laboratório credenciado do MAPA ou do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2008). A 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). No Brasil são as técnicas mais empregadas nos Institutos e Laboratórios responsáveis pelo diagnóstico da raiva (BRASIL, 2008).

Existem ainda, outros métodos de diagnóstico como o exame histopatológico, a neutralização viral, a microscopia eletrônica, a imunistoquímica, o reconhecimento de epítopos específicos com anticorpos monoclonais (MAbs) e a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), sendo esta última, uma técnica de alta especificidade e sensibilidade que oferece um resultado rápido (DE MATTOS et al., 2001; OIE, 2017). A RT-PCR possibilita a geração de produtos

amplificados que, após o sequenciamento, permite caracterizar geneticamente o vírus da raiva, distinguindo estirpes dentro de regiões geográficas, e relacionar os dados da variante viral, do hospedeiro e da área geográfica (NADIN-DAVIS, 1998; OIE, 2017).

2.2.3. Ciclo epidemiológico

No Brasil, o ciclo epidemiológico da doença pode ser dividido em urbano, rural, silvestre terrestre e silvestre aéreo. A raiva urbana tem como principal hospedeiro o cão; em seguida está o gato que, assim como os seres humanos, são hospedeiros acidentais da raiva canina. O ciclo rural é mantido principalmente por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), que transmitem o vírus para animais de produção, causando sérios prejuízos (FERNANDES, 2003). A forma silvestre é mantida na natureza por diferentes espécies das ordens Carnívora e Chiroptera, demonstrando a importância dos animais selvagens como reservatórios da enfermidade, podendo também infectarem acidentalmente humanos e outros animais domésticos no ambiente urbano (FAVI et al., 2002; WHO, 2017).

Sabe-se que o cão é responsável por 99% dos casos de raiva em seres humanos no mundo (WHO, 2017). No Brasil, em áreas urbanas, o controle progressivo da raiva canina, feito por meio das campanhas municipais de vacinação contra a raiva em cães e gatos e também pelas campanhas de educação em saúde, contribuiu para a redução dos casos de raiva humana provocadas pela variante canina. Dessa forma, a raiva silvestre, especialmente aquela transmitida por morcegos, passou a ganhar destaque no cenário nacional (CARNEIRO et al., 2009). Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2011 a 2017, esses animais representaram cerca de 37% dos casos de transmissão do vírus e desenvolvimento da raiva humana no Brasil (BRASIL, 2017b). No Estado de São Paulo, o vírus da raiva isolado de cães e gatos raivosos tem sido identificado como pertencente à variante do morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) e de diferentes espécies de morcegos não hematófagos, e não à variante canina, o que alerta para a importância dos quirópteros na transmissão da doença (BRASIL, 2017b).

2.3. A raiva em morcegos não hematófagos

A raiva em morcegos não hematófagos foi relatada, pela primeira vez, em um surto da doença em Trinidad, em 1925 (PAWAN, 1936). No entanto, o primeiro relato de raiva em morcego insetívoro, confirmado laboratorialmente, deu-se nos Estados Unidos da América (EUA), em 1953, atentando para um especial interesse nesse país onde, nos anos de 2008 a 2017, 11 dos 23 casos humanos notificados foram causados por variantes dessas espécies (CHILDS, 2002; CDC, 2017).

No Brasil, a primeira observação de raiva em morcegos foi em espécie hematófaga (CARINI et al., 1911); em 1957, no Rio de Janeiro, foi comunicado o primeiro caso de raiva em morcego não hematófago *Phyllostomus hastatus hastatus* (SILVA, 1961). A partir de então, o isolamento do vírus em morcegos não hematófagos foi relatado em vários estados brasileiros (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995; DEUS; BECER; NAVARRO, 2003; LANGONI et al., 2007; SÃO PAULO, 2009).

Os morcegos insetívoros e frugívoros, também presentes no meio urbano, eliminam o vírus nas fezes, urina e glândulas salivares (SCHEFFER et al., 2007; SILVA, 2007). Infectam-se durante as diferentes interações com outros morcegos hematófagos ou não-hematófagos portadores do vírus rábico e podem também transmitir acidentalmente a raiva, por meio do contato direto com a espécie humana e outros animais (CARNEIRO et al., 2009). Nas cidades, devido à habilidade de se alimentar a partir de variadas fontes como insetos, folhas e néctar, e de se adaptar a diferentes habitats, os morcegos encontram, de forma fácil, abrigo e diversidade de alimentos, instalando suas colônias em edificações ou próximo a elas, fortalecendo a importância dessas espécies na cadeia epidemiológica da raiva (UIEDA; BRED, 2016).

Após a década de 80, com o controle progressivo da raiva canina em muitos municípios brasileiros e incorporação da tipificação genética e antigênica aos programas de vigilância, uma preocupação com a raiva transmitida pelos morcegos não hematófagos começou a se difundir (DE MATTOS et al., 2000).

No Brasil, até o momento, foram catalogadas 180 espécies de morcegos, e os insetívoros e frugívoros são os exemplares mais representativos nas áreas urbanas

(REIS et al., 2011; BORDIGNON et al., 2017). O número desses animais nos centros urbanos tem aumentado consideravelmente, devido à proximidade entre as áreas urbanas e áreas de vegetação naturais, em decorrência do desmatamento, da atividade agropecuária, da mineração e da urbanização, reduzindo ou extinguindo os abrigos naturais. Isso levou os quirópteros a se alojarem em construções humanas como casas, bueiros e túneis, e conseqüentemente, aumentou a probabilidade do contato dessas espécies com humanos e animais domésticos (UIEDA; BRED, 2016). Segundo dados do Instituto Pasteur, São Paulo, entre os anos de 2005 e 2007, 160 morcegos não hematófagos foram diagnosticados positivos para a raiva pelo Laboratório de Diagnóstico e, destes, 104 foram classificados como pertencentes às espécies insetívoras (OLIVEIRA, 2009). Dados mais recentes não estão disponíveis.

Ainda é comum encontrar espécies diferentes de morcegos não hematófagos e hematófagos dividindo o mesmo abrigo, o que pode ser um facilitador de transmissão de agentes infecciosos entre os mesmos (AZUAGA, 2015).

Embora os morcegos ocorram no mundo todo, exceto em regiões polares e algumas ilhas oceânicas, a sua distribuição é limitada pela oferta de alimentos. Como resultado, os morcegos insetívoros, que podem ter seu alimento amplamente distribuído, formam o maior grupo entre os quirópteros, compreendendo 70% do total de espécies. Esses morcegos apresentam uma importância para o meio ambiente, que deve ser considerada, e não devem ser julgados somente como transmissores de enfermidades. Atuam como controladores de insetos e pragas de lavouras e estima-se que algumas espécies possam comer quantidades correspondentes a uma vez e meia o seu peso em uma única noite. Além disso, capturam coleópteros (besouros) e isópteros (cupins) que atacam a estrutura de casas construídas com madeira. Podem ainda, agir como controladores de populações de insetos transmissores de doenças, como a dengue (FABIAN; GREGORIN, 2007; UIEDA; BRED, 2016).

Segundo Carneiro et al. (2009), o uso de inseticidas químicos, por exemplo os piretróides, como método de controle de vetores de endemias urbanas, como a malária, leishmaniose, dengue, zika, chikungunya e febre amarela, aplicados em áreas de colônias de morcegos insetívoros geram estresse, diminuindo a resistência dos animais, podendo causar sua morte ou facilitar o desenvolvimento de doenças

como a raiva naqueles que albergam o vírus (FABIAN; GREGORIN, 2007; UIEDA; BRED, 2016).

Dessa forma, diante da importância que os morcegos representam para o meio ambiente e que vêm assumindo na epidemiologia da raiva em centros urbanos, faz-se necessário o estímulo para novas pesquisas, especialmente sobre o comportamento e a distribuição das espécies de morcegos no ambiente urbano, em particular as insetívoras. O estudo do comportamento do vírus da raiva em morcegos também é importante e necessário para complementar os conhecimentos. A correta identificação das espécies de quirópteros também se faz fundamental, pois cada uma apresenta características biológicas peculiares, que são importantes na avaliação preliminar da situação encontrada. Separar morcegos em apenas dois grupos, (hematófagos e não hematófagos) dificulta o estudo, prejudicando o conhecimento do papel dessas espécies na epidemiologia da raiva. Esses estudos ainda são escassos no Brasil e necessários para orientar a implantação de medidas educativas para a população, com informações importantes sobre os riscos contidos na interação desses animais no ambiente urbano (CARNEIRO et al., 2009).

2.4. Morcegos *Nyctinomops* spp.

A família Molossidae, presente em larga escala em diferentes municípios do país, é composta por 16 gêneros e 86 espécies, distribuídas no mundo todo. Somente em território brasileiro foram identificados sete gêneros, entres eles os *Nyctinomops*, *Tadarida*, *Eumops* e *Molossus*, e 24 espécies. Todos os representantes desta família possuem cauda que se projeta além da membrana interfemural, o que dá o nome popular de “morcegos de cauda livre” (GREGORIN; TADDEI, 2002; PERACCHI et al., 2010; REIS et al., 2011).

O gênero *Nyctinomops* é constituído por quatro espécies, das quais três são encontradas em território brasileiro, o *Nyctinomops aurispinosus*, o *Nyctinomops macrotis* e o *Nyctinomops laticaudatus* (REIS et al., 2011).

Esses morcegos apresentam asas longas e estreitas, cuja envergadura varia entre 240mm e 450mm, possibilitando um voo rápido e manobrável. Também possuem orelhas largas e rugosas, variando em tamanho e forma, com as bordas

internas unidas por uma estreita faixa de pele na linha mediana da cabeça. O focinho é largo e de aspecto truncado e as narinas são direcionadas lateralmente. Apresentam pelos curtos, com aspecto aveludado, podendo a coloração variar de marrom escuro a marrom avermelhado ou acinzentado. Ainda, os morcegos da espécie *N. laticaudatus* apresentam uma pelagem dorsal de coloração castanho escuro e a ventral levemente mais clara. A base dos pelos é mais clara que a extremidade distal. O lábio superior é pregueado, formando sulcos verticais. As orelhas projetam-se para a frente e os incisivos superiores são distintamente separados entre si devido a uma reentrância palatal. O comprimento cabeça, corpo e cauda pode variar de 102mm a 139mm, sendo que o *N. laticaudatus* é a menor espécie e o *N. macrotis*, a maior, com peso variando de 11,3g a 20,6g (FABIAN; GREGORIN, 2007; REIS et al., 2011).

Podem apresentar dimorfismo sexual, com machos maiores do que as fêmeas; também são coloniais, com reconhecimento individual de chamados para reunir mães e seus filhotes, que costumam nascer no período da primavera-verão no Hemisfério Sul (FABIAN; GREGORIN, 2007; REIS et al., 2011).

Há registro da presença das três espécies de *Nyctinomops* na maior parte do Brasil. No caso do *N. laticaudatus*, existe nos Estados do AP, AM, BA, CE, DF, ES, MA, MG, MS, MT, PA, PE, PI, PR, RJ, RS, SC, SP e, de acordo com a IUCN, essas espécies de morcegos não apresentam risco de extinção (FABIAN; GREGORIN, 2007; REIS et al., 2011).

Com relação aos hábitos alimentares, são quirópteros exclusivamente insetívoros, alimentando-se preferencialmente de insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera, e podem dividir o mesmo abrigo com outras espécies de morcegos. No Brasil, embora essas espécies possam se deslocar, não se conhece casos de migrações a longas distâncias ou hibernações, o que costuma acontecer em áreas muito frias (FABIAN; GREGORIN, 2007; REIS et al., 2011).

Em áreas de vegetação natural preservada, de um modo geral, essas espécies de morcegos costumam abrigar-se em cavernas, tocas de pedras, ocos de árvores, no meio de folhas, principalmente de palmeiras, árvores caídas, raízes na beira de rios e cupinzeiros. No Brasil, nas áreas urbanas, são encontrados em pontes, forros de prédios e de casas de alvenaria, em tubulações fluviais, pedreiras abandonadas,

juntas de dilatação de prédios, toldos de construções, interior de churrasqueiras em quintais e até em aparelhos de ar condicionado (FABIAN; GREGORIN, 2007).

Ainda, exemplares dessas espécies são recebidos em abundância pelos serviços de vigilância municipais, em decorrência do atendimento aos cidadãos que encontram esses animais caídos ou em situações suspeitas de raiva (REIS et al., 2011; UIEDA, 2012; UIEDA; BRED, 2016).



Figura 3. Morcego insetívoro *Nyctinomops laticaudatus*, comum em áreas urbanas no Brasil. (Fonte: www.mammalogy.org).

2.5. Controle e prevenção da raiva em áreas urbanas

No Brasil, em 1973, foi criado pelo Ministério da Saúde em parceria com a OMS e a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR), com a implantação de atividades que objetivavam auxiliar na prevenção e controle da raiva. Os casos de raiva humana diminuíram sensivelmente com a implantação do Programa mas, ainda assim, em torno de três a quatro pessoas morreram, em média anualmente no Brasil, para o período avaliado entre 2008 e 2017 (BRASIL, 2010; BRASIL, 2017b).

A princípio, o objetivo do PNPR era a vacinação em massa de cães e gatos, o recolhimento de cães errantes, o atendimento de pessoas envolvidas em agravos com animais, a observação clínica de cães e gatos, a profilaxia em pessoas expostas ao risco de infecção rábica, a vigilância epidemiológica que contempla, principalmente, o controle de áreas de foco, e a colheita e envio de material para exames laboratoriais, sendo a avaliação da circulação do vírus na espécie canina

um dos principais parâmetros para que a doença seja considerada controlada (SÃO PAULO, 1999; BRASIL, 2017b); para isso, foram construídos laboratórios para o diagnóstico rápido da doença (BRASIL, 2017a).

Outro objetivo foi a criação e implantação de programas de educação em saúde, visando a ampla participação da sociedade no controle da doença, levando-se em conta algumas variáveis, como: faixa etária, sexo, local de ocorrência, residência do agredido e do animal agressor, espécie agressora e sua situação vacinal, que são itens fundamentais para que se realize um trabalho de orientação e educação enfocando os cuidados com os animais e os riscos da exposição às agressões (ROLIM et al., 2006). Também é previsto o controle da população de animais errantes por meio do recolhimento, esterilização e eutanásia, se for o caso, realizado pelas prefeituras municipais (SÃO PAULO, 2000; BRASIL, 2007).

A OMS, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Aliança Global para o Controle da Raiva (GARC) estabeleceram, mais recentemente, a ação global “Unidos contra a raiva” para providenciar estratégias comuns no mundo todo na tentativa de zerar os casos de raiva humana pela variante canina até o ano de 2030 (WHO, 2017).

Ainda, no Brasil, a comunidade científica vem discutindo a possibilidade de criação de um programa nacional para marcação de morcegos, por meio do anilhamento, como forma de viabilizar a realização de estudos sobre história natural e ecologia de quirópteros com maior abrangência temporal e espacial. Esse tipo de monitoramento de morcegos facilitaria entender as relações que essas espécies desenvolvem dentro de sua colônia ou com outras espécies animais presentes no ambiente em que vivem, podendo auxiliar no controle e na prevenção da raiva por morcegos nas áreas urbanas no Brasil (BARROS; LUZ; ESBÉRARD, 2012).

2.6. Importância da filogenia e da filogeografia para o estudo da raiva

Diferentes métodos de pesquisa e de estatística surgiram ao longo dos anos para auxiliar o diagnóstico e a compreensão da epidemiologia da raiva. A tipificação antigênica com Mabs, desenvolvida por Victor & Koprowski desde 1978, e posteriormente, a análise de sequências nucleotídicas, têm sido utilizadas para

identificar variantes virais associadas a focos de raiva em todo o mundo (BUENO-SILVA, 2012). Esses dados, associados àqueles obtidos por meio da vigilância epidemiológica, podem auxiliar, efetivamente, na identificação do reservatório animal envolvido (SCHEFFER et al., 2007).

A filogeografia surge, neste contexto, como uma modalidade que vem se mostrando eficaz para o estudo da raiva em diferentes áreas terrestres e para auxiliar em atividades de controle e prevenção da doença em diversos serviços de saúde. É uma metodologia abrangente que integra dados genéticos com a geografia e pode ser definida como “o estudo dos princípios e dos processos que delineiam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas” (AVISE, 1994). No Brasil, os estudos filogeográficos da fauna ainda são escassos frente à diversidade (MARTINS E DOMINGUES, 2011). Levantamento feito por Castro (2010) aborda a necessidade de mais estudos sobre a filogeografia em áreas de maior biodiversidade.

Nesse tipo de estudo, em primeiro lugar, são estabelecidas as relações filogenéticas de um grupo de organismos, o que pode ser feito por meio da pesquisa, por exemplo, de sequências de nucleotídeos de um determinado gene. Em seguida, é avaliado se há agrupamentos e se estes são compostos de indivíduos que ocorrem em uma mesma área geográfica. Também se observa se há grupos de indivíduos com relações filogenéticas próximas em regiões vizinhas, buscando avaliar se há congruência entre linhagens genéticas e sua distribuição espacial (MIYAKI, 2009).

Ainda, a análise filogeográfica pode ser feita em vários níveis taxonômicos e traz dados relevantes para a biogeografia histórica. Outro ponto importante é que alguns dados genéticos permitem estimar o tempo de divergência entre linhagens; assim, conhecendo onde e quando a divergência ocorreu, é possível tentar associar dados de geologia, clima, palinologia e tantos outros, para buscar entender melhor como a diversificação das linhagens ocorre (MARTINS E DOMINGUES, 2010).

Ao se estudar uma enfermidade, como a raiva, na análise filogeográfica devem-se incluir, também, informações sobre dados da vigilância epidemiológica correspondentes ao caso para identificar as circunstâncias em que se desencadeou o foco, além das espécies animais envolvidas e os aspectos que contribuíram para a perpetuação do vírus na natureza. Dessa forma, é possível obter uma pesquisa

completa e rica em informações para auxiliar no controle e na prevenção da doença (SCHEFFER et al., 2007).

No Brasil, um estudo filogeográfico envolveu a análise de 41 amostras do vírus da raiva, obtidas de herbívoros e morcegos (*Desmodus rotundus* e *Artibeus lituratus*) de diferentes regiões dos Estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, entre os anos de 2006 e 2010. Observou-se a formação de três linhagens distintas, e semelhanças entre amostras originárias de áreas de baixa e de média altitude. Outro resultado foram as semelhanças genéticas entre as amostras de municípios localizados nas fronteiras dos dois estados, o que, segundo as análises filogeográficas, deu-se devido à migração do morcego hematófago, uma vez que, em ambas as regiões o relevo montanhoso favorece o abrigo para esses animais. Os autores afirmam que uma compreensão mais aprofundada da dinâmica da propagação do vírus da raiva é fundamental para auxiliar nas estratégias de controle da doença e que, para isso, também é necessária uma caracterização molecular que auxiliará a esclarecer aspectos da epidemiologia da raiva em diferentes regiões do Brasil (VIEIRA et al., 2012).

Em outro trabalho foram comparadas 71 sequências do gene da nucleoproteína N de vírus da raiva isolados de cães de diferentes regiões do Brasil, no período de 1986 a 2006. Após as análises filogenéticas, puderam ser formados dois agrupamentos: o grupo A, com amostras que apresentavam semelhanças genéticas, originárias das regiões Sudeste e Centro-Oeste; e o grupo B, com exemplares das regiões Sudeste, Nordeste e Norte. Um dado interessante do estudo foi a semelhança filogenética e cronológica encontrada entre amostras de municípios do Maranhão e do Rio Janeiro, todas obtidas em torno dos anos 1980, indicando uma origem comum para o vírus da raiva encontrado nesses locais. Isto pode ter ocorrido devido à intensa migração de famílias e seus animais de estimação entre os Estados no período. Outro ponto importante que os autores discutem é o uso do gene da nucleoproteína N nesse estudo, pois como se trata de uma região do vírus da raiva altamente conservada, facilita a identificação das variantes do vírus, permitindo a formação dos agrupamentos o que, futuramente, pode possibilitar a comparação com outras variantes e a identificação de suas

origens, contribuindo para o estudo da epidemiologia molecular da raiva (CARNIELI JR et al., 2011).

Outros estudos genéticos envolvendo a filogenia, realizados com amostras de vírus da raiva de morcegos insetívoros brasileiros, apontaram a existência de linhagens virais espécie-específicas relacionadas aos gêneros *Eptesicus*, *Nyctinomops* e *Molossus* (KOBAYASHI et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007). Assim, a caracterização molecular também é fundamental para determinar a presença de diferentes ciclos endêmicos e potencial transmissão inter-espécies. Como nos centros urbanos é comum a convivência entre humanos, animais domésticos e morcegos, torna-se importante compreender a epidemiologia da raiva nessas localidades (OLIVEIRA, 2009).

Segundo Escobar et al. (2013), pouco se sabe sobre o papel dos morcegos nos aspectos ecológicos e na forma como se distribui geograficamente o vírus da raiva em suas espécies. O autor também reforça a participação dos morcegos insetívoros como importantes reservatórios naturais da raiva, especialmente nas Américas, e que as estirpes virais são definidas por uma população de vírus mantida por um reservatório em um determinado espaço geográfico e podem ser distinguidas de outras estirpes baseado nas características moleculares e antigênicas. Por fim, o estudo indica que um trabalho envolvendo a filogenia e a filogeografia ajudam no controle da raiva e de outras enfermidades emergentes ligadas aos morcegos, que possam causar sérios problemas no presente ou no futuro.

Dessa forma, estudos que busquem caracterizar e estudar as diferentes amostras virais encontradas em quirópteros, associando dados da vigilância epidemiológica e informações sobre geografia e a evolução da espécie, devem ser estimulados, a fim de auxiliar no controle efetivo e na prevenção da raiva.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Realizar um estudo filogenético e filogeográfico de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp. de diferentes regiões do Brasil.

3.2. ESPECÍFICOS

- Realizar a análise filogenética de amostras do vírus da raiva provenientes de morcegos *Nyctinomops* spp..
- Conhecer o perfil de deslocamento geográfico da linhagem de vírus rábico oriundo de morcegos *Nyctinomops* spp. e inferir o tempo decorrido nesse deslocamento em diferentes regiões no Brasil, a partir das amostras de vírus da raiva estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi submetido para análise e autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP (Protocolo nº 021916/14).

4.1. Amostras

Foram utilizadas 71 amostras de vírus da raiva (RABV) isoladas de morcegos insetívoros do gênero *Nyctinomops* spp. e provenientes de diferentes municípios dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, Bahia, Rio Grande do Norte e Ceará (Figura 4 e Tabela 1).

As amostras foram enviadas para o Laboratório de Diagnóstico da Raiva Animal do Instituto Pasteur, São Paulo, entre os anos de 2008 e 2016, para a vigilância epidemiológica da raiva, e após terem sido diagnosticadas como positivas para a enfermidade, por IFD (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996) e pela prova biológica de inoculação em camundongos (KOPROWSKI, 1996), foram disponibilizadas para a realização desta pesquisa.

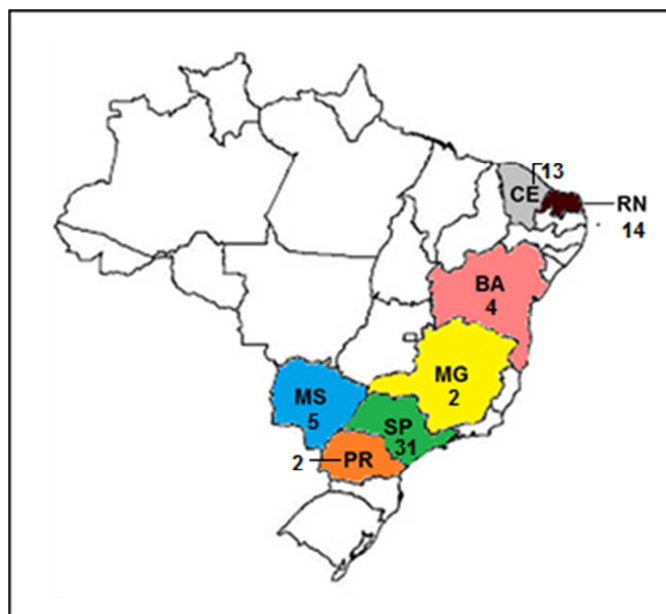


Figura 4. Região de origem e número das amostras de vírus da raiva de morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp. utilizadas no presente estudo.

Tabela 1. Amostras do vírus da raiva utilizadas no estudo, diagnosticadas como positivas pela técnica de imunofluorescência direta e pela prova biológica de inoculação em camundongos no Instituto Pasteur, São Paulo, no período de 2008 a 2016.

AMOSTRA	HOSPEDEIRO	ORIGEM
1127_08	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
3202_08	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Valinhos-SP
3233_08	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	São Roque-SP
9791_08	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Mogi das Cruzes-SP
9923_08	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Piracicaba-SP
10585_08	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Araraquara-SP
3589_08	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
1373_09	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
6945_09	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
8368_09	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Sertãozinho-SP
2409_09	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Votorantim-SP
350_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Conchal-SP
412_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Barretos-SP
1491_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Barretos-SP
3005_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
1944_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
1945_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
3452_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
3457_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
3458_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
3461_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
3463_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
3465_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
3468_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
3470_10	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Caicó-RN
2396_11	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Santa Isabel-SP
5844_11	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
6322_11	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Barretos-SP
7071_11	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Conchal-SP
7266_11	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Conchas-SP
7606_11	<i>Nyctinomops macrotis</i>	São Paulo-SP
1077_12	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
2191_12	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Barretos-SP
2362_13	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Itapecerica da Serra-SP
2617_13	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Sertãozinho-SP
4619_13	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
5173_13	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Campinas-SP
6302_13	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Bela Cruz-CE
2004_13	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Tambaú-SP
IP1048_14	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP

IP1051_14	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto-SP
IP1370_14	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Belo Horizonte-MG
IP2830_14	<i>Nyctinomops sp.</i>	São Miguel-RN
IP3250_14	<i>Nyctinomops sp.</i>	Campo Grande-MS
IP3331_14	<i>Nyctinomops sp.</i>	São José dos Pinhais-PR
146_15	Quiróptero - Sem identificação	São José de Mipibu-RN
144_15	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Acari-RN
4286_15	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Salvador-BA
961_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pereiro-CE
1294_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pereiro-CE
2237_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Tabuleiro do Norte-CE
995_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Campo Grande-MS
2235_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Tabuleiro do Norte-CE
998_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Campo Grande-MS
1296_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Quixeré-CE
1942_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Natal-RN
743_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	São José dos Pinhais-PR
1300_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ererê-CE
3756_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Tabuleiro do Norte-CE
2354_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pindamonhangaba-SP
3344_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Salvador-BA
2236_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Tabuleiro do Norte-CE
1295_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pereiro-CE
3347_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Salvador-BA
1511_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Campo Grande-MS
2240_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Quixeré-CE
962_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pereiro-CE
2238_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Tabuleiro do Norte-CE
1509_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Campo Grande-MS
3348_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Salvador-BA
991_16	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Uberlândia-MG

4.2. Caracterização Molecular

Os métodos moleculares foram realizados em conjunto com o Instituto Pasteur, São Paulo e o Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP.

4.2.1. Extração de RNA

A etapa de extração do RNA total das amostras foi realizada pela equipe de pesquisadores do Instituto Pasteur, São Paulo. Foram utilizados 0,6g de sistema nervoso central (SNC) de camundongos inoculados com as amostras provenientes dos morcegos insetívoros. Para a extração adotou-se o método do TRIzol (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante. Como controle negativo foi utilizado 300µl de água ultra-pura livre de DNase e RNase; como controle positivo, foram utilizadas suspensões de SNC de camundongos inoculados com a amostra de vírus fixo da raiva CVS (Challenge Virus Standard). Em seguida, as amostras de RNA foram acondicionadas em freezer a -80°C para preservação.

4.2.2. Obtenção de DNA complementar (cDNA)

Na sequência, alíquotas das amostras de RNA obtidas de camundongos inoculados com RABV, assim como dos controles negativo e positivo, foram submetidas à reação de RT-PCR para obtenção do cDNA.

A reação RT-PCR foi realizada utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante, e os oligonucleotídeos utilizados foram o Início e o 304 (Tabela 2).

4.2.3. Amplificação parcial do gene codificador da nucleoproteína (N)

A amplificação parcial do gene codificador da nucleoproteína (N), bem como as etapas seguintes do estudo, foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo.

Para a amplificação, inicialmente, foram testados diferentes oligonucleotídeos visando encontrar a melhor combinação para a amplificação das amostras e para a obtenção de um fragmento mais longo da proteína N do RABV. Como resultado, as melhores combinações de oligonucleotídeos deram-se com o Início em combinação com o 304 ou com o p942 (Tabela 2) (ORCIARI et al., 2001; SOARES et al. 2002;

CAMPOS et al., 2011). Há relatos que mostram a utilização do oligonucleotídeo p942 como uma alternativa para a amplificação do gene codificador da proteína N em amostras de RABV que não amplificam com os oligonucleotídeos comumente utilizados (SOARES et al., 2002; ALLENDORF et al., 2012).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do gene codificador da proteína N das amostras de RABV provenientes de morcegos insetívoros do gênero *Nyctinomops* spp.

Nome	Sequência	Sentido	Posição	Referência
Início	ACGCTTAACAACAARATCARAG	Forward	1-20	Campos et al., 2011
304	TTGACGAAGATCTTGCTCAT	Reverse	1514-1533	Orciari et al., 2001
p942	CCCATATAACATCCAACAAAGTG	Reverse	1029-1007	Soares et al., 2002

As reações de amplificação foram compostas por tampão 1x (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl), 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, 0,5U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen), 5pmol de cada primer, 1µL de cDNA e água pura estéril para 20µL. A amplificação ocorreu em um termociclador programado para realizar um ciclo a 95°C por 3min, 35 ciclos a 94°C por 30seg, 52°C por 30seg e 72°C por 40seg e, para concluir, um ciclo de 10min a 72°C. O controle positivo da reação foi constituído por vírus fixo da raiva CVS; e o controle negativo, pelo mix da PCR sem cDNA.

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (0,5µg/mL) e padrão de tamanho molecular 1kb (Invitrogen) em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad).

4.2.4. Sequenciamento do fragmento amplificado do gene codificador da nucleoproteína (N)

Previamente às reações de sequenciamento, os produtos de PCR amplificados foram purificados com as enzimas Exonuclease I (Thermo Scientific) e a FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific), para evitar que outros produtos inespecíficos da PCR pudessem prejudicar os resultados.

A PCR de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit do BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante. A eletroforese de capilar ocorreu em um sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems).

Os oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento parcial do gene codificador da proteína N foram o 304 e o p942, que possibilitaram a obtenção de sequências mais longas.

4.3. Análise dos dados

4.3.1. Análise filogenética

Para a análise da qualidade de bases e obtenção das sequências consenso utilizou-se o pacote de programas Phred/Phrap/Consed (GREEN, 1996; EWING E GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). Foram obtidas sequências com cerca de 1100 pb com qualidade phred igual ou superior a 20. As sequências consenso obtidas foram comparadas a outras do gene codificador da nucleoproteína do RABV obtidas de cães, gatos, humanos, bovinos, morcego hematófago *Desmodus rotundus*, diferentes espécies de morcegos frugívoros e insetívoros, e outros animais selvagens como saguis (*Callithrix jacchus*), raposas e cachorro-domato (*Cerdocyon thous*) disponíveis no banco de dados GenBank/NCBI (National Center for Biotechnology Information). Como grupo externo, foram utilizadas três sequências do Mokola vírus (MOKV) (Tabela 3).

Todas as sequências foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004). As árvores filogenéticas foram obtidas pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utilizando-se o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) e o modelo de substituição 6 e distribuição gamma, segundo o Critério de Informação de Akaike (AIC) obtido pelo software jModelTest v2.1.7 (DARRIBA, 2012). Foram realizadas quatro corridas independentes com 9 milhões de gerações, sendo as cadeias amostradas a cada 200 gerações, rendendo 65.342 árvores com 99% de credibilidade. Ao final das análises, obteve-se desvio padrão inferior a 0,01% e 25% das árvores geradas inicialmente foram descartadas. O filograma gerado pelo MrBayes foi editado graficamente pelo software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER E MÜLLER, 2010).

Tabela 3. Relação de sequências disponíveis no banco de dados GenBank, utilizadas para a construção da árvore filogenética.

Nº acesso do GenBank	Ano	Espécie	Município	Estado	País
AB201806.1	1998	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	São José do Rio Preto	SP	Brasil
AB201807.1	1999	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	São José do Rio Preto	SP	Brasil
AB201808.1	2001	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ipirá	SP	Brasil
AB297647.1	2004	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Rio de Janeiro	RJ	Brasil
GU552801.1	2005	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Rio Claro	SP	Brasil
GU552802.1	2005	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Marília	SP	Brasil
GU552795.1	2005	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
GU552793.1	2005	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
GU552803.1	2005	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
GU552798.1	2005	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	São Sebastião	SP	Brasil
GU552799.1	2005	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
GU552797.1	2006	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
GU552800.1	2007	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Campinas	SP	Brasil
GU552794.1	2007	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
KM594035.1	2010	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	-	-	Brasil
KM594034.1	2010	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	-	-	Brasil
KM594036.1	2010	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	-	-	Brasil
AY170304.1	1999	<i>Nyctinomops macrotis</i>	-	-	EUA
AY960093.1	-	<i>Nyctinomops macrotis</i>	-	-	EUA
AB297649.1	1990	<i>Tadarida laticaudata</i>	Rio de Janeiro	RJ	Brasil
AB297648.1	1990	<i>Tadarida laticaudata</i>	Rio de Janeiro	RJ	Brasil
AF533830.1	2002	<i>Tadarida brasiliensis</i>	-	-	EUA
GU552787.1	2005	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Mogi das Cruzes	SP	Brasil
GU552786.1	2006	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Salesópolis	SP	Brasil
GU552784.1	2006	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Socorro	SP	Brasil
KM594033.1	2010	<i>Tadarida brasiliensis</i>	-	-	Brasil
KM594038.1	2010	<i>Tadarida brasiliensis</i>	-	-	Brasil
AB206417.1	2003	<i>Molossus</i> sp.	-	PB	Brasil
AB201815.1	1999	<i>Molossus molossus</i>	Jales	SP	Brasil
AB201816.1	2002	<i>Molossus molossus</i>	Ilha Solteira	SP	Brasil
AB206414.2	2003	<i>Molossus molossus</i>	Patos	PB	Brasil
GU552796.1	2007	<i>Molossus molossus</i>	Campinas	SP	Brasil
GU552789.1	2006	<i>Molossus rufus</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
AB201818.1	2000	<i>Molossus abrasus</i>	Itapira	SP	Brasil
AB201811.1	1998	<i>Eptesicus furinalis</i>	São José do Rio Preto	SP	Brasil
AB201812.1	2001	<i>Eptesicus furinalis</i>	Olímpia	SP	Brasil
AB201813.1	2001	<i>Eptesicus furinalis</i>	São José do Rio Preto	SP	Brasil
AB201814.1	2002	<i>Eptesicus furinalis</i>	Catanduva	SP	Brasil
GU552805.1	2006	<i>Eptesicus furinalis</i>	Espírito Santo do Pinhal	SP	Brasil
GU552808.1	2006	<i>Eptesicus furinalis</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
GU552809.1	2006	<i>Eptesicus furinalis</i>	Capivari	SP	Brasil

GU552811.1	2006	<i>Eptesicus furinalis</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
GU552806.1	2007	<i>Eptesicus furinalis</i>	Campinas	SP	Brasil
AB201809.1	1998	<i>Eumops auripendulus</i>	Américo de Campos	SP	Brasil
AB201810.1	-	<i>Eumops auripendulus</i>	Presidente Venceslau	SP	Brasil
GU552819.1	2005	<i>Myotis nigricans</i>	Campinas	SP	Brasil
GU552812.1	2006	<i>Myotis nigricans</i>	Nova Canaã Paulista	SP	Brasil
GU552813.1	2007	<i>Myotis nigricans</i>	Ribeirão Preto	SP	Brasil
KM594030.1	2010	<i>Myotis nigricans</i>	-	-	Brasil
KM594031.1	2010	<i>Myotis nigricans</i>	-	-	Brasil
HQ341796.1	2009	<i>Myotis chiloensis</i>	-	-	Chile
AB297650.1	2004	Morcego não hematófago	Campinas	SP	Brasil
AB297627.1	2002	<i>Artibeus</i> sp.	Paracambi	RJ	Brasil
AB117969.1	1998	<i>Artibeus lituratus</i>	Itapira	SP	Brasil
AB117970.1	1998	<i>Artibeus lituratus</i>	São José do Rio Preto	SP	Brasil
AB117971.1	1998	<i>Artibeus lituratus</i>	Novo Horizonte	SP	Brasil
AB201802.1	2002	<i>Artibeus lituratus</i>	Dracena	SP	Brasil
AB297631.1	2004	<i>Artibeus lituratus</i>	Vargem Grande Paulista	SP	Brasil
AB117972.1	1998	<i>Artibeus planirostris</i>	São José do Rio Preto	SP	Brasil
AB083807.1	1998	<i>Desmodus rotundus</i>	Pindamonhangaba	SP	Brasil
AB201805.1	2001	<i>Desmodus rotundus</i>	São José do Barreiro	SP	Brasil
AB297636.1	2000	<i>Desmodus rotundus</i>	Guarulhos	SP	Brasil
AB201803.1	2000	<i>Desmodus rotundus</i>	Lindoia	SP	Brasil
AB297635.1	2003	<i>Desmodus rotundus</i>	Tambaú	SP	Brasil
AB297637.1	2005	<i>Desmodus rotundus</i>	Cocalzinho de Goiás	GO	Brasil
AB297642.1	2005	<i>Desmodus rotundus</i>	Niquelândia	GO	Brasil
AB083805.1	1994	Bovino	São Roque	SP	Brasil
AB083803.1	1999	Bovino	Morrinhos	GO	Brasil
AB083809.1	1998	Bovino	Nova Olinda	TO	Brasil
AB083811.1	1999	Bovino	Colinas	TO	Brasil
FJ829026.1	1998	<i>Callithrix jacchus</i>	-	CE	Brasil
AY654586.1	1998	<i>Callithrix jacchus</i>	-	CE	Brasil
DQ447961.1	2001	<i>Callithrix jacchus</i>	Caucaia	CE	Brasil
FJ829027.1	2005	<i>Callithrix jacchus</i>	-	CE	Brasil
FJ829029.1	2008	<i>Callithrix jacchus</i>	-	CE	Brasil
EF152235.1	2002	<i>Cerdocyon thous</i>	-	PE	Brasil
EF194159.1	2003	<i>Cerdocyon thous</i>	-	PI	Brasil
EF152247.1	2004	<i>Cerdocyon thous</i>	-	PI	Brasil
EF152253.1	2005	<i>Cerdocyon thous</i>	-	PE	Brasil
EF152254.1	2005	<i>Cerdocyon thous</i>	-	PE	Brasil
EF152236.1	2005	<i>Cerdocyon thous</i>	-	PI	Brasil
EF152242.1	2005	<i>Cerdocyon thous</i>	-	PI	Brasil
KR781595.1	2007	<i>Cerdocyon thous</i>	-	RN	Brasil
EF152246.1	2005	Raposa do campo	-	PI	Brasil
JF693483.1	2003	Raposa	-	-	Colômbia

AB083796.1	1987	Cão	Poços de Caldas	MG	Brasil
AB083797.1	1989	Cão	Poços de Caldas	MG	Brasil
DQ447950.1	2000	Cão	Caucaia	CE	Brasil
EF152264.1	2003	Cão	-	PB	Brasil
EF152268.1	2005	Cão	-	SE	Brasil
KR781529.1	2008	Cão	-	PE	Brasil
KR781530.1	2008	Cão	-	PE	Brasil
KR781528.1	2008	Cão	-	PE	Brasil
KR781531.1	2009	Cão	-	PE	Brasil
AB083793.1	1999	Gato	Goiânia	GO	Brasil
AB083794.1	1999	Gato	Goiânia	GO	Brasil
EF152265.1	2003	Gato	-	PB	Brasil
EF152239.1	2003	Gato	-	PB	Brasil
EF152237.1	2003	Gato	-	PB	Brasil
EF152238.1	2003	Gato	-	PB	Brasil
FJ829025.1	1998	Humano	-	CE	Brasil
AY654585.1	1998	Humano	-	CE	Brasil
AB083795.1	1999	Humano	Goiânia	GO	Brasil
AB083801.1	1999	Humano	Goiânia	GO	Brasil
JX217808.1	2001	Humano	-	PI	Brasil
DQ447962.1	2002	Humano	Fortaleza	CE	Brasil
DQ447964.1	2003	Humano	Umirim	CE	Brasil
DQ447963.1	2003	Humano	Fortaleza	CE	Brasil
DQ447965.1	2003	Humano	Fortaleza	CE	Brasil
DQ447967.1	2003	Humano	Fortaleza	CE	Brasil
FJ829028.1	2008	Humano	-	CE	Brasil
KM594023.1	2008	Genoma completo RABV	-	-	Brasil
KC218932.1	-	<i>Mokola virus</i>	-	-	-
KF155006.1	-	<i>Mokola virus</i>	-	-	-
FJ465418.1	-	<i>Mokola virus</i>	-	-	-

4.3.2. Análise filogeográfica

As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelo software BEAST v2.4.7.0 (RAMBAUT et al., 2014) usando o método Bayesiano com MCMC. O modelo de substituição apropriado para a análise do conjunto de sequências foi determinado pelo método implementado no bModelTest (BOUCKAERT; DRUMMOND, 2015), pacote do software BEAST 2 v.2.4.7.0. O software BEAUti v2.4.7.0 foi utilizado para criar o arquivo no formato XML, o que permitiu que os dados pudessem ser avaliados pelo software BEAST v2.4.7.0.

Durante essa etapa, as amostras 4286_15, 2235_16, 3756_16, 1295_16, 2004_13, 2362_13, 9791_08, 3233_08, 3589_08, IP3331_14, 743_16 e 3756_16 foram desconsideradas para a análise, por não terem demonstrado estar relacionadas com a variante circulante em morcegos *Nyctinomops* ou por terem originado, após o sequenciamento, sequências menores, o que não possibilitou resultados satisfatórios na análise filogeográfica.

Em seguida, a escolha do relógio molecular e do modelo demográfico foi realizada pela análise da melhor combinação entre esses parâmetros. Para isso, foram realizadas análises combinando os diferentes relógios moleculares (strict clock, relaxed clock exponential e relaxed clock log normal) com os modelos populacionais (coalescente constant population e coalescente exponential population), obtendo-se um total de 18 arquivos no formato XML. Foi utilizado o modelo de filogeografia contínua, implementado pelo pacote GEO-SPHERE v.1.1.2. (BOUCKAERT; DRUMMOND, 2015) presente no software BEAUTi v2.4.7.0.

Ao final, os melhores resultados obtidos para a escolha do relógio molecular e do modelo demográfico foram as combinações: Relaxed Clock Exponential + Coalescent Constant Population; para o modelo geográfico, em que se adiciona longitude e latitude de cada município de origem das amostras, selecionou-se o Strict Clock.

O arquivo com o resultado do modelo geográfico foi selecionado para o andamento da análise filogeográfica. Nesse momento, o resultado foi obtido com base no maior valor de ESS (effective sample size) do parâmetro “posterior”, visualizado no software Tracer v1.6 (RAMBAUT et al., 2014). Essa análise foi baseada em uma corrida com 150 milhões de passos que foram amostradas a cada 10 milhões de passos. Os primeiros 10% de passos foram eliminados.

O arquivo resultante da análise foi utilizado para anotar a árvore filogenética com o software TreeAnnotator v2.4.7.0, pela credibilidade máxima do clado (MMC), com descarte de 10% das primeiras árvores; limite da probabilidade posterior igual a zero; e usando os valores médios de tamanho dos nós. A árvore filogenética resultante foi visualizada no software FigTree v1.4.3 (RAMBAUT, 2009).

O mesmo arquivo utilizado para visualizar a árvore do tempo foi analisado pelo software Spread3 v0.9.7.1 (BIELEJEC et al., 2011) a fim de traduzir a árvore

filogenética para o formato KML, para visualização no software Google Earth (<http://earth.google.com>), a fim de possibilitar observar a dispersão geográfica do vírus ao longo do tempo. Ao final, para melhor visualização e apresentação, o mapa gerado foi editado pelo software GIMP 2 2.8.22.

5. RESULTADOS

5.1. Análise filogenética

A árvore filogenética resultante da análise mostrou a formação de 10 grupos (Figuras 5 e 6). Revelou-se inicialmente que 65 das 72 amostras que compõem o estudo, provenientes de morcegos *Nyctinomops* spp. e quiróptero sem identificação agruparam-se no primeiro clado denominado morcegos insetívoros 1. Neste grupo, observou-se um predomínio de amostras oriundas de morcegos *Nyctinomops laticaudatus*, havendo também isolados oriundos de morcegos *Molossus* sp. e *Tadarida* spp. As amostras são exemplares originários de diferentes estados do Brasil como São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia. Notou-se também que houve uma relação genética na árvore filogenética entre amostras de regiões próximas geograficamente, havendo uma divisão entre os isolados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste com os demais do Nordeste (Figura 5).

Por outro lado, também no clado correspondente aos morcegos insetívoros 1, foram observadas algumas exceções, como as amostras IP1370_14_MG e 991_16_MG oriundos de Belo Horizonte/MG e Uberlândia/MG, que demonstraram similaridade filogenética de 99,4% e 100% com amostras de municípios do Estado de São Paulo, distantes 500 km e 700 km entre si, respectivamente. As amostras IP3250_14_MS, 998_16_MS e 1511_16_MS, originárias de Campo Grande/MS, ficaram agrupadas próximas a uma amostra de Barretos/SP, distante cerca de 690 km de Campo Grande. Também observou-se que a amostra 1509_16_MS, do mesmo município do Estado do Mato Grosso do Sul, ficou agrupada próxima a uma amostra do banco de dados, proveniente de Ribeirão Preto/SP, distante 800 km (Figura 5).

Ainda no grupo dos morcegos insetívoros 1, houve a formação de dois subgrupos, sendo um composto pela amostra 7606_11_SP do morcego *Nyctinomops macrotis* que agrupou-se próximo às duas amostras da mesma espécie animal isoladas nos Estados Unidos da América (EUA). No outro subgrupo, duas

amostras 743_16_PR e 2004_13_SP do estudo agruparam-se próximas a uma amostra de *Tadarida brasiliensis* oriunda também dos EUA (Figura 5).

Na sequência, tem-se o clado morcegos insetívoros 2, com a presença das amostras de vírus da raiva de morcegos *N. laticaudatus* 3233_08_SP de São Roque/SP, 9791_08_SP de Mogi das Cruzes/SP e 2362_13_SP de Itapeceira da Serra/SP, que mostraram proximidade genética (99,4%) com amostras de morcegos *T. brasiliensis* provenientes da mesma região do Estado. Este clado mostrou relação genética com o grupo que contém amostras de vírus da raiva da variante 3 do morcego hematófago *D. rotundus*, encontrados também em herbívoros e morcegos frugívoros *Artibeus* spp. de diferentes regiões do Brasil (Figura 6).

O clado correspondente ao grupo dos morcegos insetívoros 3 foi composto por amostras de vírus da raiva de morcegos *Molossus* sp. Já o clado morcegos insetívoros 4 apresentou a amostra IP3331_14_PR de morcego *Nyctinomops* sp. com origem no Município de São José dos Pinhais/PR, e sua similaridade filogenética de 93% com uma amostra de raposa originária da Colômbia e de 94% uma outra amostra de morcego *Myotis chiloensis* do Chile.

O clado denominado morcegos insetívoros 5, no qual encontra-se agrupada uma amostra de morcego *N. laticaudatus* do Município de Ribeirão Preto/SP (3589_08_SP), apresentou proximidade genética de 99,8% com amostras de vírus da raiva provenientes de morcegos da espécie *Myotis nigricans* de diferentes locais do Brasil. Da mesma forma, o agrupamento morcegos insetívoros 6 reuniu representantes pertencentes à linhagem encontrada em quirópteros insetívoros do gênero *Eptesicus*.

Em seguida, a amostra 3756_16_CE de morcego *N. laticaudatus*, do Município de Tabuleiro do Norte/CE, mostrou ter uma similaridade genética de 96,5% com amostras provenientes de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e raposa do campo (*Lycalopex vetulus*), caracterizando o grupo Variante *Cerdocyon thous*.

Por último, há o agrupamento com amostras relacionadas à variante 2 canina, o grupo com exemplares da variante do sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e o grupo externo composto pelo *Mokola virus* comum na África.



Figura 5. Árvore filogenética de 72 sequências da região codificadora da proteína N do vírus da raiva de morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp. de diferentes estados do Brasil. Destaque em vermelho para 65 amostras do presente estudo.

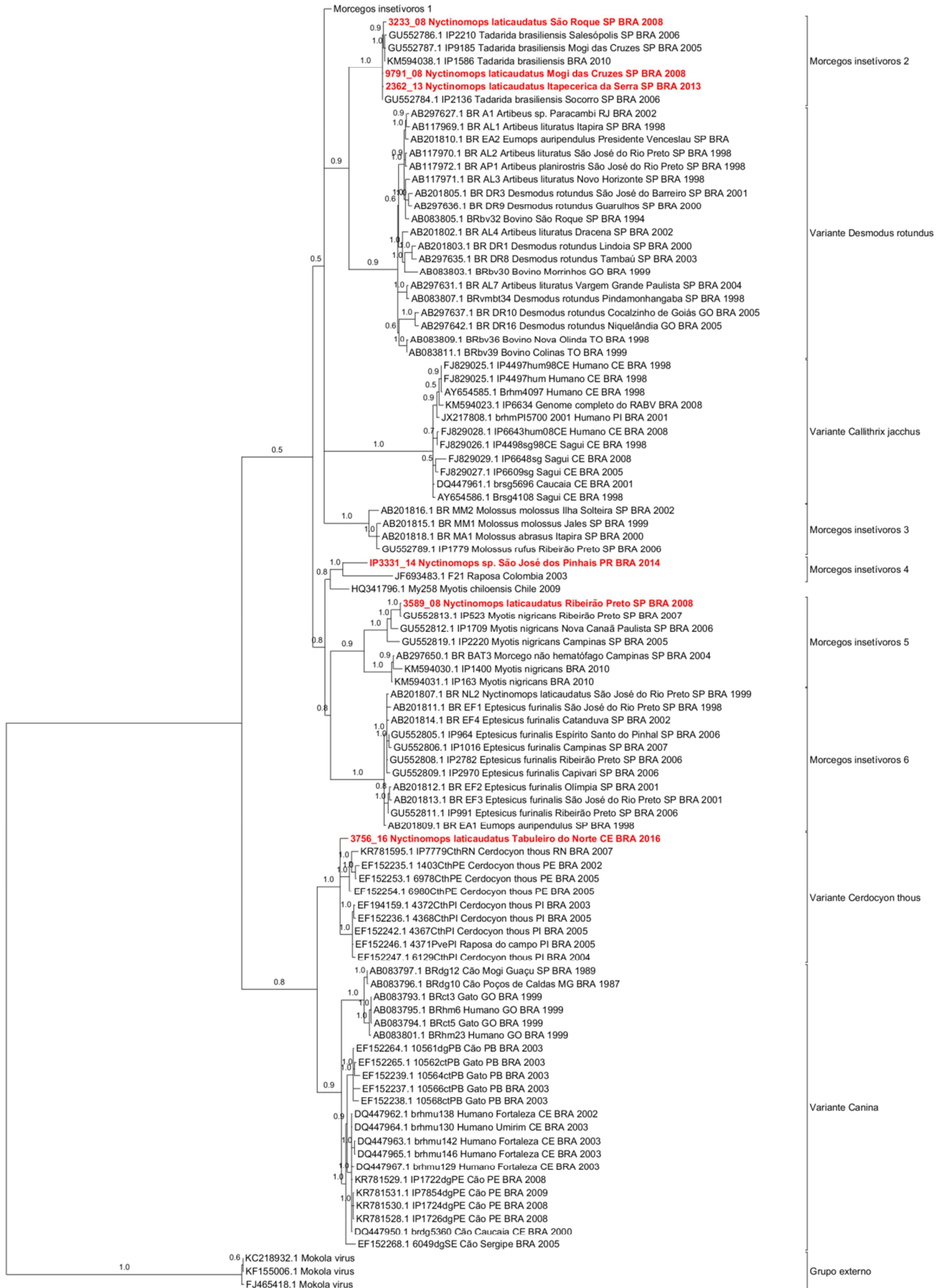


Figura 6. Árvore filogenética de 72 seqüências da região codificadora da proteína N do vírus da raiva de morcegos insetívoro *Nyctinomops* spp. e de canídeo silvestre, de diferentes estados do Brasil. Destaque em vermelho para 7 amostras do presente estudo.

5.2. Análise filogeográfica

Na análise filogeográfica foram estudadas 60 amostras do RABV provenientes de morcegos do gênero *Nyctinomops* spp. Na análise, o valor de ESS obtido para o parâmetro “posterior” foi maior que 400 e os demais parâmetros apresentaram-se acima de 200, indicando uma boa corrida.

Na árvore filogenética do tempo (Figura 7) foi possível atribuir três pontos de corte, o ano de 1989 para a formação de dois clusters principais e o ano de 2003 para a formação dos primeiros sub-clusters, representado pelas cores rosa e verde e o ano de 2008 para os sub-clusters amarelo e laranja. Ainda, de acordo com a árvore do tempo o mais recente ancestral comum (MRCA) data do ano de 1989, há 27 anos.

Quando a árvore filogenética do tempo é analisada sob uma perspectiva geográfica (Figuras 8 e 9), é possível observar uma nítida divisão, com formação de um grupo contendo as amostras provenientes dos Estados do Sudeste, Sul e Centro-Oeste, e outro grupo com as amostras da região Nordeste.

O cluster principal representado pela cor vermelha apresenta as amostras provenientes das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste. Ele foi subdividido em dois sub-clusters, representados pelas cores rosa (amostras dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul) e verde com uma amostra do Estado de São Paulo.

O segundo cluster principal, demonstrado pela cor azul, apresenta amostras de estados da região Nordeste do Brasil. Foi subdividido em dois sub-clusters representados pelas cores amarela (amostras dos Estados do Rio Grande do Norte, do Ceará e da Bahia) e laranja com uma amostra do Estado do Rio Grande do Norte.

Além disso, observou-se que as amostras tendem a se agrupar de acordo com a sua origem geográfica, assim como foi relatado na análise filogenética. Em geral, amostras provenientes de regiões próximas formaram dentro dos sub-clusters, sub-grupos com alta proximidade genética. As exceções aconteceram com as seguintes amostras: (i) 2354_16_SP e 991_16_MG dos municípios de Pindamonhangaba/SP e Uberlândia/MG, respectivamente, distantes em torno de 200 km a 400 km das

amostras presentes em seu subgrupo provenientes da região do Município de Ribeirão Preto/SP; (ii) 2396_11_SP e 2409_09_SP dos municípios de Santa Isabel/SP e Votorantim/SP, distantes 200 km dos municípios da região de Campinas/SP; (iii) IP1370_14_MG do Município de Belo Horizonte/MG, que ficou distante geneticamente das demais amostras, provavelmente pela distância geográfica em relação aos demais municípios que compõem o grupo ao qual pertence, com predomínio de cidades do Estado de São Paulo; (iv) 144_15_RN do Município de Acari/RN, que está distante 400 km dos demais municípios de seu grupo; (v) 1942_16_RN e IP146_15_RN dos municípios de Natal/RN e São José do Mipibu/RN, respectivamente, que ficam no litoral do Nordeste, estando distantes até 1.000 km das demais amostras do Nordeste; (vi) 6302_13_CE do Município de Bela Cruz/CE, distando 600 km do município mais próximo apontado no estudo, Caicó/RN e (vii) 3202_08_SP do Município de Valinhos/SP e 3458_10_RN originário do Município de Caicó/RN, que ficaram separados nos sub-clusters verde e laranja, respectivamente, demonstrando ter uma distância genética em relação às demais amostras analisadas.

Quando estudada a altitude dos municípios de origem das amostras, observou-se que as mesmas concentram-se em regiões de média altitude (300 e 600m) com 54% dos isolados. Em seguida estão as amostras oriundas de locais de baixas altitudes (0m a 300m) especialmente nos agrupamentos da região Nordeste, seguido das altas altitudes (maiores que 700m), caracterizada pelos municípios de Uberlândia/MG, Belo Horizonte/MG e São Paulo/SP.

No sub-cluster rosa presente na árvore do tempo (Figura 7) observou-se o predomínio de amostras em localidades com altitudes semelhantes, enquanto que nos demais sub-clusters existem situações de semelhança genética entre regiões de alta e baixa altitude. Um exemplo está no grupo amarelo (Figura 7) representado por amostras da região Nordeste. O mesmo também foi observado na proximidade genética entre as amostras 1294_16_CE, 961_16_CE, 1300_16_CE, 962_16_CE localizadas no interior do Estado do Ceará, contemplando a zona de planalto, com altitudes de 200m a 500m e a amostra 2237_16_CE que está na região litorânea do estado, a 70m de altitude em relação ao nível do mar. Por outro lado, as três amostras do Estado da Bahia, provenientes do Município de Salvador, embora

estejam contempladas no sub-cluster amarelo, formaram um agrupamento com alta proximidade genética entre si (Figura 7).

No Estado de São Paulo as amostras 1077_12_SP, 2354_16_SP e 2617_13_SP dos municípios de Ribeirão Preto, Pindamonhangaba e Sertãozinho, respectivamente, apresentaram relação genética com a amostra 991_16_MG de Uberlândia/MG. A distância entre as localidades é superior a 200 km, além da diferença de altitude, sendo que Minas Gerais possui um relevo mais montanhoso em relação à essa região apresentada do Estado de São Paulo. Outro exemplo de relação entre amostra isolada de um município de alta altitude com outra de um local de média altitude ocorreu entre os exemplares 7606_11_SP de São Paulo/SP e 9923_08_SP de Piracicaba/SP.

Dessa forma, a filogeografia mostrou uma variabilidade em seus resultados, relacionada principalmente às questões de relevo dos locais de origem das amostras do estudo.

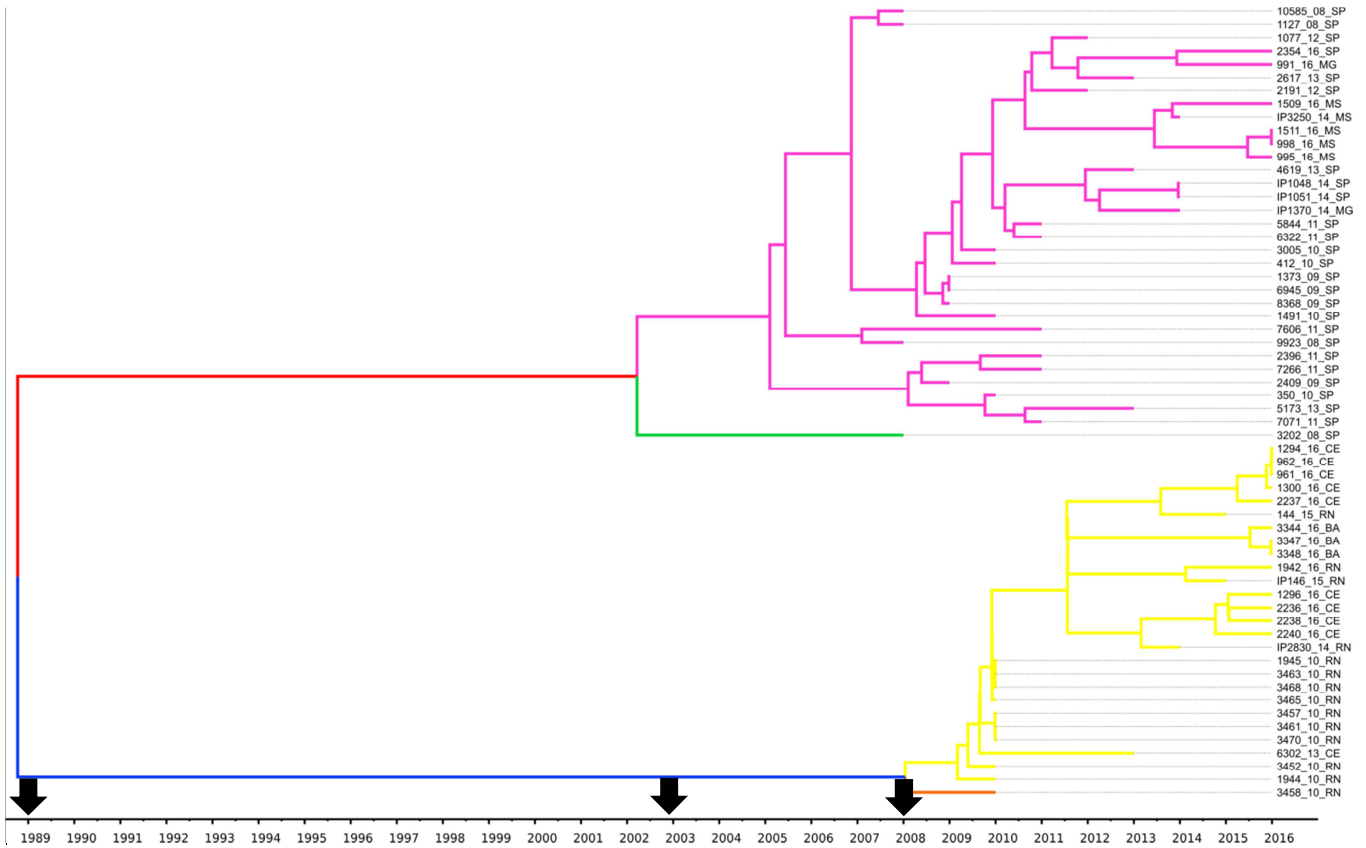


Figura 7. Árvore filogenética do tempo de seqüências parciais do gene da proteína N do RABV de morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp. de estados das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, nos anos de 2008 a 2016. (Rosa – estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul; Verde – Estado de São Paulo; Amarelo – estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia e Verde – Estado do Rio Grande do Norte). Destaque para os anos de formação dos clusters e sub-clusters.



Figura 8. Dispersão das amostras de vírus da raiva oriundas de morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp., no período de 2008 a 2016, em municípios das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, segundo a análise filogeográfica e visualização obtida pelo software Google Earth.



Figura 9. Dispersão das amostras de vírus da raiva oriundas de morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp., no período de 2008 a 2016, demonstrando nítida divisão entre os grupos de amostras provenientes de municípios das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e daquelas originárias da região Nordeste do Brasil. Mapa obtido pelo software GIMP 2 2.8.22.

6. DISCUSSÃO

No Brasil, quatro variantes espécie-específicas de vírus da raiva isolado de morcegos foram identificadas, sendo estas referentes às espécies insetívoras *Eptesicus furinalis*, *Molossus* spp. e *Nyctinomops laticaudatus*, e hematófaga *Desmodus rotundus* (KOBAYASHI et al., 2005). No entanto, a variante inicialmente relatada como específica de morcegos *Nyctinomops* spp., foi posteriormente identificada também em isolados de *N. laticaudatus*, *Tadarida laticaudata* e *Molossus molossus* de diferentes regiões do Brasil (KOBAYASHI et al., 2007). Isso também foi observado na análise filogenética do presente estudo, no clado morcegos insetívoros 1. Ainda, os clados morcegos insetívoros 3 e 6 mostraram a existência das variantes circulantes em quirópteros do gênero *Molossus* spp. e *E. furinalis*, respectivamente.

Nos resultados das análises filogenética e filogeográfica observou-se que as amostras tendem a se agrupar de acordo com a proximidade geográfica, formando subgrupos de isolados com relação genética entre si. Isso pode ser explicado pelas características dos quirópteros que compõem a Família Molossidae, entre eles os gêneros *Nyctinomops*, *Tadarida* e *Molossus*. São animais estritamente insetívoros que possuem asas estreitas e longas, realizando voos rápidos e também costumam dividir o mesmo abrigo nas áreas urbanas (REIS et al., 2007).

Os morcegos do gênero *Nyctinomops*, em particular a espécie *N. laticaudatus*, que apresenta maior número de exemplares nesta pesquisa, são estritamente insetívoros e basicamente urbanos, abrigam-se em telhados de edificações e residências, em fendas naturais formadas em rochas ou em juntas de dilatação presentes em construções humanas como viadutos, prédios e estádios de futebol. Estão presentes em todo o território nacional, sendo coloniais, formando grupos de médio a grande porte, podendo chegar a mais de 1000 exemplares reunidos e, devido as suas características morfológicas já citadas, como presença de asas estreitas e longas, realizam voos rápidos, caracterizando uma espécie de quiróptero que não é migratória (UIEDA; BRED, 2016). Esta descrição permite entender porque a espécie é recebida em abundância pelos serviços de vigilância municipais e porque há uma tendência de determinada linhagem do vírus permanecer e ser

propagada em uma mesma região, conforme demonstram os dados encontrados nas análises deste estudo (REIS et al., 2011; UIEDA, 2012; UIEDA; BRED, 2016).

Por outro lado, também houve amostras de vírus da raiva que demonstraram relação genética com isolados de regiões distantes mais de 200 km, incluindo amostras de outros países. Pode-se dizer que esses achados são um indicativo de fluxo de variantes virais entre regiões diferentes, distantes geograficamente. Analisando as características apresentadas pelos morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp., discute-se a transmissão do vírus da raiva entre espécies de morcegos por um hospedeiro não identificado, provavelmente uma espécie de quiróptero migratória que carregou o vírus para outras regiões do Brasil ou para outros países (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995; KOBAYASHI et al., 2007).

Na análise filogenética do presente estudo, amostras isoladas de *Nyctinomops* mostraram relação genética com o grupo da variante *D. rotundus* que é composto por exemplares oriundos do morcego hematófago, de morcegos da espécie frugívora *Artibeus* spp., e de herbívoros. Os vírus da raiva encontrados em morcegos *D. rotundus* e *Artibeus* spp., são filogeneticamente semelhantes (SHOJI et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2005; VIEIRA et al., 2010) e estudos mostram que a distribuição dessa variante costuma ser delimitada por áreas montanhosas (KOBAYASHI et al., 2005). O *D. rotundus* é um espécie não migratória que possui o hábito de voltar ao mesmo animal para se alimentar, mantendo-se conectado a uma determinada região. Vive em formações rochosas, que funcionam como abrigos naturais, podendo eventualmente utilizar abrigos artificiais como galerias fluviais sob as rodovias. A variante 3 circulante nessa espécie de quiróptero está amplamente distribuída no território nacional e é comumente associada ao ciclo rural da raiva (VIEIRA et al., 2010; REIS et al, 2011).

Ainda, a área de origem das amostras de morcegos insetívoros que apresentaram relação genética com a variante 3 do *D. rotundus*, abrangida pelos municípios São Roque/SP, Mogi das Cruzes/SP e Itapeverica da Serra/SP, concentra-se em uma região de relevo muito ondulado do tipo planalto ou serra (IBGE, 2017), que propicia abrigos ideais para muitas espécies de quirópteros, entre elas, o *D. rotundus*. Sabe-se que em um mesmo local pode haver a convivência de colônias de morcegos hematófagos e não hematófagos. Pesquisadores relataram

que as espécies *D. rotundus*, *Nyctinomops* spp., *Artibeus lituratus*, *Eumops* spp. e *Tadarida brasiliensis* podem coabitar um mesmo abrigo (YEE, 2000; REIS et al., 2011; AZUAGA, 2015). Assim, é possível explicar porque três amostras oriundas de *Nyctinomops*, no presente estudo, mostraram-se próximas ao clado da variante 3 (*D. rotundus*) na análise filogenética.

Da mesma forma como explanado anteriormente, a amostra IP3331_14_PR de morcego *Nyctinomops* sp. com origem no Município de São José dos Pinhais/PR, mostrou ter relação com uma amostra de raposa originária da Colômbia e outra amostra de morcego *Myotis chiloensis* do Chile. A convivência entre colônias de quirópteros em um mesmo ambiente possibilita a transmissão do vírus entre diferentes espécies de morcegos hematófagos e não hematófagos e, provavelmente, um hospedeiro ainda incerto pode ter sido o responsável por carrear o vírus da raiva para regiões mais distantes, facilitando a propagação da doença (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995; KOBAYASHI et al., 2007; VIEIRA, 2012).

Segundo Kobayashi et al. (2005), existe uma variante do vírus associada aos morcegos *E. furinalis*. Ademais, relatos mostram que as espécies do gênero *Nyctinomops* podem estar presentes no mesmo abrigo que o *Myotis nigricans* e o *E. furinalis*, o que facilita a transmissão do vírus da raiva, visto que esses quirópteros, assim como os *Nyctinomops*, também gostam de formar suas colônias em edificações, fendas ou outras construções nas áreas urbanas (YEE, 2000; REIS et al., 2011). Essa informação explica a existência do clado morcegos insetívoros 5 na análise filogenética, com amostras geneticamente próximas a isolados de *M. nigricans* e também ao grupo morcegos insetívoros 6, com predomínio de amostras de RABV de quirópteros *E. furinalis*.

Já a amostra 3756_16_CE, de morcego *N. laticaudatus* do Município de Tabuleiro do Norte/CE, mostrou relação genética com amostras provenientes de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e raposa do campo (*Lycalopex vetulus*). No Brasil existe uma linhagem do vírus da raiva relacionada ao cachorro-do-mato (*C. thous*), caracterizada e restrita a região Nordeste do país, que está sendo transmitida aos humanos e a outras espécies de animais domésticos e silvestres (FAVORETTO et al., 2006; CARNIELI JR et al., 2008). De acordo com Favoretto et al. (2006), trata-se de um *spillover* (o vírus da raiva altera os seus mecanismos e se

adapta a diferentes hospedeiros) da variante 2 própria de cães domésticos (FAVORETTO et al., 2016). Já foi relatada a ocorrência de variante 3 do *D. rotundus* em uma amostra originária de um cachorro-do-mato (CISTERNA et al., 2005; FAVORETTO et al., 2016). Outro trabalho mostrou esses canídeos infectados com vírus da raiva da variante 2 de cães domésticos, assim como cães domésticos com vírus com a variante do *C. thous* (CARNIELI JR et al., 2013).

A transmissão entre canídeos silvestres e cães domésticos é comum no Nordeste brasileiro, com possibilidade para gerar novas variantes, o que pode comprometer o controle da raiva e aumentar os riscos para a saúde pública (FAVORETTO et al., 2016). Vale ressaltar, porém, que não existe relato, na literatura, de morcegos insetívoros albergando o vírus da variante *C. thous*, como encontrado neste trabalho, indicando ser este o primeiro caso observado.

A possibilidade de transmissão inter-espécies dessa variante e das demais torna-se preocupante, especialmente ao pensar na importância do papel que os quirópteros desempenham na epidemiologia da raiva no Brasil. Também, reforça-se a complexidade existente na epidemiologia e transmissão da raiva, o que leva à necessidade de uma constante vigilância da enfermidade nas espécies estudadas e em outras espécies silvestres, monitorando essas novas relações que vem acontecendo nos ciclos epidemiológicos já conhecidos da doença. Essas são medidas essenciais para o controle e a prevenção da raiva no Brasil e em outros países da América Latina (CARNIELI JR et al., 2013; FAVORETTO et al., 2016)

Estudos filogeográficos realizados no Brasil, um com morcegos hematófagos *D. rotundus* e herbívoros oriundos do Estado do Espírito Santo, e outro com cães positivos dos estados de Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Maranhão, Piauí, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, encontraram ancestrais comuns datados de 1954 e 1974, respectivamente (CARNIELI JR et al., 2011; VIEIRA et al., 2012). Na análise filogeográfica do presente estudo, foi estabelecido que o MRCA data do ano de 1989, portanto 27 anos atrás. Este resultado reforça a importância dos morcegos insetívoros no contexto da epidemiologia da raiva.

Os estudos de Kobayashi et al. dos anos de 2006 e 2008, realizados com amostras de vírus da raiva do morcego hematófago *D. rotundus* e de herbívoros do Brasil, revelaram que as amostras de vírus da raiva de regiões com a mesma

altitude tendem a ser geneticamente próximas; porém, também observaram que as amostras podem se movimentar das regiões de maiores altitudes para aquelas com menores altitudes. Os mesmos resultados puderam ser observados em amostras de morcegos não hematófagos *E. furinalis* na América do Norte (KOBAYASHI et al., 2008).

No presente estudo, observou-se haver proximidade genética entre amostras de regiões de alta altitude para locais de baixa altitude em todos os sub-clusters da árvore do tempo da filogeografia, havendo também predomínio de grupos com isolados provenientes de áreas com altitudes similares, como foi visto no sub-cluster rosa. Outro exemplo está nas amostras da região Nordeste, em que se observa um fluxo viral de regiões do interior para o litoral, com características de relevo diferentes.

Conforme mencionado anteriormente para a análise filogenética, nas áreas urbanas observa-se a coabitação entre morcegos hematófagos e não hematófagos, o que pode facilitar a disseminação do vírus rábico entre essas espécies. Esse fato pode explicar porque, na filogeografia, amostras com relação genética são originárias de regiões distantes mais de 200 km, sendo que o morcego *Nyctinomops* tem como característica não ser migratório e realiza voos curtos, levando a sugerir que houve um carreamento do vírus por outras espécies de quirópteros, que ocasionalmente podem ter se deslocado (KOBAYASHI et al., 2007; ALBAS et al., 2011; UIEDA, 2012)

Outros trabalhos também demonstraram haver essa transmissão de variantes do vírus da raiva entre quirópteros, favorecendo o carreamento do vírus para diferentes regiões do Brasil. Favoretto et al. (2002), ao realizarem a tipificação antigênica de amostras brasileiras de vírus da raiva isolado de animais e humanos, no período de 1989 a 2000, detectaram uma maior variabilidade entre as amostras provenientes de morcegos insetívoros, sendo que a variante mais comum circulante entre essas espécies foi a variante 3 (*D. rotundus*). Também Albas et al. (2011) encontraram várias amostras de vírus da raiva relacionadas a morcegos insetívoros do Brasil, principalmente, morcegos dos gêneros *Eptesicus* e *Myotis*.

Um estudo filogeográfico do vírus rábico realizado na África sugeriu que as atividades humanas, como as construções, exercem forte impacto na dispersão da

raiva (AMOURI et al., 2011). No Brasil, essa situação parece se repetir. Nos centros urbanos, os morcegos não hematófagos encontram condições favoráveis para sua sobrevivência, com oferta de abrigos e alimentos. As luzes artificiais atraem insetos, e funcionam como uma fonte de alimento em abundância para as espécies insetívoras, como a estudada. Em Campo Grande/MS relatou-se o aumento do número de morcegos não hematófagos nas áreas urbanas, o que tem levado a pensar em esforços adicionais para o desenvolvimento de novas técnicas e estratégias de controle da raiva (DEUS; BECER; NAVARRO, 2003).

Ainda, na filogeografia, com relação à distribuição das amostras de vírus da raiva de morcegos *Nyctinomops* spp., não se observou no presente estudo um padrão, homogeneidade ou presença de surtos entre os morcegos nos municípios abrangidos. Diferente dos resultados encontrados nos estudos de Carnieli Jr et al. (2011) e Vieira et al. (2012), que analisaram amostras de morcegos hematófagos *D. rotundus*, herbívoros e de cães, e mostraram haver uma relação entre a presença de morcegos hematófagos positivos e surtos em herbívoros, mantendo o vírus em uma determinada região, ou associação de surtos em caninos, acompanhando ações migratórias humanas.

Outro fator importante a ser levantado é que, no Brasil, espécies de morcegos não hematófagos não passam por processo de controle populacional como se faz com o morcego hematófago *D. rotundus*. Geralmente, essas espécies chegam aos serviços de vigilância em saúde municipal por meio de ações passivas, em que há a denúncia da presença de exemplares em residências ou locais públicos com sinais suspeitos de raiva. Esses animais são capturados e levados para diagnóstico. Dessa forma, não se tem informações precisas sobre surtos em colônias ou como se estabelece a circulação do vírus entre essas espécies. Sabe-se que os casos positivos não apresentam nos estudos predileção por estação do ano, tipo de colônia ou localização particular no município (SÃO PAULO, 2000; DEUS; BECER; NAVARRO, 2003).

Outro ponto importante é a escolha pela nucleoproteína do vírus da raiva para o estudo. Trata-se de uma região altamente conservada do RABV. Segundo Smith et al. (2002) e Carnieli Jr et al. (2011), a análise de sequências do gene N permite a formação de agrupamentos específicos identificados para cada variante do vírus da

raiva em comparação com outros genes e, portanto, o seu uso representa uma abordagem adequada para o estudo da epidemiologia molecular da raiva.

Atualmente vem ocorrendo uma diminuição dos casos de raiva humana transmitida por animais domésticos e, em contrapartida, um aumento da raiva mantida e transmitida por animais silvestres. Essa situação pode ser reflexo das atividades de controle da raiva nas áreas urbanas e rurais, como por exemplo, as campanhas de vacinação de cães e gatos contra a raiva (WADA et al., 2011).

Ainda, quando se estuda o vírus da raiva em morcegos, a correta identificação das espécies de quirópteros é fundamental, pois cada uma apresenta características biológicas peculiares, que são importantes na avaliação preliminar da situação encontrada. Separar morcegos em apenas dois grupos (hematófagos e não hematófagos) dificulta o estudo, prejudicando o conhecimento do papel dessas espécies na epidemiologia da raiva (GOMES; COSTA NETO; ALVAREZ, 2017).

A dinâmica sobre a epidemiologia do vírus da raiva em morcegos no Brasil ainda é pouco conhecida. O comportamento do vírus e as relações epidemiológicas apresentadas pelos quirópteros do gênero *Nyctinomops* são pouco esclarecidas quando comparadas a outros gêneros de morcegos, dificultando a compreensão do ciclo de transmissão da raiva entre eles. Também pouco se sabe sobre as relações estabelecidas entre morcegos hematófagos e não hematófagos (GREGORIN; CIRRANELLO, 2016). Dada a problemática, estudos filogenéticos e filogeográficos com o maior número possível de amostras fazem-se imprescindíveis para elucidar a classificação das variantes do vírus da raiva e, conseqüentemente, contribuir para o aprimoramento de medidas de controle e prevenção da doença.

7. CONCLUSÃO

O estudo filogenético mostrou haver cinco diferentes variantes do vírus da raiva circulando entre os morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp., sendo uma espécie-específica e as demais relacionadas a outras espécies de morcegos hematófagos e não hematófagos, e também a outros animais silvestres. Essas relações alertam para a possibilidade de transmissão rábica inter-espécies no território brasileiro, especialmente no ambiente urbano, havendo maior risco dessas variantes chegarem aos seres humanos e seus animais de estimação, podendo contribuir para o surgimento de novas variantes.

O estudo filogeográfico demonstrou a importância dos morcegos insetívoros como hospedeiros do vírus da raiva, apresentando um mais recente ancestral comum (MRCA) datando de 1989, sendo tão antigo quanto aqueles encontrados para cães (1974) e morcegos hematófagos (1954).

A filogeografia constituiu uma importante ferramenta para a compreensão da dispersão do vírus da raiva nas áreas do estudo. De um modo geral, a localização geográfica, bem como as características do relevo, influenciaram na distribuição dos casos, havendo predomínio por amostras de vírus próximas geneticamente em áreas com altitude semelhante.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1) Os estudos filogenéticos e filogeográficos colaboram com pesquisas para conhecer as variantes virais circulantes no Brasil, o que contribui também para averiguar e garantir que as vacinas antirrábicas utilizadas permanecem protetivas, especialmente nos tratamentos pré e pós-exposição em seres humanos, na vacinação de herbívoros, nas campanhas municipais de vacinação contra a raiva para cães e gatos que, devido aos seus hábitos, podem interagir com morcegos na área urbana, infectando-se com o vírus e representando, da mesma forma, um risco para os humanos e outros animais.

2) As análises filogenética e filogeográfica auxiliam a compreender a origem do vírus da raiva circulante no morcego *Nyctinomops* spp. e reforçam a importância dos morcegos insetívoros como hospedeiros e potenciais transmissores da raiva. Essas espécies vêm ganhando destaque nas áreas urbanas, na medida em que os casos de raiva causados pela variante 2 canina vem diminuindo e aqueles causados por variantes circulantes em quirópteros e outros animais silvestres, aumentando.

3) Com os dados obtidos no presente estudo é possível auxiliar nas medidas controle e prevenção da raiva em centros urbanos, reforçar as medidas educativas que mostrem para a população os riscos envolvidos na interação com quirópteros e outros mamíferos silvestres, e fornecer subsídios para os Serviços de Vigilância Epidemiológica dos diferentes municípios.

9. REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SYFRES, B. **Zoonoses and communicable disease common to man and animals**. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, v. 2, 2003. p. 425.
- ALBAS, A.; CAMPOS, A. C. A.; ARAUJO, D. B.; RODRIGUES, C. S.; SODRÉ, M. M.; DURIGON, E. L.; FAVORETTO, S. R. Molecular characterization of rabies virus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 678-683, 2011.
- ALLENDORF, S. D.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; HARARY, C. M. A.; ANTUNES, J. M. A. P.; PERES, M. G.; VICENTE, A. F.; SODRÉ, 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, fev. 2012.
- ALVES, L. M.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; RICHTZENHAIN, J.; ITO, F. H. Pathogenesis of rabies vírus by ERA and PV strain administered orally in hamsters (*M. auratus*). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 79-84, 2003.
- AMOURI, I. K.; KHARMACHI, H.; DJEBBI, A.; SAADI, M.; HOGGA, N.; ZAHOUR, L. B.; GHRAM, A. Molecular characterization of rabies virus isolated from dogs in Tunísia: evidence of two phylogenetic variants. **Virus Research**, v. 158, n. 1-2, p. 246-250, 2011.
- AVISE, J.C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York. 1994.
- AZUAGA, L. B. S. **Características histomorfométricas gonadal e epididimal de *Nyctinomops laticaudatus* (É. Geoffroy, 1805) em Campos Grande/MS**. 2015. 44f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.
- BABBONI, S. D.; MODOLO, J. R. Raiva: Origem, Importância e Aspectos Históricos. **Journal of Health Sciences**, Paraná, v. 13, n. esp., p. 349-356, 2011.
- BAER, G. M. History of the rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 1-22.
- BANERJEE, A. K. Transcription and replication of Rhabdoviruses. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 66-87, 1987.

BARROS, M. A. S.; LUZ, J. L.; ESBÉRARD, C. E. L. Situação atual da marcação de morcegos no Brasil e perspectivas para a criação de um programa nacional de anilhamento. **Chiroptera Neotropical**, v. 18, n. 1, p. 1074-1088, 2012.

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.

BIELEJEC F.; RAMBAUT A.; SUCHARD M.A.; LEMEY P. SPREAD: Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics. **Bioinformatics**, v. 27, n. 20, p. 2910-2912, 2011.

BORDIGNON, M. O.; REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; BATISTA, C. B. Sobre os morcegos brasileiros. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; BATISTA, C. B.; PEREIRA, A. D. **História natural dos morcegos brasileiros. Chave de identificação de espécies**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora. 1 ed., 2017. p. 18-20.

BOUCKAERT, R. R.; DRUMMOND, A. J. bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. Doi: <http://dx.doi.org/10.1101/020792>. 2015.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity of the *Lyssavirus Genus*. **Virology**, v. 194, n. 1, p. 70-81, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos. 2007. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/internet/index.asp>>. Acesso em 20 ago. 2017.

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 Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenadoria Geral de Doenças Transmissíveis. Coordenadoria de Vigilância das doenças transmitidas por vetores e Antropozoonoses. **Raiva Humana Brasil, 1986-2009**. 2009. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010. Casos de raiva humana por espécie agressora, Brasil, 1986-2010, Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/canideos_felinos/Dados_de_raiva_humana_1986_2010.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Raiva**. 2017a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica – Dados**. Raiva. 2017b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Revista Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**, v. 34, n. 83, p. 157-163, Jul/Dez 2012.

CAMPOS, A. C. D. A.; MELO, F. L.; ROMANO, C. M.; ARAUJO, D. B.; CUNHA, E. M. S.; SACRAMENTO, D. R. V.; ANDRADE ZANOTTO, P. M. DE; DURIGON, E. L.; FAVORETTO, S. R. One-step protocol for amplification of near full-length cDNA of the rabies virus genome. **Journal of virological methods**, v. 174, n. 1-2, p. 1–6, Jun. 2011.

CARINI, A. Sur une grande Épizootie de rage. **Annales de L'Institut Pasteur (Paris)**, v. 25, p. 843-846, 1911.

CARNEIRO, N. F. F.; CALDEIRA, A. P.; ANTUNES, L. A.; CARNEIRO, V. F.; CARNEIRO, G. F. Raiva em morcegos *Artibeus lituratus* em Montes Claros, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 449-451, jul-ago, 2009.

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, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 120, p. 113-120, 2006.

CARNIELI JR., P.; FAHL, W. O.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R. S. O.; MORATO, R. G.; SPÍNDOLA, R. O.; MACHADO, L. M.; ÚNGAR-DE-SÁ, J. E.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 131, p. 33-46, 2008.

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

CARNIELI JR, P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; CASTILHO, J. G. Phylogeography of rabies virus isolated from dogs in Brazil between 1985 and 2006. **Archives of Virology**, v. 156, p.1007-1012. Doi: 10.1007/s00705-011-0942-y. 2011.

CARNIELI JR., P.; BATISTA, H. B. C. R.; OLIVEIRA, R. N.; CASTILHO, J. G.; VIEIRA, L. F. P. Phylogeographic dispersion and diversification of rabies virus lineages associated with dogs and crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Brazil. **Archives of Virology**, v. 158, p. 2307-2313, 2013.

CASTRO, F. Desafios da filogeografia. **Agência FAPESP**. 2010. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/desafios_da_filogeografia/13014/>. Acesso em: 02 jun. 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Rabies. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/rabies/>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Human Rabies. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/rabies/location/usa/surveillance/human_rabies.html>. Acesso em: 7 nov. 2017.

CHILDS, J. E. Epidemiology. In: JACKSON, A.C.; WUNDER, W.H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p.114-162.

CISTERNA, D.; BONAVENTURA, R.; CAILLOU, S.; POZO, O.; ANDREAU, M.L.; et al. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. **Virus Research**, v. 109, p. 139–147, 2005.

DARRIBA D.; TABOADA G.L.; DOALLO R.; POSADA D. "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DE MATTOS, C. A.; FAVI, M.; YUNG, V.; PAVLETIC, C.; DE MATTOS, C. C. Bat rabies in urban centers in Chile. **Journal of wildlife diseases**, v. 36, p. 231-240, 2000.

DE MATTOS, C. A.; DE MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. et al. **Fields Virology**, 4. ed. Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1364-1408.

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

DEUS, G. T.; BECER, M.; NAVARRO, I.T. Diagnóstico da raiva em morcegos não hematófagos na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, centro oeste do Brasil: descrição de casos. **Semina Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 171-176, 2003.

DING, N.; XU, D.; SUN, Y.; HE, H.; HE, C. A permanent host shift of rabies virus from Chiroptera to Carnivora associated with recombination. **Scientific Reports Nature**, v. 7, n. 289, p. 1-9, mar. 2017.

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

ESCOBAR, L. E.; PETERSON, A.T.; FAVI, M.; YUNG, V.; PONS, D. J.; GONZALO, M. V. Ecology and Geography of Transmission of two bat-borne rabies lineages in Chile. **PLoS Neglected Diseases**, v. 7, n. 12, ed 2577, p.1-10, Dez 2013.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genoma Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

FABIAN, M. E.; GREGORIN, R. Família Molossidae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da UEL, Londrina, 2007. p. 149-165.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy: The eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, 2004. p. 1162.

FAVI, M.; DE MATTOS, C. A.; YUNG, V.; CHALA, E.; LOPEZ, L. R.; DE MATTOS, C. C. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n. 1, p. 79-81, 2002.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ARAÚJO, F. A. A.; DE 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.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; DE MORAIS, N. B.; CARRIERI, M. L.; ROLIM, B. N.; SILVA, L. M.; RUPPRECHT, C. E.; DURIGON, E. L.; DE MATTOS, C. A. Rabies virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceará State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n. 12, p. 1978-1981, 2006.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. A.; CAMPOS, A. C.; DE MATTOS, C. C.; ARAUJO, D. B.; ACHKAR, S.; CARNIELLI, P.; KOTAIT, I. Rabies virus related to vampire bats (*Desmodus rotundus*) isolated from a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Southeast Brazil. **JSM Tropical Medicine and Research**, v. 1, n. 1, p. 1007, 2016.

FERNANDES, C. G.; Raiva. In: RIET-CORREA, F; SCHILD, A. L.; NENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo: Varela, 2 ed. v.1, 2003. p. 149-162.

FERREIRA, A. J. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**, 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1976, p. 779.

FORTES, F. S.; WOUK, A. F. P. F.; BIONDO, A. W.; BARROS, C. C. Acidentes por mordeduras de cães e gatos no Município de Pinhais, Brasil de 2002 a 2005. **Archives of Medicine Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 16-24, 2007.

GOMES, M. C. B.; COSTA NETO, E. M.; ALVAREZ, M. R. V. Ethnzoology of bats (Mammalia, Chiroptera) in Feira de Santana Municipality, Bahia State, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 7, p. 147-156, 2017.

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

GREEN, P. PHRAD documentation. 1996. Disponível em: <<http://bozcmn.mbt.washington/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

GREGORIN, R.; TADDEI, V. A. Chave artificial para determinação de molossídeos brasileiros (Mammalia: Chiroptera). **Mastozoologia Neotropical**, v. 9, n. 1, p. 13-32, 2002.

GREGORIN, R.; CIRRANELLO, A. Phylogeny of Molossidae Gervais (Mammalia: Chiroptera) inferred by morphological data. **Cladistics**, v. 32, p. 2-35, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://downloads.ibge.gov.br/downloads_geociencias.htm>. 2017.

ICTV. International Committee Taxonomy of Viruses. 2017 Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 09 ago. 2017.

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

ITO, F. H. Raiva urbana: Aspectos Clínicos e Programa de Controle. In: XXXV Semana Capixaba do Médico Veterinário e III Encontro Regional de Saúde Pública em Medicina Veterinária, 2008, Guarapari. **Anais...** Guarapari, 11p., 2008.

ITO, F. H. **Revisão sobre a Raiva**. 2014. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20dos%20herbivoros/revis%C3%A3o%20sobre%20raiva.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2017.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, 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 viroses in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, 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.; SATO, G.; KATO, M.; ITOU, T.; CUNHA, E. M. S.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic diversity of bat rabies viroses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 152, p.1995-2004, 2007.

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.

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

LANGONI, H.; HOFFMANN, J. L.; MENOZZI, B. D.; SILVA, R. C. Morcegos não hematófagos na cadeia epidemiológica de transmissão da raiva. **Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 1, p. 43-46, 2007.

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.

- LYLES, D. S.; RUPRECHT, C. E. Rhabdoviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.) **Fields Virology**. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1364-1408.
- MARTINS, F. M.; DOMINGUES, M. V. Filogeografia. **Revista da Biologia**. v. esp. biogeografia, p.23-30, 2011.
- MARTINS, F. M.; DOMINGUES, M. V. Filogeografia. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Edit). **Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos**. São Paulo, Ed. Rocca, 2010.
- MIYAKI, C. Y. Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. **Megadiversidade**, v. 5, n. 1-2, p. 96-100, Dez 2009.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLOR, M. A. Rhabdovirus. In:_____ **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3 ed., 2000. p.405-408.
- NADIN-DAVIS, S. A. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 1-8, 1998.
- PAWAN, J. L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus*, Wagner, 1940). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 30, p. 101-130, 1936.
- PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; ORTÊNCIO FILHO, H. Ordem Chiroptera. In:_____ **Mamíferos do Brasil**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2 ed., 2010. p. 205.
- OIE. World Organisations for Animal Health. **Rabies**. 2017. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RABIES_FINAL.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2017.
- OLIVEIRA, R. N. **Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína**. 2009. 81f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- OLIVEIRA, R.N., SOUZA, S.P., LOBO, R.S.V., CASTILHO, J.G., MACEDO, C.I., CARNIELI, P.JR., FAHL, W.O., ACHKAR, S.M., SCHEFFER, K.C., KOTAIT, I., CARRIERI, M.L., BRANDÃO, P.E. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**, v. 405, p. 352-360, 2010.

ORCIARI, L. A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; SHADDOCK, J. H.; SANDERLIN, D. W.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v. 19, n. 31, p. 4511–8, 2001.

RADOT R. V. **La vie de Pasteur**. Buenos Aires: Juventud Argentina, 1942. p. 48.

RAMBAUT, A. FigTree: Tree Figure Drawing Tool version 1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2009. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree>>.

RAMBAUT A.; SUCHARD M. A.; XIE D.; DRUMMOND A. J. Tracer v1.6, 2014. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

REICHMANN, M. L. A. B. **Impacto de medidas de prevenção de agravos produzidos por animais da espécie canina, em carteiros da empresa de correios e telégrafos do Estado de São Paulo, no período de 2000 a 2004**. 2007. 133f. (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

REIS, N. R.; SHIBATTA, O. A.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Sobre os morcegos brasileiros. In: _____ **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da UEL, 2007. p. 17.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 2 ed., 2011.

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

ROLIM, R. L. P.; LOPES, F. M. R.; NAVARRO, I. T. Aspectos da vigilância epidemiológica da raiva no Município de Jacarezinho, Paraná, Brasil, 2003. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 271-280, 2006.

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

ROSEN G. A. **History of public health**. New York: MD Publications, 1958.

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

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Instituto Pasteur. **Vacinação contra a raiva de cães e gatos**. São Paulo: Instituto Pasteur, (Manuais, 3), 32 p.,1999.

SÃO PAULO (Estado). Instituto Pasteur. **Raiva e sua importância no contexto social**. 2000. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/manuais/manual_5/manual_07.htm>. Acesso em: 20 mar. 2017.

SÃO PAULO. Instituto Pasteur. **Raiva – Aspectos gerais e clínica** por Ivanete Kotait, Maria Luiza Carrieri e Neide Yumie Takaoka. Manuais, 8. 49p. 2009.

SCHEFFER K. C.; CARRIERI, M. L.; ALBAS, A.; SANTOS, H. C. P.; KOTAIT, I.; ITO, F. H. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.3, p. 389-395, 2007.

SCHNEIDER M. C., BURGOA C. S. Tratamiento contra la rabia humana: un poco de su historia. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 6, p. 454-463, 1994.

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.

SILVA, A. R. Isolamento de vírus rábico de morcego não-hematófago da espécie *Phyllostomus hastatus hastatus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 4, p. 115-120, 1961.

SILVA, M. V.; XAVIER, S. M.; MOREIRA, W. C.; SANTOS, B. C. P., ESBÉRANO, C. E. L. Vírus rábico em morcegos *Nyctinomops laticaudatus* na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: Isolamento, titulação e epidemiologia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, p. 479-481, 2007.

SOARES, R. M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S. M.; HEINEMANN, M. B.; CORTEZ, A.; ALVES, L. M.; MEYER, A. D.; ITO, F. H.; RICHTZENHAIN, L. J. A heminested polymerase chain reaction for the detection of brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p.109-111, jan 2002.

SMITH, J.S.; REID-SANDEN, F.L., ROUMILLAT, L.F.; TRIMARCHI, C.; CLARK, K.; BAER, G.M.; WINKLER, W.G. Demonstration of Antigenic Variation among Rabies Virus Isolates by Using Monoclonal Antibodies to Nucleocapsid Proteins. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 24, p. 573-580, 2002.

STEELE J. H. History of rabies. In: BAER G. M. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, 1975. p.1-29.

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

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. **Virology**, v. 165, p. 565-576, 1988.

UIEDA, W.; HARMANI, N. M. S.; SILVA, M. M. S. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 5, p. 393-397, 1995.

UIEDA, W. Biologia e diversidade de morcegos brasileiros. Zoologia de vertebrados. Instituto de Biociências, Unesp Câmpus de Botucatu, São Paulo, out 2012. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Zoologia/VirginiaSanchesUieda/24_teorias.pdf> Acesso em: 22 jun. 2017.

UIEDA, W.; BRED, A. Morcegos: agentes negligenciados da Sustentabilidade. **Sustentabilidade em debate**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 186-209, 2016.

VIEIRA, L. F. P. **Epidemiologia molecular do gene da glicoproteína entre isolados do vírus da raiva provenientes de morcegos e herbívoros domésticos do Estado do Espírito Santo no período de 2006 a 2010**. 2012. 116f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2012.

VIEIRA, L. F. P.; PEREIRA, S. R. F. G.; BRANDÃO, P. E.; OLIVEIRA, R. N.; CARNIELI JR., P.; GALANTE, A. C.; CHICARINO, C. N.; KOTAIT, I. Molecular characterization of rabies virus isolated from *Desmodus rotundus* captured in Rio de Janeiro State. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 343-349, 2010.

VIEIRA, L. F. P.; PEREIRA, S. R. F. G.; CARNIELI R, P.; TAVARES, L. C. B. Phylogeography of rabies virus isolated from herbivores and bats in the Espírito Santo State, Brazil. **Virus Gene**. Doi: 10.1007/s11262-012-0866-y. 2012.

ViralZone. Bioinformatics Resource Portal. 2017. Disponível em: <<http://viralzone.expasy.org/>>. Acesso em: 10 set. 2017.

WADA, M. Y.; ROCHA, S. M.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 4, n. 20, p. 509-518, out-dez 2011.

WHO. World Health Organization. **Fact Sheets of Rabies**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>>. Acesso em: 25 de set. 2017.

WILKINSON, L. History of Rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. New York: Academic Press, 2002. p. 1-22.

WUNNER, H. W. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 23-68.

YEE, D. A. *Peropteryx macrotis*. **Mammalian Species**, v. 643, p. 1-4. 2000.