



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Karine Bott Mantovan

**Distribuição geográfica de *Desmodus rotundus*, suas
implicações nos casos de raiva em bovinos e análise
filogenética dos isolados virais entre 2016-2018 na região
de Botucatu, São Paulo - SP**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Botucatu

2020

Karine Bott Mantovan

Distribuição geográfica de *Desmodus rotundus*, suas implicações nos casos de raiva em bovinos e análise filogenética dos isolados virais entre 2016-2018 na região de Botucatu, São Paulo - SP

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mantovan, Karine Bott.

Distribuição geográfica de *Desmodus rotundus*, suas implicações nos casos de raiva em bovinos e análise filogenética dos isolados virais entre 2016-2018 na região de Botucatu, São Paulo - SP / Karine Bott Mantovan. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Helio Langoni

Capes: 40101096

1. Bovino --Doenças. 2. Hidrofobia. 3. Saúde pública. 4. Análise cladística. 5. Filogenia.

Palavras-chave: Bovinos; *Desmodus rotundus*; Raiva; Saúde pública.

Karine Bott Mantovan

Distribuição geográfica de *Desmodus rotundus*, suas implicações nos casos de raiva em bovinos e análise filogenética dos isolados virais entre 2016-2018 na região de Botucatu, São Paulo - SP

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Comissão examinadora

Dr. Benedito Donizete Menozzi
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ –Unesp –Botucatu/SP

Dra. Anaiá da Paixão Sevá
Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas
Universidade Estadual de Santa Cruz

Botucatu, 18 de fevereiro de 2020.

Aos meus avós, todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus, que nesse tempo mesmo em falta com Ele, nunca me abandonou.

Agradeço a minha mãe Angela, que sempre foi minha melhor amiga e o motivo de todo esforço e dedicação para que ela se sinta imensamente orgulhosa de mim.

Agradeço ao meu pai José Domingos e minha irmã Camila, que aos trancos e barrancos, sempre estiveram ao meu lado e tornaram a pós-graduação possível.

Agradeço as minhas filhas caninas, Madonna e Zara que são meu coração fora do peito.

Agradeço aos meus avós, que são exemplos de vida e honestidade, aos meus tios, tias e primos que sempre estiveram presentes na minha vida.

Agradeço ao Professor Helio Langoni, que desde 2015 abriu as portas do laboratório e estamos nessa jornada juntos desde então e que fez esse sonho se tornar possível.

Agradeço a todos os colegas e amigos de pós-graduação, Sâmea, Felipe Guimarães, Felipe Fornazari, Bruna, Simony, Felipe Dalanezi e Anelise Salina, que me incentivaram, ensinaram e fizeram essa jornada mais agradável e sempre estavam dispostos a me ajudar.

Agradeço a todas residentes que estiveram comigo nesse trabalho, em especial à Ana Carolina Yamakawa e Gabrielle Miodutzki que me ajudaram em algumas etapas das análises moleculares e se tornaram mais que colegas de laboratório, se tornaram amigas.

Agradeço as minhas amigas de vida, minhas Tchucas, que estiveram comigo desde a graduação e mesmo ausente, nunca desistiram de mim e sempre me apoiaram em todos os momentos.

Agradeço a Mariana Guimarães Nilsson, minha companheira de laboratório, de academia, de casa e de vida. Muito obrigada por me apoiar e por me fazer acreditar em mim mesma.

Agradeço ao Benedito Donizete Menozzi, que mais do que parte da banca, fez e faz parte do meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada pelo apoio e por me ajudar a construir esse trabalho.

Agradeço a Lais Morais Paiz, que eu coloco nas maiores frias, que auxiliou muito para que esse trabalho fosse concluído e que se tornou muito importante na minha vida.

Agradeço ao Professor Paulo Eduardo Brandão, pela sua solicitude e por abrir as portas do laboratório para que esse trabalho pudesse ser concluído.

Agradeço aos técnicos do VPS-USP, pelo auxílio nas técnicas moleculares, pela troca de experiências e pela disponibilidade em ajudar sempre, em especial ao Washington, Sueli e Sheilla.

Agradeço aos meus amigos da academia 725, Bruninho, Virgílio, Nando e Rafa que se tornaram uma extensão da minha família aqui em Botucatu

Agradeço ao Médico Veterinário Guilherme Shin, da Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, por ceder os dados das colônias de morcegos mapeadas e por sempre estar disponível em ajudar.

Agradeço a Dra. Anaiá da Paixão Sevá, pela análise estatística e mapas maravilhosos, além da disponibilidade e atenção desde sempre.

Agradeço ao Professor Cassiano Victória pela ajuda com os dados de georreferenciamento e mapas.

Agradeço a Capes, pela bolsa concedida desde março de 2018 a fevereiro de 2020.

Agradeço aos professores e funcionários da FMVZ, pela possibilidade de realizar minhas análises.

RESUMO

MANTOVAN, K. B. **Distribuição geográfica de *Desmodus rotundus*, suas implicações nos casos de raiva em bovinos e análise filogenética dos isolados virais entre 2016-2018 na região de Botucatu, São Paulo – SP.** 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

No Brasil a infecção pelo vírus rábico é um sério problema de saúde pública e levou a óbito dez pessoas em 2018, todas transmitidas por morcego hematófago (*Desmodus rotundus*), também responsável pela morte de mais de 40.000 animais de interesse econômico, gerando prejuízo de 15 milhões de dólares anuais. Mudanças causadas pelo homem no ambiente são responsáveis pelo aumento do número dessa espécie de quiróptero, elevando o número de focos da doença em bovinos. Algumas regiões do país, como o estado de São Paulo, apresentam surtos anuais. De 2016 a 2018 foram enviadas 269 amostras de sistema nervoso central de bovinos ao Serviço de Diagnóstico de Zoonoses (SDZ) – UNESP/Botucatu para diagnóstico de Raiva pelas técnicas de imunofluorescência direta e isolamento viral em camundongos. Destas, 104 foram positivas e incluídas no estudo abrangendo 25 municípios da região Centro-Oeste do estado de São Paulo para georreferenciamento e análise estatística e destas, em 45 foram feitas RT-PCR e análise filogenética. O Ministério da Agricultura faz o registro e monitoramento das colônias de *D. rotundus* como parte da vigilância epidemiológica da Raiva. A análise espacial evidencia que há relação entre localização das propriedades, onde ocorre a doença, com as colônias cadastradas na região e que os surtos anuais estão relacionados principalmente com colônias de maternidade (42,63%) e de machos (44,88%). Os abrigos artificiais correspondem a 85,19% o que sugere a predileção da escolha de abrigos próximo a fonte alimentar. A introdução e a retirada desordenada de rebanhos em novas áreas antes controladas pode ser um indicativo de dispersão do vírus e a análise estatística indica que houve dispersão dos casos de raiva no período estudado. Na análise filogenética, houve a formação de 4 subclusters importantes, o que pode ser sugestivo de uma diversidade genética do vírus e uma possível regionalização viral. Além do risco direto com o *D. rotundus*, a exposição indireta ao vírus pelo contato com herbívoros suspeitos ocorreu em 84 pessoas, demonstrando o risco iminente à saúde pública. Medidas rigorosas de controle devem ser estabelecidas pelas autoridades competentes, e revisão da política atual de vacinação da raiva em herbívoros, que não é obrigatória, mesmo em áreas endêmicas, investir na vigilância epidemiológica da raiva em herbívoros e em atividades de educação sanitária.

Palavras-chave: Raiva, bovinos, saúde pública

ABSTRACT

MANTOVAN, K. B. **Geographic distribution of *Desmodus rotundus*, your implications in cases of rabies in cattle and phylogenetic analysis of viral isolates between 2016-2018 in the Botucatu region, São Paulo - SP.** 2020. 96 f. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, 2020.

In Brazil, infection by the rabies virus is a serious public health problem and caused the death of ten people in 2018, all transmitted by hematophagous bats (*Desmodus rotundus*), also responsible for the death of more than 40,000 livestock, and economic losses were estimated at 15 million dollars annually. Anthropogenic changes in the environment are responsible for the increase in the number of this species of chiroptera, increasing the number of disease outbreaks because of livestock intensification, and other human activities have reduced the abundance of its wild prey but have also provided new and abundant shelter and foraging. Some regions of the country, such as the state of São Paulo, have had recent outbreaks. From 2016 to 2018 were sent to the Zoonosis Diagnosis Service (SDZ) - UNESP / Botucatu, 269 samples from central nervous system of bovines for the diagnosis of rabies by direct fluorescent antibody and mouse inoculation test. Of these, 104 were positive and were included in the study, reaching 25 municipalities in the Midwest region of the state of São Paulo for georeferencing and statistical analysis, and of these, 45 samples of isolates of bovine rabies were performed RT-PCR and phylogenetic analysis. The Ministry of Agriculture records and monitors *D. rotundus* roosts as part of the rabies epidemiology. A spatial analysis shows that there is a relationship between location, where disease occurs, with roosts registered in the region and that outbreaks are mainly related to harems (42.63%) and males (44.88%). The artificial roosts correspond to 85.19%, which suggests a predilection for the choice of roosts close to the food source and foraging resources. The introduction and disorderly removal of cattle in new areas previously controlled may be indicative of virus dispersion and the statistical analysis indicates that there was a dispersion of cases of rabies in the studied period. In the phylogenetic analysis, 4 important subclusters were formed, which may be suggestive of a genetic diversity of the virus and a possible viral regionalization. In addition to the direct risk with *D. rotundus*, indirect exposure to the virus through direct contact with suspected cattle occurred in 84 people, demonstrating the imminent risk to public health. Strict control measures must be applied by the competent authorities, and a review of the current policy of vaccination against rabies in herbivores, which is not compulsory, even in endemic areas, and invest in the epidemiology of rabies in herbivores and in health education activities.

Key word: rabies, cattle, public health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. O vírus da raiva e suas proteínas estruturais.....	17
Figura 2. Classificação dos genótipos/espécies de <i>Lyssavirus</i>	18
Figura 3. Taxa de mortalidade de raiva humana por tipo de animal agressor (1986 – 2018).....	29
Figura 4. Distribuição temporal dos casos de raiva em bovinos no Brasil entre 1999 a 2019. BRASIL, MAPA, 2020.....	33
Figura 5. Municípios em que ocorreram casos de raiva positivas em bovinos no período de 2016 a 2018, enviados para o Serviço de Diagnóstico de Zoonoses, UNESP, Botucatu, 2019.....	41
Figura 6. Fluxograma das amostras recebidas entre 2016 a 2018 e sua utilização no estudo.....	42
Figura 7. Distribuição temporal dos casos de raiva positivos nos anos 2016-2018 divididas em trimestres (t).....	51
Figura 8. Densidade dos casos de raiva em bovinos nos municípios correspondentes a 9 EDAS do Estado de São Paulo-SP enviados ao SDZ, UNESP, Botucatu 2016-2018 divididas em trimestres (t).....	54
Figura 9. Distância de dispersão dos casos de raiva por períodos trimestrais.....	56
Figura 10. Relação dos tipos de abrigos encontrados na região estudada com os casos de raiva em bovinos.....	57
Figura 11. Densidade dos casos de raiva em bovinos comparado com as colônias mapeadas no EDA de Botucatu, onde correspondeu o maior número de casos e as suas principais rodovias.....	58
Figura 12. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança contendo 45 sequências de vírus rábico isolados de bovinos estudados e 118 sequências do vírus rábico obtidas no Genbank (Tabela 4).....	63
Figura 13. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança contendo 45 sequências de vírus rábico isolados de bovinos estudados e 10 diferentes linhagens do vírus rábico.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição Temporal dos casos no Estado de São Paulo -SP	33
Tabela 2. Relação de amostras de SNC de bovinos positivos nas técnicas diagnósticas para raiva nos municípios de Botucatu e região, de acordo com a inserção no estudo. Botucatu, SP, 2019.....	92
Tabela 3. Amostras de SNC de bovinos positivos para raiva de acordo com os municípios e de acordo com a inclusão e utilização no estudo.....	43
Tabela 4. Sequências utilizadas na análise filogenética de isolados do vírus rábico de bovinos estudados.....	95
Tabela 5. Classificação dos abrigos de <i>Desmodus rotundus</i> em 9 Escritórios de Defesa Agropecuária (EDA) do estado de São Paulo, 2019.....	53
Tabela 6. Dados de rebanhos de bovinos dos municípios em que houve animais positivos para raiva no período de 2015 a 2018, de acordo com o IBGE. Botucatu, SP, 2019.....	62
Tabela 7. Sequências do gene N do vírus rábico isolado de 45 bovinos estudados, utilizadas na análise filogenética, de acordo com os resultados do alinhamento local (<i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool, BLASTn</i>) e com o local de origem do bovino infectado.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ciclos a serem utilizados nas PCRs para o gene N do RABV em amostras de SNC de bovinos.....46

Quadro 2. Primers utilizados nas provas de RT-PCR e sequenciamento de DNA para os genes N das amostras de RABV isoladas de bovinos.....46

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1 Raiva: definição e importância.....	15
1.2 O vírus da raiva (VRab).....	17
1.3 Raiva no mundo	20
1.3.1 Ásia	20
1.3.2 África	22
1.3.3 Europa	23
1.3.4 Américas.....	24
1.4 Raiva em Bovinos	32
1.5 Biologia do <i>Desmodus rotundus</i>	35
2. Justificativa	39
3. Objetivos.....	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4. Materiais e Métodos.....	40
4.1 Amostras de SNC.....	40
4.2 Reação de Imunofluorescência direta (RID).....	43
4.2.1 Diluição do conjugado.....	44
4.3 Isolamento viral em camundongos (Prova Biológica).....	44
4.4 Avaliação molecular	45
4.4.1 Extração de RNA.....	45
4.4.2 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para amplificação dos genes codificadores da nucleoproteína (N) viral	45
4.4.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) – Transcrição Reversa (RT)	45
4.4.4 Purificação dos produtos de PCR	47
4.4.5 Sequenciamento do gene N de vírus rábico isolado de bovinos	47
4.4.6 Análise das sequências obtidas.....	47
4.4.7 Análise filogenética	48
4.5 Georreferenciamento.....	49
4.6 Análise Estatística.....	50
5. Resultados.....	50
6. Discussão	65
7. Conclusão.....	76
8. Referências.....	77

9. Anexos.....	91
9.1 Anexo 1.....	91
9.2 Anexo 2.....	92
Tabela 2. Relação de amostras de SNC de bovinos positivos nas técnicas diagnósticas para raiva nos municípios de Botucatu e região, de acordo com a inserção no estudo. Botucatu, SP, 2019 ...	92
9.3 Anexo 3.....	95
Tabela 4. Sequências utilizadas na análise filogenética de isolados do vírus rábico de bovinos estudados.	95

1. Introdução

1.1 Raiva: definição e importância

A raiva é uma antroponose viral, que afeta o sistema nervoso central (SNC) com evolução aguda e fatal. Acomete principalmente às ordens *Carnivora* e *Chiroptera* (1), transmitida para humanos e animais pela inoculação do vírus contido na saliva, por meio de mordedura, arranhadura e lambidura (2).

Todos os mamíferos são suscetíveis à infecção, mas poucos são capazes de atuar como reservatórios da doença a longo prazo. De acordo com estudos filogenéticos, o vírus da raiva (VRab) pode ter evoluído na ordem *Chiroptera* e depois se adaptado para a ordem *Carnivora* (1,3).

Esta encefalite é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas (4) e grande problema de saúde pública, pois com exceção da Antártica, é endêmica em todos os continentes (5).

Estima-se que cerca de 59.000 mortes humanas por raiva ocorram anualmente em mais de 150 países, destes, 96% dos casos ocorrem na África (36,4%) e na Ásia (59,6%) (6). Menos de 0,05% das mortes estimadas ocorreram nas Américas, das quais mais de 70% no Haiti. A Índia, representa 35% de óbitos em todo o mundo, mais do que qualquer outro país. Porém a taxa estimada de mortalidade por habitante é mais alta nos países mais pobres da África Subsaariana, como a República Democrática do Congo e Etiópia (5).

A epidemiologia desta zoonose se difere nos países dependendo da região geográfica (7). Devido a subnotificações e estimativas incertas, é possível que esse número seja uma subestimação bruta do verdadeiro ônus da doença (8).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), define a raiva como uma doença 100% prevenível por vacina. Embora exista imunobiológicos como vacinas e imunoglobulinas, elas não estão prontamente disponíveis ou acessíveis a todos. Tratar uma exposição à raiva, que tem custo médio de 40 dólares na África e 49 dólares na Ásia, é de extrema dificuldade em populações que apresentam a renda média diária de 1 a 2 dólares por pessoa (9).

Todos os anos, mais de 15 milhões de pessoas em todo o mundo recebem profilaxia pós exposição (PPE) e estima-se que isso evite centenas de milhares de mortes por raiva anualmente (6)

A raiva afeta predominantemente populações pobres e vulneráveis que vivem principalmente em áreas rurais, que tem acesso limitado aos cuidados de saúde e quase 99% dos óbitos relacionados a doença no mundo são transmitidos por mordida de cão infectado com o vírus (8).

A doença representa uma carga social e econômica severa e duradoura e as implicações são especialmente aparentes nos países em desenvolvimento atingidos pela pobreza. A falta de recursos e uma infraestrutura de saúde pública limitada em muitos países endêmicos para raiva impede a coleta e análise de dados (3).

A OMS criou o plano estratégico global para erradicar as mortes humanas de raiva transmitida pelo cão até 2030 por meio de vacinação em massa, educação em saúde e melhorias na PPE. Alguns modelos estatísticos indicam que para que a vacinação seja eficiente, 70% da população canina deve ser vacinada. Hoje, estima-se que a cobertura geral de vacinação canina seja inferior a 20% em países endêmicos para a raiva canina fora das Américas (10).

Em todo o mundo, estima-se que cerca de 3,7 (1,6–10,4) milhões de DALYs (Disability Adjusted Life Years – Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade), ferramenta que calcula e estima o impacto das doenças globalmente, sejam perdidos devido à raiva., com mais de 96% na África (36,2%) e Ásia (59,9%) e menos de 0,5% (11.950 DALYs) nas Américas (5)

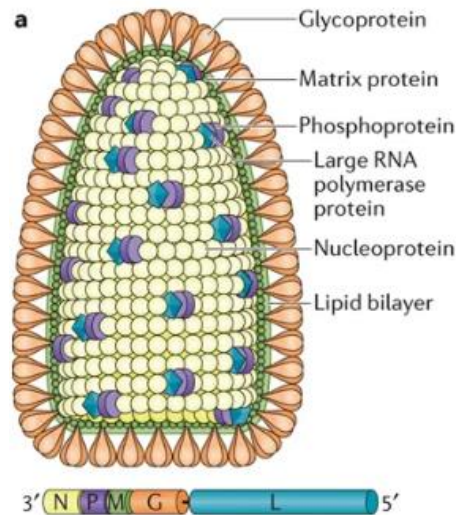
Os custos econômicos da raiva são de aproximadamente US \$ 8,6 bilhões por ano, dos quais 54% são para perdas de produtividade por mortes prematuras, 37% são para o tratamento de humanos agredidos por cães suspeitos e apenas 2% são investidos na vacinação e controle populacional de cães (6). As perdas por mortes de animais de interesse zootécnico atingiram 512 milhões de dólares por ano, principalmente em países com economias dependentes da pecuária (5).

Perdas relacionadas à bovinos na América Latina foram estimadas em aproximadamente 100 milhões de dólares anuais na década de 1960 e de 50 milhões de dólares na década de 1990, destes, 15 milhões de dólares somente no Brasil. Porém, devido às altas taxas de subnotificações, a estimativa do número de casos positivos pode ultrapassar e muito os números divulgados, repercutindo na saúde pública destes países (11).

1.2 O vírus da raiva (VRab)

A raiva é causada por vírus, da ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, do gênero *Lyssavirus*, com genótipos e variantes que apresentam diferenças quanto à patogenicidade, virulência e composição antigênica (12).

O VRab tem morfologia de projétil (bala de revólver), formado por RNA de fita simples, sentido negativo e estrutura composta por 11932 nucleotídeos que codificam cinco proteínas: a RNA polimerase (proteína *L*), uma glicoproteína de superfície (proteína *G*), uma nucleoproteína (proteína *N*), uma fosfoproteína (proteína *P*) e uma proteína matriz (proteína *M*) (13) como ilustrado por Fooks, et al.(14) na figura 1.



Fonte: Fooks et al, 2019

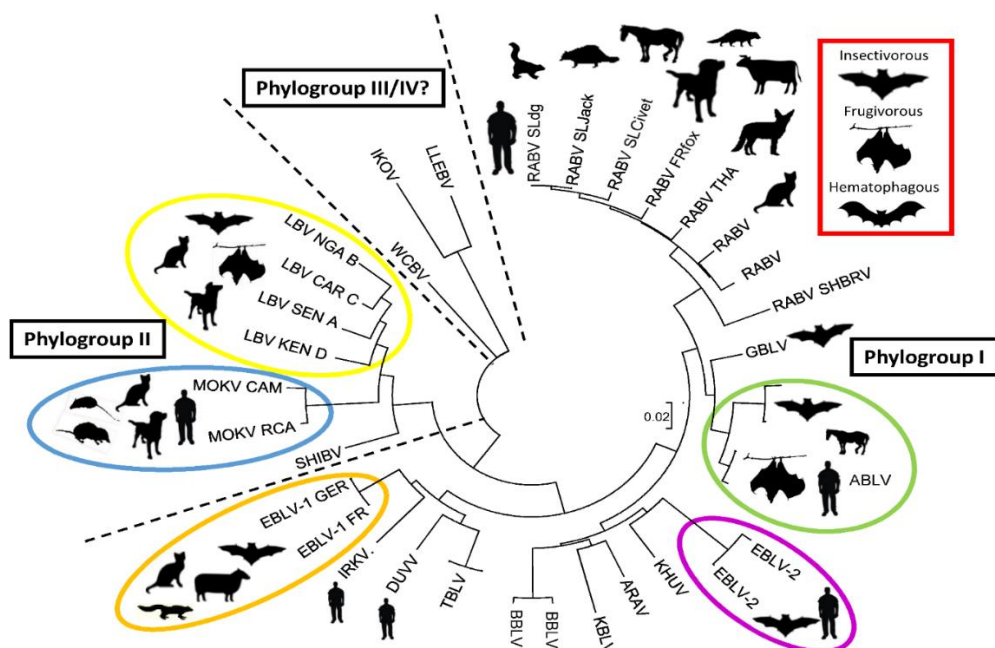
Figura 1: O vírus da raiva é codificado por 5 proteínas virais: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e proteína de RNA polimerase (L).

Possui um envoltório externo constituído por lipídios e pela glicoproteína viral (G), formando projeções, que são responsáveis por ligar e induzir produção de anticorpos neutralizantes, deste modo produzindo resposta imune mediada por células e facilitando a entrada do vírus na célula hospedeira, conferindo ação neurotrópica ao vírus (15).

A matriz (M) une o envoltório viral à ribonucleoproteína (RNP), que é formada pelo RNA viral e as proteínas *L*, *P* e *N*. O RNP somado a matriz *M* formam o nucleocapsídeo viral, onde a RNP também é responsável pelas atividades enzimáticas necessárias para transcrição e replicação do RNA (13).

A nucleoproteína (*N*), que é um dos maiores componentes do vírus e- a maior proteína interna do cilindro helicoidal, contendo 450 aminoácidos e com peso molecular de 57.000 dáltons, é fosforilada em um único sítio, exercendo a função de proteger o RNA genômico, isso faz com que o material genético seja conservado, por isso é o gene mais utilizado nas técnicas moleculares e é a mais importante no processo de capsidação (15).

Até o início da década de 1970, considerava-se o VRab como uma unidade antigênica. Sabe-se, entretanto que o gênero *Lyssavirus* atualmente, possui 16 espécies/genótipos e com base nas propriedades antigênicas e nas relações filogenéticas, foram subdivididos em dois filogrupos. O filogrupo I inclui *Rabies virus* (RABV), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Duvenhage virus* (DUVV), *European bat lyssavirus 1* (EBLV-1), *European bat lyssavirus 2* (EBLV-2), *Aravan virus* (ARAV), *Khujand virus* (KHUV), *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV), *Irkut virus* (IRKV) e *Gannoruwa bat lyssavirus* (GBLV). O filogrupo II incluem *Lagos bat virus* (LBV), *Mokola virus* (MOKV) e *Shimoni bat virus* (SHIBV). Os vírus mais divergentes no gênero, *West Caucasian bat Lyssavirus* (WCBV), *Ikoma virus* (IKOV) e *Lleida bat lyssavirus* (LLBV), não são membros de nenhum desses filogrupos(16), sendo o vírus da raiva clássico (RABV) o mais conhecido e estudado (10,17), como exemplificado por Shipley, et al., (18) na figura 2:



Fonte: Shipley et al., 2019

Figura 2: O gênero *Lyssavirus* atualmente, possui 16 espécies/genótipos baseados nas propriedades antigênicas e nas relações filogenéticas.

A Organização Mundial da Saúde e a Organização Mundial de Sanidade Animal consideram como raiva apenas a doença causada pelo genótipo do filogrupo I (RABV), classificando as demais como encefalites relacionadas e/ou como aparentadas aos vírus pertencentes às outras espécies (6).

As variantes (AgV) do VRab e o estudo de suas diferenças e reservatórios específicos só foi possível com o desenvolvimento da técnica de anticorpos monoclonais (AcM) para a nucleoproteína e glicoproteína. Desde 1996, no Brasil era realizado o teste de imunofluorescência indireta utilizando painel de 11 AcM para a nucleoproteína viral (N), produzido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta - USA, para o estudo de amostras isoladas nas Américas (19).

Com este painel foram identificadas variantes antigênicas, melhorando o conhecimento da epidemiologia da raiva, tornando-se possível determinar a distribuição geográfica e reservatórios específicos das diferentes variantes encontradas nas américas que foram: AgV2-cão, AgV3-morcego *D. rotundus*, AgV4-morcego *Tadarida brasiliensis* e AgV6-morcego *Lasiurus cinereus*. Porém a técnica de AcM apresenta limitações, como por exemplo, variantes não classificadas nos painéis de AcM (19).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, como sequenciamento genético, essas limitações foram melhoradas o que foi possível compreender e estabelecer relação entre as linhagens virais. No Brasil, estudos antigênicos mostraram que duas AgVs circulavam em morcegos insetívoros (AgV 4 e AgV 6) e que os reservatórios dessas variantes são morcegos das espécies *Tadarida brasiliensis* e gênero *Lasiurus*, respectivamente. No entanto, estudos utilizando esse painel de AcM também mostraram a existência de quatro outros padrões antigênicos não compatíveis com os padrões conhecidos, encontrados em isolados de morcegos insetívoros dos gêneros *Eptesicus*, *Nyctinomps*, *Myotis* e *Lasiurus* (20,21).

O VRab é classificado em variantes a partir de suas diferenças genéticas e antigênicas. Essas variantes ficam estáveis quando infectam hospedeiros de uma mesma espécie animal quando a transmissão do vírus ocorre entre hospedeiros de espécies diferentes, que não são consideradas como reservatórios naturais da enfermidade, o vírus pode sofrer mutações, o que é denominado de *spillover* (1,21).

1.3 Raiva no mundo

A raiva transmitida por cães foi eliminada da Europa Ocidental, Canadá, Estados Unidos da América, Japão e na maioria dos países da América Latina. A Austrália e muitas nações do Pacífico sempre estiveram livres. Esses países ainda podem relatar casos importados, e alto custo para se manter livres da doença, principalmente em ações de vigilância devido a raiva em animais silvestres e a profilaxia pré-exposição (PrEP), para pessoas que viajam para áreas endêmicas para raiva e para pós-exposição (PPE) (22).

Em uma pesquisa que englobou países em todos os continentes, Taylor, et al. (23), avaliam o sistema de vigilância da raiva globalmente e dos 91 países em que os dados foram coletados, a raiva humana era uma doença notificável em 83, apenas em oito deles a notificação não era compulsória. Apesar das orientações internacionais, os sistemas de vigilância de muitos países avaliados não são homogêneos, e mesmo onde a raiva é uma doença notificável, muitos países tiveram um sistema de vigilância considerado ineficaz, quase todos os países com alto e moderado risco de raiva na África e na Ásia. No geral, 41% da população avaliada nesta pesquisa, ou seja, cerca de 2,5 bilhões de pessoas, vive em países onde não há vigilância da raiva ou esta é ineficaz, o que torna mais difícil o controle da raiva e estimativas sobre a doença (23).

1.3.1 Ásia

A Ásia corresponde a maioria do número de casos de raiva no mundo. O principal transmissor é o cão doméstico. Dentre os países, a Índia e a China apresentam quase 27.000 casos de raiva/ano (5). Países como Japão, Cingapura, Taiwan, Hong Kong e Coréia do Sul eliminaram com sucesso a raiva canina, no entanto, o custo da doença na Ásia permanece extremamente elevado (24).

A China apresenta mais de 6000 mortes humanas por ano. De 2008 a 2016, a raiva foi a terceira causa mais comum de mortes na lista de 39 doenças infecciosas notificáveis. Até o final de 2017, a doença caiu uma posição e foi classificada como a quarta causa mais comum de mortes humanas. Mais de 99% dos casos de raiva

humana estão relacionados a cães, e mais de 90% dos casos são relatados em áreas rurais, onde a proporção de cães errantes e não vacinados é alta (25).

De 1960 a 2014 todas as províncias da China relataram casos de raiva humana com predominância nas regiões leste e sul. Antes de 1996, a raiva humana estava concentrada principalmente no sul, centro e nordeste da China, enquanto na região nordeste era relativamente baixo (26).

Mesmo sendo responsáveis por 80% do mercado mundial de vacinas contra raiva, no valor de 10 bilhões de CNY (cerca de US \$ 1,6 bilhões de dólares), ela tem somente 14,20% de cobertura vacinal (27).

Desde 2007, o governo reconheceu a emergência da raiva e realizou investimentos para conter o avanço da doença. A vacina antirrábica humana não está incluída no programa nacional de imunização na China; portanto, as pessoas que foram expostas devem pagar a PPE. No entanto, nas províncias consideradas de alto risco, como Guizhou, Guangxi e Guangdong, acrescentaram os custos de PPE, especialmente as taxas de vacina, no sistema de seguro social. Como resultado, a incidência diminuiu progressivamente desde o pico de 2007 (26).

A Índia responde por mais de 35% dos óbitos mundiais relacionados a raiva, com o custo de mais de 2 bilhões de dólares anuais e mais de 8 milhões de PPE (5). A maioria das mortes humanas por raiva na Índia ocorre em homens (> 70%), em pessoas de baixo status socioeconômico (> 80%) e moradores de áreas rurais (> 75%), embora mais de dois terços da população total da Índia viva em áreas rurais (24).

A escassez nacional de produtos biológicos da raiva para a PPE (vacina, imunoglobulina) tornam o tratamento, quase inacessível para pessoas de baixo status socioeconômico. Os programas de controle e vacinação de cães também têm recursos limitados e, com maior frequência, se concentram em áreas urbanas, uma vez que, a população canina errante é um dos principais problemas relacionados a campanhas de vacinação em massa (24).

Há relatos de surtos de raiva em bovinos na Índia, a grande maioria também relacionados aos cães. Um aumento sazonal nos casos relatados de raiva em cães em março e agosto de 2004 a 2014 no estado de Punjab, bem como uma associação temporal entre a incidência de casos relatados em cães e bovinos, foi anteriormente encontrado (24).

No Butão, sul do continente, mais de 80% da perda econômica pela raiva se deve a mortes de bovinos, num total de 1070 casos entre 1996 e 2016. O sistema de pecuária extensiva aumenta o risco de transmissão para bovinos, uma vez que o número de cães no país é exorbitante. A população canina estimada é de 120.000 animais, equivalente a um cão para cada 2,5 bovinos, dos quais 40% são cães errantes e 31% tem proprietários, porém vivem soltos (28).

Além dos casos em cães, há relatos de raiva silvestre, principalmente em primatas não-humanos, chacais (*Canis anthus*) e mangustos. Esses animais podem participar na transmissão da raiva para os bovinos e bubalinos (24).

1.3.2 África

No continente africano, estima-se que ocorram 21.476 mortes humanas por raiva anualmente, sendo a maioria dos casos (99%) relacionada ao cão doméstico. A doença está presente em todos os 54 países do continente e 49 destes, são considerados de risco moderado para alto à raiva humana (OMS).

A raiva em animais silvestres é importante no que diz respeito à circulação de duas linhagens de VRab em reservatórios canídeos e mangustos. A linhagem dos mangustos ocorre em ciclos de transmissão entre espécies da família *Herpestidae*, particularmente no mangusto amarelo (*Cynictis penicillata*) e no mangusto do rabo preto (*Galerella sanguinea*). A linhagem canídeo cosmopolita, por outro lado, circula entre os membros da família *Canidae*, em chacais das costas pretas (*Canis mesomelas*), raposas com orelhas de morcego (*Otocyon megalotis*), chacais listrados (*Canis adustus*), além do cão doméstico (5).

Embora as mordidas de animais e os casos de raiva animal e humana sejam atualmente notificáveis na maioria dos países africanos, uma vigilância insuficiente ou inexistente torna os dados epidemiológicos nacionais não confiáveis, devido à elevada taxa de subnotificação (29). Em um estudo realizado em 23 países na África, verificou-se que 16 dos sistemas de vigilância foram considerados ineficazes (23).

Dados oficiais sobre mortes por raiva humana submetidos à OMS na África são amplamente reconhecidos por subestimar muito a verdadeira incidência da doença. A razão para a subnotificação pode ser por fatores econômicos, sociais e religiosos. Os problemas de diagnóstico incorreto foram evidenciados em estudo de

encefalite infantil no Malawi, no qual 3/26 (11,5%) casos inicialmente diagnosticados como malária cerebral foram confirmados como raiva por meio de exames post-mortem (30).

As estimativas de casos de raiva humana, usando a incidência de lesões por mordida de cachorro e a disponibilidade de PPE, indicam que a incidência na África é cerca de 100 vezes maior do que o relatado oficialmente, com aproximadamente 24.000 mortes na África anualmente. Perdas econômicas adicionais estão relacionadas a perdas de bovinos derivadas de uma incidência de 5 mortes / 100.000 bovinos, estimada em US \$ 12,3 milhões anualmente na África e na Ásia (30).

Em média, existem mais de 1.400 casos de raiva animal a cada ano no norte da África. Cães são as principais espécies afetadas, seguidas pelos bovinos, com cerca de 85% dos casos registrados em áreas rurais (31). As taxas de incidência estimadas de todo o continente africano para raiva bovina foram de 5 a 20 mortes por 100.000 cabeças de gado, números calculados por Jibat, et al. (32), e os custos totais estimados para a PPE foram de 40 dólares por tratamento, representando respectivamente 5,8% da renda nacional bruta per capita anual. Campanhas de imunização em larga escala podem, portanto, se traduzir em vidas humanas e economia pela demanda reduzida por PPE (33).

1.3.3 Europa

A raiva inicialmente se espalhou amplamente na Europa como uma doença mediada por cães. Na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, uma epizootia começou principalmente na população de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) na Europa Oriental e se espalhou por toda a Europa em algumas décadas, com uma velocidade de aproximadamente 15 a 60 km por ano para chegar à França como o país mais ocidental com casos da doença em 1968 e à Itália em 1980 (34), a raiva em cães foi controlada devido a vacinação.

Na porção Oriental do continente, a raiva se estendeu a todos os países que posteriormente aderiram à União Europeia (UE). Países ao Norte, Suécia, Irlanda e Reino Unido, e ao Sul, como Portugal, Espanha, Malta e Chipre nunca relataram a infecção por VRab em raposas (35).

Para controlar a doença induzida pelo VRab, foram realizadas as primeiras tentativas para reduzir as populações de raposa vermelha, mas elas se mostraram ineficazes para interromper a transmissão do vírus. Na década de 1970, foi demonstrado experimentalmente que as raposas vermelhas podiam ser imunizadas por via oral contra a raiva usando vírus atenuado, introduzidos em iscas, oferecendo novas perspectivas de controle (36).

Mais de 10.000 casos de raposa vermelha foram registrados anualmente no início dos anos 80. O maior número de casos dessa espécie foi registrado em 1990, com 12.425 casos. Enquanto isso, 2 humanos, 525 cães, 749 gatos e 743 bovinos foram diagnosticados positivos para raiva, que denotou o risco substancial de que humanos e animais domésticos fossem afetados durante esta epidemia (35).

A imunização oral dos silvestres por meio das iscas começou a ser usada em larga escala, graças ao financiamento da UE desde 1989, se mostrou a mais eficiente forma de controle da infecção em animais silvestres, que tem como alvo basicamente raposas vermelhas e, em menor grau, guaxinins (*Nyctereutes procyonoides*), pois se tornaram a segunda espécie mais afetada no nordeste da Europa, principalmente nos países bálticos e na Polônia. Como o chacal dourado (*Canis aureus*) que é considerado um potencial hospedeiro, espécie esta, também incluída faz alguns anos como alvo de vacinação (35).

A Europa se destaca como controle da raiva canina e silvestre. As normas da UE para combater a raiva da vida selvagem em raposas e guaxinim usando a vacina oral foi uma enorme contribuição para o controle. No entanto, no leste da Europa, a eliminação completa da raiva contra a vida selvagem ainda está longe de se tornar realidade. Embora a constante conscientização e vigilância é necessária para garantir que as regiões livres da raiva não sejam prejudicadas pela reintrodução do vírus, a direção futura para controle da raiva na Europa reside na identificação prática de soluções para controlar a raiva na vida selvagem em uma variedade de hospedeiros, na Europa Oriental (37).

1.3.4 Américas

Nas últimas três décadas, houve diferenças marcantes nos esforços para controlar a raiva canina. Sucessos recentes foram demonstrados em muitas partes da

América Central e do Sul, onde a doença em cães foi controlada por meio de campanhas de vacinação em massa sincronizadas em larga escala. Como resultado, não só a raiva canina diminuiu, como também foram praticamente eliminados os casos de morte humana, sendo o cão como transmissor (30).

Nas Américas, a raiva ocorre em dois cenários distintos, um na América do Norte, que corresponde Estados Unidos da América (EUA), Canadá e Alasca, considerados livres da raiva transmitida por cães; e outro na América Latina (América Central/Caribe e América do Sul), com exceção do México (6). Embora o genótipo RABV seja encontrado mundialmente em vários hospedeiros terrestres, sua presença em morcegos é observada apenas nas Américas (38).

Desde 1983, os países da Região das Américas da OMS reduziram a incidência da doença em mais de 95% em humanos e 98% em cães. O êxito foi alcançado principalmente pela implementação de políticas públicas e programas eficazes que se concentram em campanhas de vacinação de cães, programas de controle de animais, vacinação de animais selvagens no caso dos EUA, administração oportuna de PPE e educação de profissionais de saúde e do público (39)

Nos Estados Unidos, a raiva canina foi controlada com sucesso no final da década de 1970, e os animais silvestres são responsáveis por mais de 90% de todos os animais diagnosticados positivos relatados nos Estados Unidos desde a década de 1980 (39).

Os principais reservatórios responsáveis pela manutenção do vírus no país são, os quirópteros, difundidos em 29 espécies de insetívoros de diferentes gêneros (*Myotis*, *Eptesicus*, *Tadarida*, *Lasiurus*, *Nycticeius*, *Lasiurus*, *Perimyotis*, *Antrozous*, *Pteropus*, *Parastrellus*, *Plecotus* e *Rosettus* e da família *Molossidae*) que já foram diagnosticadas positivas em 48 estados americanos (39), inclui-se também, as espécies de mamíferos terrestres como as raposas raposas (*Vulpes lagopus* e *Urocyon cinereoargenteus*), guaxinins (*Procyon lotor*), gambás (*Mephitis spp*) (40). Estas espécies são reservatórias para sete variantes antigênicas do VRab, regionalmente distribuídas e amplamente conhecidas (39).

Os morcegos foram as espécies silvestres mais relatadas (32,2%) de todos os casos de animais em 2017, seguidos por guaxinins (28,6%), gambás (21,1%) e raposas (7,0%) (39).

O número de bovinos positivos para raiva nos EUA em 2017 foi de 36 (3,4%). Isso representou uma redução de 48,6% no número de bovinos

diagnosticados positivos, em comparação com o número relatado em 2016 (n = 70). O Texas relatou o maior número de bovinos positivos (n = 8 [22,2%]), seguido por Oklahoma (5 [13,9%]), Dakota do Sul (4 [11,1%]) e Virgínia (4 [11,1%]) (39).

De 1960 a 2018, um total de 125 casos de raiva humana foram registrados nos Estados Unidos, com aproximadamente um quarto do total resultante de mordidas de cães durante viagens internacionais. Das infecções adquiridas nos Estados Unidos, 70% foram atribuídas a morcegos. No entanto, a cada ano, cerca de 60 a 70 cães e mais de 250 gatos são diagnosticados positivos para raiva, quase todos, animais não vacinados, e infectados por animais silvestres como morcegos, guaxinins e gambás (39).

O custo anual estimado para prevenção da raiva nos Estados Unidos é superior a US \$ 300 milhões, como a grande maioria dos recursos investidos na vacinação de cães (5).

A raiva em humanos pela exposição a carnívoros terrestres não é identificada há mais de 50 anos no Canadá (41), porém as espécies selvagens, incluindo raposas e gambás, continuam sendo os principais reservatórios da doença. No norte do Canadá, as raposas do ártico mantêm a linhagem do vírus denominada como AFX RABV, cuja transmissão para populações de raposa vermelha, permitiu sua disseminação no sul do país. Os morcegos insetívoros também participam da manutenção viral. Assim como nos EUA, a raiva em animais silvestres é controlada por meio de vacinação oral (42).

Nos países da América Latina e Caribe, a doença em cães e humanos diminuiu significativamente nas últimas três décadas pela interrupção da circulação viral entre cães, controlada pela imunizações em massa (29).

O êxito veio dos esforços nacionais e da cooperação dos países no Programa Regional para a Eliminação da raiva, além do compromisso dos Estados membros da OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde) em eliminar a raiva, planos discutidos pela primeira vez em 1983. Desde então, o ônus da raiva mediada por cães nesses países diminuiu 95%, com apenas seis países relatando casos humanos transmitidos por cães em 2015 e três em 2016 (29,43).

As áreas de maior risco para transmissão da raiva por cães são Haiti, Bolívia, Guatemala, República Dominicana, Honduras e algumas regiões do Brasil (estado do Maranhão) e Peru que, como característica em comum, está a pobreza (6,44).

Segundo a OPAS, Bolívia e Haiti têm as piores condições no controle da raiva urbana em comparação com todos os países da América Latina. No Haiti, a situação permanece estagnada devido a desastres ambientais que devastaram recentemente o país e, na Bolívia, pela falta de recursos financeiros, políticas precárias de vacinação canina, uma grande população de cães errantes, urbanização desorganizada e a subnotificação de casos caninos que é um problema persistente (45).

Em toda a América Latina, após os avanços no controle da raiva canina, a doença transmitida por morcegos ameaça à saúde humana e animal e o número de casos relatados tem aumentado nos últimos anos (46). A doença causada pelo *D. rotundus*, relatada desde 1900, revela a ocorrência de novos casos no Uruguai, que representa uma nova introdução do vírus em bovinos no país (47).

No México, a vigilância passiva confirmou uma estimativa de 90.000 a 100.000 mortes de bovinos relacionadas com a doença anualmente (aproximadamente 1% de mortalidade) (48). No Peru, a vigilância ativa corrigiu a subnotificação estimada de mais de 400 mortes para 100.000 bovinos em 2014 relacionadas ao morcego-hematófago (47).

Pesquisa realizada na Argentina para avaliar o padrão filodinâmico das variantes encontradas, incluiu um alto número de sequências de AgV3 isoladas de morcegos *Artibeus* spp e de várias outras espécies, sugerindo a ocorrência de transposição do vírus (*spillover*) de morcegos hematófagos para outras espécies, mostrando a importância da vigilância contínua em diferentes espécies hospedeiras, associados a diferentes ecossistemas (49).

Em algumas áreas da América Latina, o aumento do desmatamento e a correspondente redução de populações de animais silvestres podem desencadear um aumento na predação de morcegos hematófagos no gado e aumentar os riscos de surtos da doença. A intensificação da produção de gado também aumenta a disponibilidade de alimento para os morcegos permitindo com que as populações aumentem e se dispersem (47).

A raiva silvestre terrestre, ocorre principalmente nas espécies de cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), o guaxinim (*Procyon cancrivorus*), sagui do tufo branco (*Callithrix jacchus*) e raposa (*Pseudalopex vetulus*) no Brasil (50,51), nas raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) na Colômbia (52) e no mangusto (*Herpestes auropunctatus*) em Cuba e República Dominicana.

Na Guatemala, um estudo abordou questões sobre o risco de raiva representada por morcegos hematófagos. A esmagadora maioria dos entrevistados (90%) relatou que sabia pouco ou nada sobre raiva. Os resultados indicaram uma consciência geral relativamente alta dos mecanismos de transmissão da raiva e da gravidade da doença, mas apenas as mordidas de cães foram percebidas como uma fonte de transmissão do RABV. Em contraste, o risco de RABV transmitido por mordida de morcego raramente era conhecido, com apenas 10% dos entrevistados identificando os morcegos como uma fonte potencial de raiva e 14% dos entrevistados não disseram que tomariam alguma ação específica se mordidos ou arranhados por um morcego (53).

1.3.4.1 Brasil

O primeiro relato da doença no Brasil foi descrito por Antonio Carini, em 1908 (38,54), durante um surto de raiva em bovinos e equinos, no estado de Santa Catarina, onde foi cogitado a possível relação dos morcegos hematófagos como transmissores do vírus para estes animais. Destaca-se que naquela época acreditava-se que somente os canídeos poderiam transmitir a doença, mesmo tendo o relato dos criadores de frequentes ataques de morcegos “vampiros” ao gado. Oficialmente o primeiro caso de raiva em morcegos hematófagos no Brasil foi descrito por dois pesquisadores alemães, Haupt e Rehaag, também em Santa Catarina entre 1914 e 1916, confirmando a teoria de Carini (55)

No estado de São Paulo, o primeiro relato da doença em bovinos transmitida por *D. rotundus* foi em Ubatuba, litoral norte do estado em 1935. O segundo caso foi em Itu, interior de São Paulo no mesmo ano (55). Desde 1966, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Divisão de Defesa Sanitária Animal, instituiu o Plano de Combate à raiva dos Herbívoros, que atualmente se denomina Programa Nacional de Controle da raiva dos Herbívoros (PNCRH), executado pelo Departamento de Saúde Animal (DAS) (56). O PNCRH estabelece suas ações visando o efetivo controle da ocorrência da raiva dos Herbívoros no Brasil por meio da vacinação estratégica de espécies susceptíveis, como no caso, os herbívoros e do controle populacional de seu principal transmissor, *Desmodus*

rotundus (57). A vacinação do rebanho é considerada compulsória, somente quando há ocorrência de focos da doença (56).

Em 1973 foi criado o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva do Ministério da Saúde, cujo objetivo geral era eliminar a raiva em humanos, controlando a doença em animais domésticos, com isso instituiu-se a campanha de vacinação anual canina, capacitação dos laboratórios para vigilância epidemiológica por meio de diagnóstico (58).

O município de Botucatu é pioneiro no Programa de Controle da raiva no estado de São Paulo. Já em 1968, os professores de doenças infecciosas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Walter Maurício Corrêa, Célia Nogueira Maurício Corrêa e Arnold Gottschalk, implantaram em Botucatu, o primeiro Programa de Controle da raiva no estado de São Paulo, que se constituiu por três pilares: vacinação em massa de cães, captura de cães errantes e educação nas escolas. No município não há casos da doença em cães há pelo menos 25 anos (55)

No Brasil, entre 1990 e 2018, foram registrados 610 casos de raiva humana. Desde 2004 houve uma mudança no perfil epidemiológico da doença animal agressor, a principal via de transmissão era pela mordida de cães e a partir dessa data, os morcegos passam a ser os principais transmissores da doença como ilustrado na figura 3 (59).

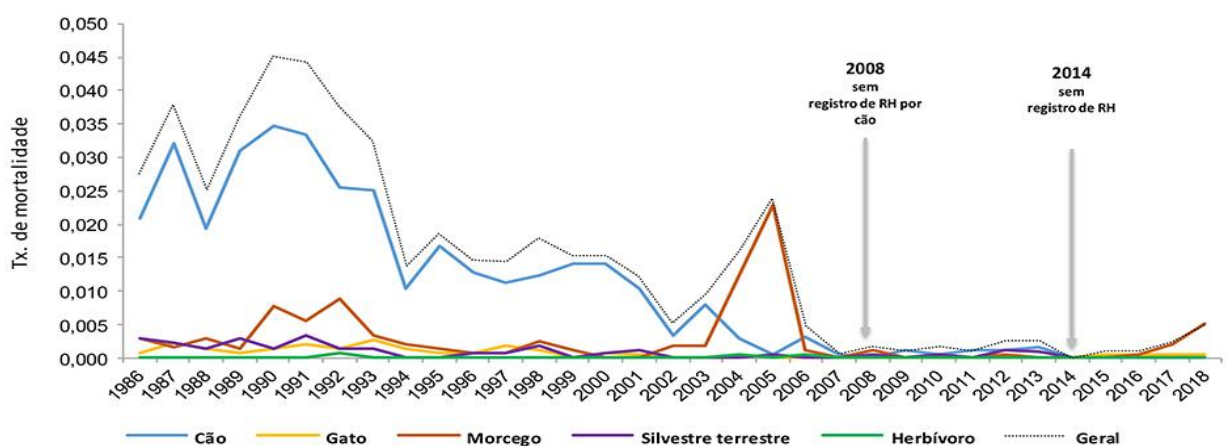


Figura 3 - Taxa de mortalidade de raiva humana por tipo de animal agressor (1986 – 2018)

O Brasil possui uma das maiores populações estimadas de cães do mundo e a segunda maior do continente depois dos Estados Unidos, com cerca de 30 a 50 milhões de cães. O país fez progressos expressivos na eliminação da raiva transmitida por cães nas últimas décadas, mas os casos ainda persistem no estado do Maranhão, com a AgV2 e devido a um grande surto que ocorreu em 2015 no Mato Grosso do Sul na fronteira com a Bolívia, pela AgV1 (60)

O cão doméstico é o reservatório de AgV1 e AgV2. O AgV1 circula na América Latina e foi introduzido no Brasil em 2006 a partir da fronteira Brasil-Bolívia. A AgV2 circula principalmente no Brasil, Argentina, Bolívia e Paraguai (45). Há a necessidade de vigilância e cooperação permanentes e integradas entre os países fronteiriços, concentrando-se nos diferentes componentes da cadeia epidemiológica de transmissão da raiva (61).

O Sistema Nacional de Saúde (SUS) do Brasil oferece cobertura universal de saúde para os brasileiros. Desde 1998, o Brasil utiliza o Sistema de Informação sobre Doenças de Declaração Obrigatória (SINAN) para registrar todos os pacientes que procuram atendimento médico em unidades de saúde pública após o contato com animal que pode transmitir a raiva. Com base no SINAN, houve um aumento no percentual de pacientes que necessitam de PPE (vacinas ou vacina + soro) de 2008 (67%) para 2015 (77%). No entanto, houve uma redução com 59% dos pacientes recebendo PPE em 2017, o que coincide com uma escassez de vacinação que ocorreu no Brasil em 2015 (60).

Mesmo sendo um dos países em que há a imunização em massa dos cães, por meio de campanhas, a cobertura vacinal é de 68,85% inferior a recomendada pela OMS, que é de 70% da população canina (5)

O número de casos humanos em que o cão é fonte de infecção diminuiu significativamente passando de 50, em 1990, para zero, em 2008, e dois casos no Maranhão, em 2009 (61,62). Estima-se que os custos devido a raiva no Brasil seja 138.872.317 dólares por ano e que a quantidade de PPE administrada é de 427.604 por ano (5). As regiões Norte e Nordeste, no período de 1990 a 2009, foram responsáveis por 82% dos casos da doença humana no Brasil, destacando-se Pará e Rondônia na região norte, Maranhão, Bahia, Pernambuco, Ceará e Alagoas no Nordeste e Minas Gerais no Sudeste (61).

No período de 2010 a 2018, foram registrados 36 casos humanos. Desses, 25% (9/36) tiveram o cão como animal transmissor, 52,8% (16/36) morcegos, 11,1%

(4/36) primatas não humanos, 8,3 (3/36) os felinos foram os transmissores, Em um caso não foi possível a identificação do animal agressor (22).

No país, foram relatados três casos de raiva humana, cuja infecção foi à partir de herbívoros, o que demonstra a importância ocupacional da doença e a necessidade do esquema de pré-exposição em grupos considerados de maior risco, permanentemente expostos aos animais ou ao vírus. A variante isolada nos herbívoros foi a AgV3, de morcego hematófago (61).

A incidência é maior em bovinos e equídeos. A raiva dos herbívoros é responsável por enormes prejuízos econômicos na América Latina, mais de 30 milhões de dólares/ano, sendo que no Brasil este valor se aproxima de 15 milhões de dólares, com a morte de cerca de 40.000 cabeças bovinas (63).

O *Desmodus rotundus* está se tornando relativamente comum em regiões com grandes rebanhos, e sua presença é favorecida pela presença de recurso alimentar abundante e de fácil exploração representado pelo gado, o que pode resultar em um aumento nas taxas de sobrevivência e na densidade populacional (64). Cerca de 1,4% dos morcegos hematófagos estão infectados com o vírus da raiva em vigilância no estado de São Paulo (65,66), porém na Amazônia Peruana esse número pode chegar a 10% (67,68).

No caso específico de raiva transmitida por *D. rotundus* as áreas impactadas pelas atividades agrícolas podem produzir novas características ou variáveis, que criam condições para o estabelecimento de áreas com diferentes graus de risco para a doença bovina. (64).

No Centro-Sul do Brasil, a fragmentação de florestas para áreas de pastagem e áreas de cultivo substituiu a presa natural da vida selvagem pelo gado, facilitando a predação de morcegos hematófagos. No Norte do Brasil, as atividades de mineração ou extração de madeira na floresta aumentaram o contato entre humanos e morcegos hematófagos, levando ao aumento do risco de transmissão da doença, Diferente do que ocorreu no Uruguai, onde o aumento da raiva possui mecanismos contrastantes, uma vez que a cobertura florestal aumentou com a florestação comercial e a expansão agrícola levou à substituição de pastagens naturais (47).

A transmissão da raiva por *D. rotundus* é uma grande preocupação para a pecuária no Brasil, mesmo em áreas onde o gado é rotineiramente vacinado, porém, os animais silvestres, incluindo porcos selvagens, antas e veados não vacinados, podem representar um risco para a disseminação da doença (68).

O aumento da raiva na fauna silvestre é considerado uma questão importante, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. No Nordeste do Brasil, o ciclo silvestre da raiva é mantido principalmente por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), primatas não humanos (*Callithrix jacchus*) e canídeos selvagens (65). Com base em estudos epidemiológicos e ecológicos, sugeriu-se que, entre os canídeos selvagens do Brasil, o *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) é o principal reservatório de raiva selvagem na região Nordeste, seguido pela raposa, *Pseudalopex vetulus* (69).

Estudos antigênicos e genéticos realizados sugerem que os vírus circulantes na região Nordeste tenham uma origem comum e que tenha ocorrido o fenômeno *spillover* dos canídeos domésticos para os silvestres. A manutenção de um ciclo de raiva entre os saguis de tufo branco, *Callithrix jacchus*, no Ceará, com casos relatados também no Piauí, mostra a possibilidade de transmissão da doença para humanos (50).

Embora os programas de controle da raiva, aplicados à vida silvestre tenham se mostrado bem-sucedidos na América do Norte e na Europa (36), por uma série de fatores, até o presente momento, a vacinação da fauna silvestre não é realizada no Brasil, onde as principais medidas de controle são vigilância passiva, tratamento pós-exposição e atividades educacionais (50).

1.4 Raiva em Bovinos

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com 213.523.056 milhões de bovinos. O estado de São Paulo possui 10.771.635 destes animais, segundo dados do IBGE (70).

Os prejuízos econômicos na América Latina são muito elevados, os gastos totais com a raiva em bovinos no Brasil é estimado em torno de 16 milhões dólares em 2015 (5,63). As perdas indiretas vão desde a diminuição da produção leiteira e da carne, a depreciação do couro dos animais, vacinação de milhões de bovinos e milhares de tratamentos pós-exposição de pessoas que mantiveram contato com animais suspeitos (48,58).

Os casos de raiva em bovinos no Brasil notificados e disponíveis pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) desde 1999 até 2019 são de 38.170 como mostrado na Figura 4. No estado de São Paulo a doença vem se

mantendo persistente. O número de casos notificados está descrito na Tabela 1, de acordo com os dados publicados pelo MAPA (71).

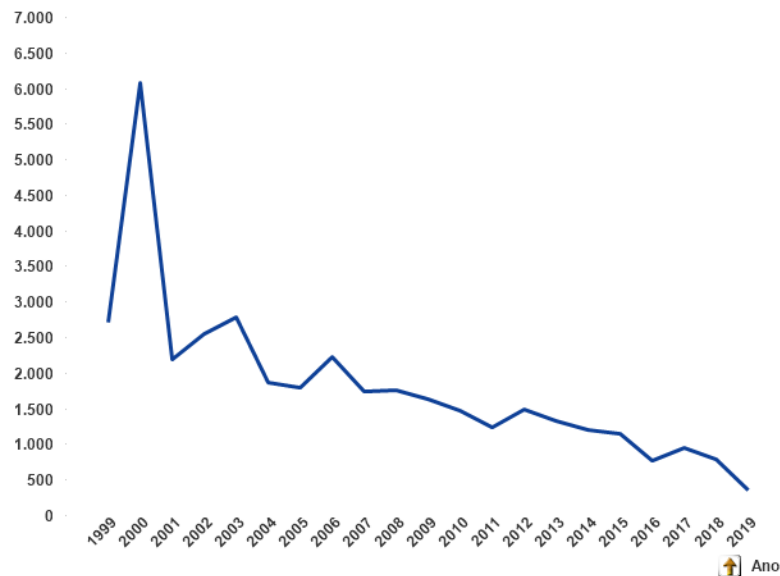


Figura 4: Distribuição Temporal dos casos de raiva em bovinos no Brasil entre 1999 a 2019. BRASIL, MAPA, 2020

Tabela 1: Distribuição Temporal dos casos de raiva bovina no Estado de São Paulo -SP

Ano	Doença	UF	Espécie	Casos	Focos
2015	raiva	SP	BOV	72	72
2016	raiva	SP	BOV	46	44
2017	raiva	SP	BOV	125	114
2018	raiva	SP	BOV	113	104
2019	raiva	SP	BOV	76	57
Total				432	391

Os principais fatores que contribuem para que a raiva no Brasil se dissemine ainda de forma insidiosa e preocupante nos herbívoros domésticos está relacionado ao aumento da oferta de alimento para o morcego, representado pelo significativo crescimento dos rebanhos, ocupação desordenada, caracterizada por modificações ambientais, como desmatamento, construção de rodovias e de hidroelétricas, que alteraram o ambiente em que os morcegos viviam obrigando-os a procurar novas áreas e outras fontes de alimento, oferta de abrigos artificiais, representados pelas

construções, como túneis, cisternas, casas abandonadas, bueiros e fornos de carvão desativados (65,72).

O principal transmissor da raiva em bovinos é o morcego hematófago, espécie encontrada principalmente na América Latina, comumente associado a AgV 3 (73).

Estudos, como o de Dias, et al, (74) utilizam dados de receptividade e vulnerabilidade do ambiente em albergar populações de *D. rotundus* e fatores facilitadores para a difusão da doença para novas áreas para criar um modelo de risco. Nesse modelo de risco, 81,8% dos focos de raiva foram adequadamente previstos e poderiam ter sido evitados se tivesse ocorrido a vacinação estratégica adequada.

Braga, et al, (75) teve o objetivo de criar um modelo qualitativo preditivo da ocorrência de raiva bovina em cada município em 25 dos 27 estados brasileiros. Do total de 5570 municípios, 5448 (97,8%) participaram do estudo. A presença de casos de raiva bovina foi relatada em 433 (7,9%) municípios.

Mesmo a raiva acometendo os bovinos no país, a vacinação não é considerada compulsória, sendo obrigatória em áreas de foco da doença, segundo o Manual de Controle da Raiva em Herbívoros, do MAPA, publicado em 2009.

Como o vírus da raiva possui grande diversidade genética, alguns estudos identificaram a circulação de várias linhagens virais simultâneas em surtos da doença em bovinos no estado de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul além de mutações dos genes *N* e *G* relatados por alguns autores (73,76).

Em outro estudo filogenético realizado em herbívoros na região amazônica, revelou duas diferentes linhagens virais distintas circulando no estado do Pará, uma na região nordeste e outra no sudeste, onde a distância geográfica entre essas áreas, provavelmente permitiu a diversificação genética do vírus, devido também a intensa movimentação de gado entre as regiões Norte e Nordeste do Pará, envolvendo também o Estado do Maranhão.

Um grande surto de raiva bovina associado ao morcego hematófago vem ocorrendo no Rio Grande do Sul (RS), desde 2011, com estimativas oficiais superiores a 50.000 mortes de bovinos, onde antes ocorriam apenas em áreas restritas do estado, e foi se espalhando por locais em que antes eram considerados livres da doença, até mesmo ultrapassando a fronteira do Uruguai. Dados oficiais relataram mais de 538 surtos de raiva herbívora entre 2011 e junho de 2016. O aumento do número de casos e a disseminação do vírus para outras regiões resultou em graves problemas econômicos como perdas do gado nas regiões afetadas. Além disso,

devido ao potencial zoonótico do vírus, muitas pessoas que relataram contato com animais afetados buscaram ajuda médica e alguns deles receberam imunoprofilaxia pós-exposição (76).

Devido a modificações ambientais em algumas áreas da América Latina, como desmatamento para formação de pastagens, a população de animais silvestres diminuiu. A intensificação da produção de gado também aumenta a disponibilidade de presas para os morcegos hematófagos e permite que as populações de morcegos aumentem e se dispersem, o que pode aumentar os riscos de surtos de raiva (47).

O primeiro surto de raiva parálitica transmitido por morcego hematófago no gado foi detectado no Uruguai em 2007. Em uma semana, 193 vacas morreram, custando ao país cerca de US \$ 2 milhões somente em vacinação imediata. O vírus da raiva isolado de morcegos hematófagos ou gado deste primeiro ano de surtos mostrou altas similaridades genéticas, mas divergência em relação aos isolados do sul e norte do Brasil. A expansão da raiva para o Uruguai, portanto, pode refletir uma mudança na distribuição do hospedeiro reservatório ou uma mudança nas condições ambientais que promovam a transmissão e persistência viral (47).

1.5 Biologia do *Desmodus rotundus*

Entre os vírus zoonóticos que causam mais mortalidade, descobertos nas últimas décadas, os transmitidos por morcegos ocupam uma maior proporção que os de outras ordens de mamíferos pois podem agir como reservatórios naturais e são capazes de abrigar diferentes espécies de vírus (77,78).

Os morcegos são considerados um dos grupos com maior diversidade em todo o mundo, representando 20,7% de 5416 espécies de mamíferos conhecidas, com 18 famílias e 1120 espécies presentes em quase todas as áreas geográficas do mundo, exceto no Ártico, Antártico, áreas extremas de deserto e algumas ilhas oceânicas(78). O Brasil foi classificado como o segundo país com maior diversidade de espécies de morcegos, abrigando 178 (15,9%) das espécies conhecidas em todo o mundo (79).

Das espécies de morcegos identificadas mundialmente, apenas três se alimentam exclusivamente de sangue que são, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* (77). *Desmodus rotundus* pertence à ordem *Chiroptera*,

família *Phyllostomidae*, subfamília *Desmodontinae*, e gênero *Desmodus*. Dentre os hematófagos, o *D. rotundus* é o único que se alimenta de sangue de mamíferos e é conhecido como “morcego vampiro” (80).

A espécie *D. rotundus* tem ampla distribuição no Novo Mundo, ocorrendo desde o norte do México até o norte da Argentina. No Brasil, ele está presente em todos os estados (79). Possuem sensores térmicos localizados no apêndice nasal para detectar áreas de maior vascularização na pele das presas. Por meio dos dentes incisivos, fazem feridas de forma indolor e apresentam uma substância anticoagulante na saliva (77).

A espécie tem uma boa capacidade adaptativa a mudança de habitat, portanto habita em áreas de mata assim como em regiões desérticas, usando abrigos naturais como tronco de árvores e cavernas e artificiais como bueiros, minas abandonadas e construção civil (74). Geralmente as colônias são pequenas e contém de 10 a 200 animais, contudo algumas colônias podem conter maior número quando não há o controle populacional da espécie (81).

A baixa reprodução dessa espécie, devido ao período gestacional de 165 a 180 dias e ao nascimento de apenas um filhote ao ano, favorece o seu controle populacional. No segundo mês de vida, os filhotes já recebem alimento regurgitado pela mãe e a acompanha até o quarto mês de vida, tornando-se independente aos cinco meses (80,82).

Os morcegos utilizam dois tipos de abrigo, os noturnos (overnight) onde permanecem o tempo necessário para a digestão após a alimentação, para voltar ao abrigo permanente e os abrigos tipo maternidade ou harém, que reúnem fêmeas, seus filhotes e machos dominantes. Caracterizam-se por apresentar elevado grau de umidade e ambientes escuros e frescos. Os de machos solteiros abrigam indivíduos jovens que não atingiram a maturidade sexual para formar seus haréns (80).

A mudança dos abrigos, se dá principalmente devido a retirada de bovinos, numa proximidade das colônias de 1,8km, como sugerido por estudo de Delpietro, et al. (82), sugerindo que a proximidade com o gado pode influenciar a escolha das colônias de *D. rotundus*.

Apresenta uma estrutura social complexa, baseada na formação de haréns, onde um macho dominante defende um grupo ao redor de 12 fêmeas com seus respectivos filhotes. Em geral, colônias com mais de 50 indivíduos podem conter

diversos grupos de 10 a 20 fêmeas com filhotes. Machos jovens, de 12 a 18 meses de idade, são expulsos do grupo pelo macho dominante (81)

O comportamento de lambar outros indivíduos de sua espécie ocorre principalmente entre as fêmeas, garantindo a integridade do grupo, que é 14 vezes mais frequente em *D. rotundus* do que em outras espécies de morcegos e a partilha de alimento. As lambeduras estimulam o regurgitamento do alimento de uma fêmea saciada, permitindo o seu aproveitamento por outra que não tenha se alimentado (83). Essa característica é considerada estar ligado ao altruísmo e coesão social (84).

Os morcegos hematófagos podem voar até 10 km para a forragem noturna, porém essa distância é determinada pelo número de indivíduos no abrigo, uma vez que os indivíduos podem voar mais longe das fontes de alimentação para minimizar a competição. A observação de que os machos voam mais longe que as fêmeas, sugere que os machos podem minimizar a competição com as fêmeas pelos locais de alimentação mais próximos (85).

D. rotundus precisa se alimentar num intervalo inferior a 3 dias e geralmente escolhem as presas em altitudes mais baixas que os abrigos, pois gastam menos energia para o forrageamento (86). Um morcego pode ingerir entre 15 e 25 ml de sangue em uma presa e um animal pode ser visitado por vários morcegos na mesma noite. O tempo necessário para a alimentação dos morcegos hematófagos depende das reações da vítima durante a refeição, geralmente *D. rotundus* gasta em torno de 30 minutos, podendo eventualmente chegar à uma hora (83). Após se alimentarem, eles procuram abrigos intermediários para a digestão, onde os nutrientes e água são absorvidos do sangue ingerido e outras substâncias, como o ferro, são excretados permitindo que o morcego voe mais tarde com menos peso (86).

Os morcegos hematófagos demonstram preferência em se alimentar de animais de grande porte, como equídeos, bovídeos e suínos, pois tendem a permanecer no mesmo local, diferente dos mamíferos silvestres e devido ao aumento da criação desses animais de produção, o número de morcegos vem crescendo nos últimos anos (74).

Comportamentos agonísticos, inserção de novos indivíduos nas colônias, limpeza mútua, troca de regurgitado, deslocamentos dos indivíduos entre abrigos e reorganização de colônias podem ser considerados, entre outros eventos, como a base da transmissão e da dinâmica da raiva entre morcegos que, certamente, reflete na dinâmica da enfermidade em bovinos (87).

Os morcegos hematófagos são altamente sensíveis ao frio e à desidratação devido à sua dieta baseada em proteínas, reservas lipídicas inadequadas e altas taxas de perda de água por evaporação. Os climas mais frios aumentam a quantidade de energia que *D. rotundus* deve gastar para manter a temperatura normal, exigindo maiores refeições de sangue. Como a ingestão de sangue é limitada pelo tamanho do corpo e pela capacidade de voo, essa capacidade isotérmica restringe a dispersão do *D. rotundus* (47).

A capacidade dos morcegos de controlar a infecção e dispersar o VRab, as transmissões entre indivíduos e a persistência viral são pontos que ainda precisam ser examinados. Alguns fatores foram descritos para sustentar essa manutenção e transmissão viral, como a migração entre as colônias, principalmente dos machos jovens, longo período de incubação associado a uma baixa mortalidade durante a hibernação em áreas subtropicais e temperadas, que permitem que indivíduos infectados sobrevivam até o ano seguinte e infectem a nova geração de jovens suscetíveis. Em infecções experimentais sugerem que os morcegos hematófagos são bastante resistentes à infecção e que apenas uma dose viral alta induz sintomas com alteração de comportamento e sinais neurológicos. Além disso, campos e estudos estatísticos indicam que a probabilidade de um morcego-hematófago desenvolver uma infecção letal pelo vírus da raiva é baixa (cerca de 10%) (88).

Nas colônias de morcegos afetadas, geralmente é observada uma prevalência relativamente baixa de infecção, variando de <1 a 4%. Por outro lado, os níveis de prevalência de anticorpos neutralizantes do RABV variam entre 65 e 70% (89).

No estado de São Paulo, na década de 1980, houve uma epidemia, estudada por Tadei et al. (90), que se propagou a uma velocidade média de 20 km/mês pelas principais bacias hidrográficas paulistas, como as dos rios Tietê, Ribeira, do Peixe, entre outras. Os mesmos pesquisadores sugerem que áreas montanhosas, com presença de floresta, alto índice pluviométrico e com presença de criação bovina de subsistência, apresentam maior probabilidade de ocorrência da doença, pois estas características ecológicas são adequadas para o *D. rotundus* (90).

Depois do surto de 1999 que ocorreu no estado de São Paulo, desde 2001 a Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA) identificam, cadastram e caracterizam abrigos de quirópteros, controle da população de morcegos hematófagos, monitoramento de abrigos e focos de raiva (74). Porém esse controle populacional deve ser executado adequadamente, as interrupções das colônias causadas pelo

controle podem aumentar as disputas por recursos, como fêmeas e abrigos, e consequentemente, aumentar os contatos infecciosos entre os morcegos (86).

2. Justificativa

Há consenso que os bovinos atuam como indicadores ecológicos, onde a raiva não é endêmica → quando é endêmica ele não é indicador da raiva no meio silvestre, uma vez que o número de *D. rotundus* diagnosticados com raiva é pequeno em relação ao número dos casos da doença identificados nesses herbívoros, que se destaca principalmente quando analisamos os números disponibilizados pelas autoridades oficiais. Entre 2015 e 2018, segundo dados do Ministério da Saúde (SVS/MS) foram diagnosticados 3661 casos de raiva em bovinos, 452 em equinos e somente 73 em *D. rotundus* (22).

Os morcegos são hospedeiros de uma variedade de patógenos, alguns dos quais são conhecidos por infectar e causar doenças em humanos e animais domésticos. Devido a atividades antropogênicas e mudanças ambientais, a exposição humana a essas infecções vem se tornando mais fácil a transmissão de zoonoses, como a raiva (78).

Além dos programas governamentais para a vacinação em massa de cães e gatos associada à vigilância epidemiológica, também é necessária a tipificação molecular do VRab para que a dinâmica da manutenção do vírus na natureza seja conhecida e possibilite estabelecer suas relações filogenéticas (60).

Para que o controle da raiva seja eficiente, é necessário conhecer as linhagens do vírus da raiva nas diferentes regiões geográficas, com o objetivo de esclarecer a epidemiologia da raiva entre os bovinos e outros animais de interesse econômico (76).

As informações geradas neste estudo podem ajudar na priorização de áreas de risco para ataques de morcegos hematófagos e na implementação de estratégias de prevenção e controle na transmissão do vírus da raiva.

Considerando-se a importância dos quirópteros na cadeia epidemiológico de transmissão da raiva é que propusemos o presente estudo a fim de entender a dispersão e a dinâmica das cepas virais.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Realizar análise epidemiológica, por meio de georreferenciamento e análise geoestatística dos casos de raiva positiva em bovinos encaminhados para diagnóstico no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP – Botucatu/SP no período compreendido entre 2016-2018, caracterizar genotipicamente os isolados do VRab dos encéfalos destes animais, bem como proceder o sequenciamento da nucleoproteína viral.

3.2 Objetivos específicos

- Georreferenciamento de colônias de *D. rotundus* mapeadas e propriedades em que houve notificação de bovinos positivos para raiva.
- Dinâmica *D. rotundus* x casos positivos (possíveis variáveis)
- Análise estatística
- Caracterização genotípica das cepas de VRab isoladas de bovinos no município de Botucatu e região;
- Analisar filogeneticamente os isolados.
- Comparar os nossos isolados virais com os obtidos de outras regiões e disponíveis no *GenBank*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Amostras de SNC

No período de 2016 a 2018 foram encaminhados para o Serviço de Diagnóstico de Zoonoses, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo 269 amostras de material encefálico de bovinos suspeitos para raiva provenientes de 69 municípios.

Para inclusão no estudo, do total, 126 (46,84%) foram positivas por pelo menos uma das técnicas diagnósticas preconizadas pelo Ministério da Saúde, Reação de Imunofluorescência Direta e Isolamento Viral em Camundongo. Também foram

avaliadas as fichas de recebimento do SNC com os dados epidemiológicos e as que apresentavam dados incompletos de endereço foram excluídas do estudo.

Então, o total de 104 amostras de SNC, encaminhados por 25 municípios (Fig. 5), pertencentes aos 9 Escritórios de Defesa Agropecuária (EDA) de Avaré, Bauru, Botucatu, Itapetininga, Itapeva, Jau, Marília, Ourinhos e Piracicaba foram incluídos no estudo e utilizadas, em pelo menos, uma etapa das avaliações que estão sumariadas na Tabela 2, de acordo com o número de identificação no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses, ano de recebimento da amostra, município do estado de São Paulo responsável pelo envio, resultado diagnóstico (RID e PB), diagnóstico molecular que compreende as técnicas de RT-PCR e Purificação, além de georreferenciamento.

O projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ, UNESP, Botucatu, com Protocolo CEUA 0066/2018, que segue no Anexo 1.

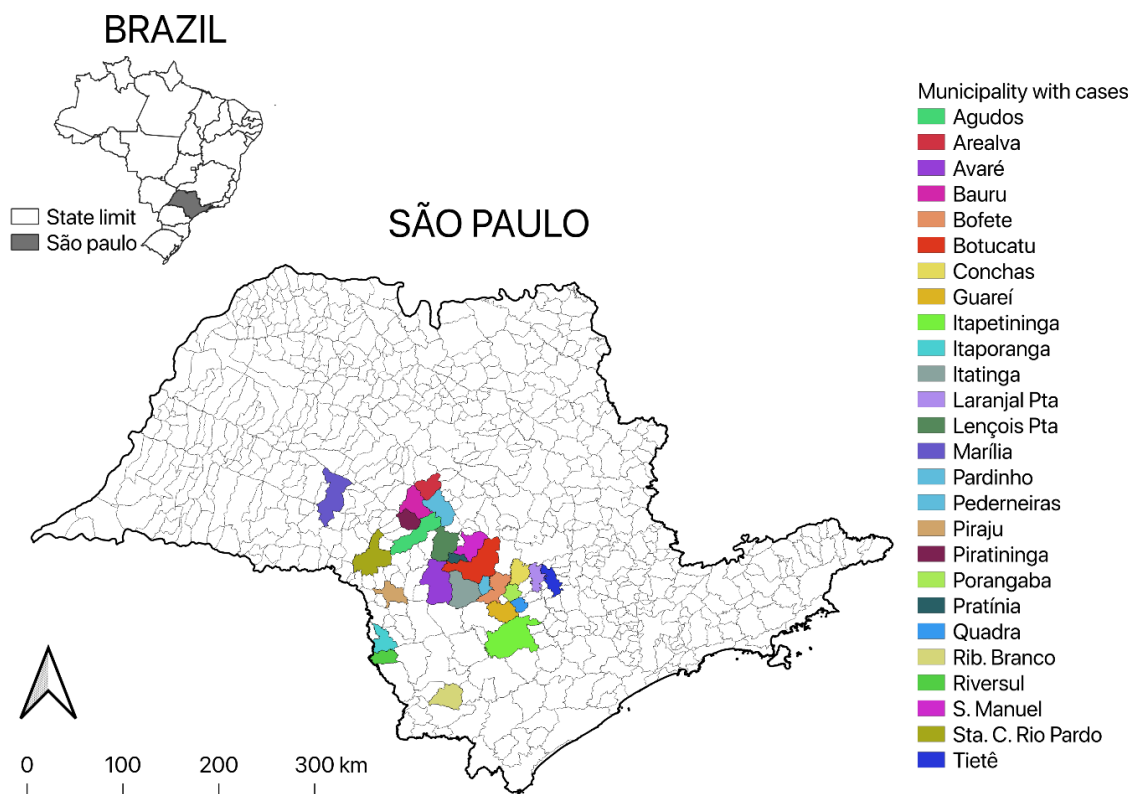


Figura 5: Municípios em que houveram casos de raiva positivas em bovinos no período de 2016 a 2018, enviados para o Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, UNESP, Botucatu, 2019.

A seguir, apresentamos o fluxograma de acordo com as condições das amostras, resultados e variáveis analisadas.

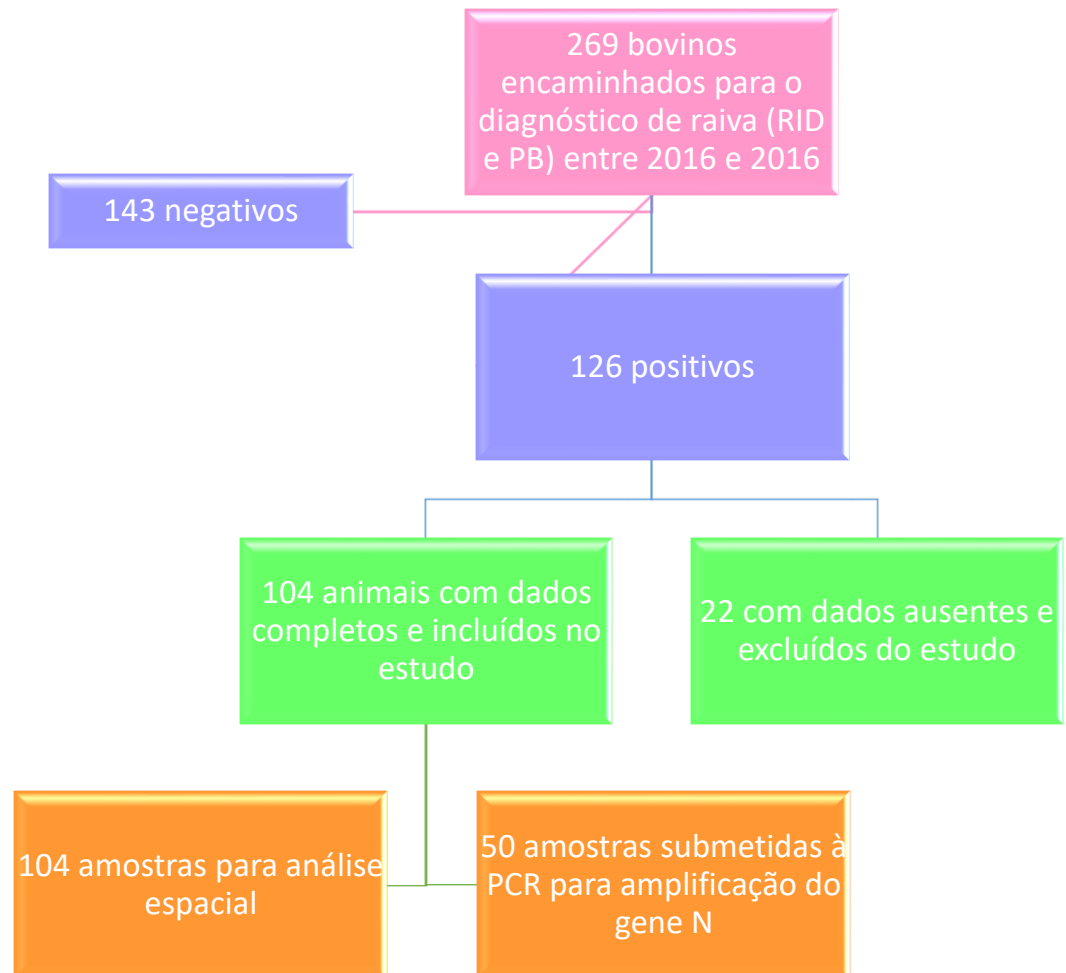


Figura 6: Fluxograma das amostras recebidas entre 2016 a 2018 e sua utilização no estudo

Das 25 cidades com casos positivos e que foram incluídos no estudo, um total de 220 amostras, positivas e negativas, foram enviadas no período estudada.

Tabela 3: Amostras de SNC de bovinos positivos para raiva de acordo com os municípios e de acordo com a inclusão e utilização no estudo.

Cidade	Amostras enviadas	Amostras positivas	Amostras PCR	Amostras georreferenciamento
Agudos	3	2	1	1
Arealva	18	9	1	9
Avaré	33	11	4	10
Bauru	3	1	1	1
Bofete	13	12	3	10
Botucatu	42	17	4	10
Cesário Lange	3	2	2	2
Conchas	3	3	2	3
Espirito santo do turvo	2	1	1	1
Guareí	4	3	3	3
Itapetininga	4	2	1	1
Itaporanga	3	1	1	1
Itatinga	31	23	6	17
Laranjal Paulista	4	3	2	3
Lençóis Paulista	9	5	2	4
Marília	1	1	1	1
Pardinho	12	8	3	7
Piraju	3	2	1	2
Piratininga	1	1	0	1
Porangaba	6	3	3	5
Pratânia	2	2	1	3
Ribeirão Branco	1	1	1	1
Riversul	1	1	1	1
Santa Cruz do Rio Pardo	2	2	2	2
São Manuel	17	8	3	5
Total	220	124	50	104

4.2 Reação de Imunofluorescência direta (RID)

Foi realizada a técnica adaptada de Dean et al. (1996), para as 269 amostras, pela realização de impressões do material cerebral em lâminas de microscopia de 26 x 76 mm, fixadas e inativadas em acetona por 4 horas. A secagem das lâminas foi realizada em estufa a 37°C e a seguir, adicionado 25µL das soluções de conjugado preparado com suspensão de CVS *Challenge Virus Standard* (suspensão de cérebro de camundongos infectados com cepa padrão) e também diluído em CN (suspensão de cérebro de camundongos sadios), sobre a impressão nas extremidades da lâmina,

sendo do lado esquerdo da lâmina com conjugado diluído em CVS e do lado direito diluído em suspensão de CN, incubando-as em estufa a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. A seguir, foi realizada a primeira lavagem das lâminas, para a retirada das partículas não ligantes, com solução salina tamponada (SST) pH 8,5 e após as mesmas permaneceram imersas em SST por 10 minutos e a seguir procedeu-se a secagem das lâminas. A montagem da lâmina para a leitura foi feita com glicerina tamponada pH 8,5 cobrindo-se com lamínula de 24 x 60 mm. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência com objetiva de 10x e ocular de 40 da marca (Carl Zeiss). As impressões positivas foram confirmadas pela visualização das inclusões virais denominadas de Corpúsculos de Negri, brilhantes de cor esverdeada, de diferentes formas e tamanhos.

4.2.1 Diluição do conjugado

O conjugado utilizado na RID foi o antinucleocapsídeo cedido pelo Instituto Pasteur - SP. O mesmo é dirigido para a detecção do nucleocapsídeo viral do vírus rábico. A diluição de uso foi variável de acordo com titulação prévia no laboratório, de acordo com o resultado obtido na titulação.

4.3 Isolamento viral em camundongos (Prova Biológica)

Foi realizada segundo protocolo descrito por Koprowski (1996) que consiste na inoculação intracerebral de suspensão de material cerebral em camundongos albinos suíços com 21 dias de idade. Para o preparo da suspensão, foi realizado macerado com fragmentos cerebrais, adicionando-se 1:5 (peso-volume) solução diluente preparada com água de osmose reversa estéril, soro equino e antibiótico (lincomicina). A suspensão foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado como inóculo. Foram inoculados 05 camundongos *Mus musculus* Balb/c por amostra, adquiridos no Biotério Central da UNESP/Botucatu, que foram mantidos em estante ventilada (Alesco), em caixas de polipropileno com ficha de avaliação individual para anotação de alterações, com observação por 30 dias. Os camundongos que apresentaram sinais clínicos da doença, um deles foi eutanasiado e seu encéfalo coletado sendo realizada a RID, para confirmação diagnóstica.

4.4 Avaliação molecular

Para a avaliação molecular, foram escolhidas 50 amostras aleatórias de bovinos positivos. Todas as amostras não foram utilizadas para biologia molecular devido ao alto custo para realização.

4.4.1 Extração de RNA

A extração de RNA total foi feita do SNC dos camundongos correspondentes a 50 bovinos positivos pelas técnicas de RID e PB, controles positivo e negativo foi realizada utilizando TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.2 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para amplificação dos genes codificadores da nucleoproteína (N) viral

A RT-PCR utilizando vírus rábico isolado no SNC dos camundongos positivos na prova biológica foi realizada segundo protocolo padronizado no laboratório de biologia molecular do Instituto Pasteur – SP, e a PCR para amplificação parcial do gene N, com primers para nucleoproteína (N) (20). Como controles, foram utilizadas suspensões de cérebros de camundongos inoculados com a amostra CVS (*Challenge Virus Standard*) como controle positivo e com água ultra-pura livre de DNase e RNase, como controle negativo.

4.4.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) – Transcrição Reversa (RT)

Para obtenção de cDNA, foi adicionado 6µL do RNA extraído de cada amostra de SNC e adicionado ao RNA o mix para a transcrição reversa contendo 4µL 5x First Standart Buffer, 4 µL do primer senso (21G), 2µL de dNTPs 1mM, 0,2µL de DTT (100mM) , 1 µL de Reverse Transcriptase MMLV (200U/ µL) e 2,8µL de água

ultra-pura livre de DNase e RNase com volume final de 14 µL de mix e levado ao termociclador a 42°C por 60 minutos.

Após a obtenção do DNA complementar foi realizada a reação de PCR, em microtubos de 0,2 ml, contendo 3 µl da amostra, 12,5 µl do reagente GoTaq® Green Master Mix (Promega), 7,5 µl de água ultra pura e 1 µl de cada primer, totalizando um volume de 25 µl, seguindo as recomendações do fabricante. Os tubos foram inseridos em um termociclador (Mastercycler® Eppendorf, submetendo-se aos ciclos descritos de acordo com o Quadro 1. Os primers utilizados são apresentados no Quadro 2.

Quadro 1. Ciclos utilizados nas PCRs para o gene N do RABV em amostras de SNC de bovinos.

Ciclo	Temperatura	Tempo
1	94°C Denaturação	5 minutos
35	94°C Denaturação	45 segundos
35	48°C Anelamento	1,5 minutos
35	72°C Extensão	2 minutos
1	72°C Extensão	2 minutos

A temperatura de anelamento de 48 °C utilizadas na reação de PCR foi obtida por meio de padronização da reação por gradiente temperatura no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, UNESP, Botucatu, onde as amostras foram testadas.

Quadro 2. Primers utilizados nas provas de RT-PCR e sequenciamento de DNA para os genes N das amostras de RABV isoladas de bovinos.

Primer	Sentido	Sequência	Gene	Uso	Posição na amostra PV
21g	senso	5' ATGTAACACCTCTACAATG 3'	N	RT-PCR/Seq*	55-73
304	anti-senso	5'TTGACGAAGATCTTGCTCAT 3'	N	RT-PCR/Seq*	1514-1533
P784	anti-senso	5'CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA 3'	N	Sequenciamento	779-799

Legenda: Seq*: Sequenciamento

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (0,1 M de Tris, 0,09 M de ácido bórico e 0,001 M de EDTA),

adicionado de 4,8 µl de Nancy-520 e visualizados em um transiluminador UV (UVP®). Foram considerados positivos os isolados que resultaram em fragmentos de 1478 pares de bases (pb) para o gene N.

4.4.4 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se o kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific), segundo instruções do fabricante diretamente a partir das reações de PCR. Após a purificação, as amostras de DNA foram quantificadas visualmente em gel de agarose a 2% com *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen™), segundo as instruções do fabricante.

4.4.5 Sequenciamento do gene N de vírus rábico isolado de bovinos

Os produtos amplificados na RT-PCR foram purificados e submetidos ao sequenciamento genético pelo método de Sanger. A cada amostra purificada foram adicionados, em tubos separados, os *primers sense* e *antisense*.

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, Universidade de São Paulo, USP, em sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems™, Life Technologies, EUA). Para tanto, empregou-se o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing 3.1* (Applied Biosystems™, Life Technologies, EUA), com uma etapa de precipitação por isopropanol/etanol, de acordo com recomendações do fabricante.

4.4.6 Análise das sequências obtidas

As sequências *forward* e *reverse* obtidas no sequenciamento genético foram visualizadas sob forma de eletroferograma no programa Chromas (v. 2.6.6, Technelysium Pty Ltd 1998-2018©), avaliando-se sua qualidade e realizando-se a correção de erros óbvios. A fim de gerar uma sequência consenso, quando possível, as sequências *forward* e *reverse* foram submetidas ao alinhamento global no programa MEGA X (91).

A fim de confirmar a identidade dos *amplicons*, as sequências *forward*, *reverse* e consenso foram submetidas ao alinhamento local, pela ferramenta BLASTn (*nucleotide basic local alignment search tool*), sendo comparadas às sequências depositadas no banco de dados do GenBank.

4.4.7 Análise filogenética

A análise filogenética do vírus rábico foi realizada no programa MEGA X (92) em duas etapas. Em ambas, o programa de alinhamento de múltiplas sequências *Clustal/W* foi empregado para o alinhamento de sequências de 601 pb, referentes aos nucleotídeos 82 a 682 do mRNA do gene N do vírus rábico (acesso GenBank AB685247.1).

Para a primeira análise, realizou-se o alinhamento das 45 sequências de isolados do vírus rábico de bovinos estudados a 32 sequências de vírus rábico de 10 diferentes linhagens, obtidas no GenBank e empregadas na análise realizada por Menozzi et al (21), além de sequência do *Pasteur Virus* e vírus Mokola, totalizando 79 sequências mostradas na tabela 4.,

Para a segunda análise, as 45 sequências de bovinos estudados foram alinhadas a um banco contendo 118 sequências de vírus rábico obtidas no GenBank, descritos na Tabela 4 e composto por: (i) isolados de bovinos, equinos e de *D. rotundos*, oriundos de diferentes estados brasileiros, e de alguns países da América Latina e México; (ii) de humanos infectados por agressão por morcego hematófago na região Norte do Brasil; (iii) à linhagem do vírus rábico de canídeos brasileiros; (iv) uma sequência do *Pasteur Virus strain*; (v) uma sequência do vírus Mokola, utilizado como raiz da árvore filogenética. O alinhamento totalizou, portanto, 165 sequências.

O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para ambos os bancos de dados foi selecionado sob o critério de informação Bayesiano (BIC) no procedimento de seleção do melhor modelo no MEGAX, resultando, para ambas as análises, no modelo de três parâmetros Tamura (*Tamura 3-parameter*) (93), assumindo-se a não uniformidade das taxas evolutivas entre os sítios, utilizando-se uma distribuição Gamma discreta (+G) com cinco categorias de taxas. Para a primeira análise, das linhagens do vírus, assumiu-se também que certa fração dos sítios é evolutivamente invariável (+I). As posições de códon incluídas foram 1^a+2^a+3^a+não codificante (94).

A análise filogenética foi realizada utilizando-se o método de máxima verossimilhança. Para inferência da história evolutiva dos táxons analisados, foram realizadas 1.000 replicatas de *bootstrap* (95). Ramificações reproduzidas em menos de 70% das replicatas foram colapsadas, exibindo-se, portanto, as árvores condensadas para este ponto de corte. As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente, aplicando-se os algoritmos *Neighbor-Join* e *BioNJ* a uma matriz de distância em pares estimadas usando a abordagem de máxima verossimilhança composta e, em seguida, selecionando-se a topologia com valor superior de log de verossimilhança. De acordo com o procedimento de seleção do modelo, uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os sítios (cinco categorias, +G, parâmetro = 1,8742 para a primeira análise, das linhagens e 0,2780 para a segunda). Para a análise das linhagens do vírus rábico (primeira), o modelo de variação de taxa permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 27,70% sítios).

4.5 Georreferenciamento

Dados de endereços das propriedades dos bovinos positivos nas técnicas diagnósticas para raiva (RID e isolamento viral em camundongo), oriundos de Botucatu e região, foram coletados a partir dos dados das fichas de encaminhamento enviadas pelos solicitantes, EDAS e prefeituras. Os endereços foram utilizados para a elaboração de mapas, a fim de demonstrar o local onde os bovinos infectados pelo VRab foram encontrados. Os endereços das propriedades foram submetidos manual e individualmente à busca no Google Maps (<https://www.google.com/maps>) a fim de se obter as coordenadas geográficas (X e Y) dos locais em que foram encontrados, adicionando-se essas informações ao banco de dados.

O mapeamento dos abrigos e dos quirópteros positivos foi realizado com a importação das latitudes e longitudes dos pontos para o software QGIS 3.8.1-Zanzibar utilizando-se o datum planimétrico SIRGAS2000 e sistema de coordenadas projetadas UTM zona 22 S. Em seguida foram gerados os mapas de estimativa de densidade de Kernel para os abrigos e os animais positivos, utilizando-se para isso o algoritmo “Mapa de calor (Estimativa de densidade de Kernel)” com os parâmetros de raio de 150 quilômetros, modelagem quartica e valor de escala de saída bruto. Para a geração

das áreas de influência dos abrigos e dos animais positivos, foi utilizado o algoritmo “Create Buffers” do complemento MMQGIS, com o raio de 20 quilômetros.

4.6 Análise Estatística

Foi considerado a área de uso do morcego em torno do abrigo, como sendo de 10km (85), tendo sido calculado o buffer dissolvido com esta medida de raio no entorno de cada abrigo, de forma dissolvida para todos os abrigos das EIDs avaliadas (usando o Programa QGIS). Assim, foi comparada a localização dos casos de raiva que interceptam e não interceptam com a área dos diferentes tipos de abrigos de morcegos, tendo sido comparadas as diferenças entre os tipos de abrigos por meio do Qui quadrado, p significativo < 0.01) (usando o programa R).

As distâncias entre os casos e entre os períodos foi calculada usando o programa QGIS (versão 3.8) e as análises estatísticas no programa R.

Os mapas de Kernel foram realizados no programa QGIS (versão 3.8) usando a função Kernel quártico com um raio de 150km.

5. Resultados

A Coordenadoria de Defesa Agropecuária do estado de São Paulo faz o cadastramento e a tipificação dos abrigos de quirópteros. Os dados e coordenadas geográficas foram gentilmente cedidos por eles para relacionar os abrigos de morcegos hematófagos com os casos de raiva positivos em bovinos.

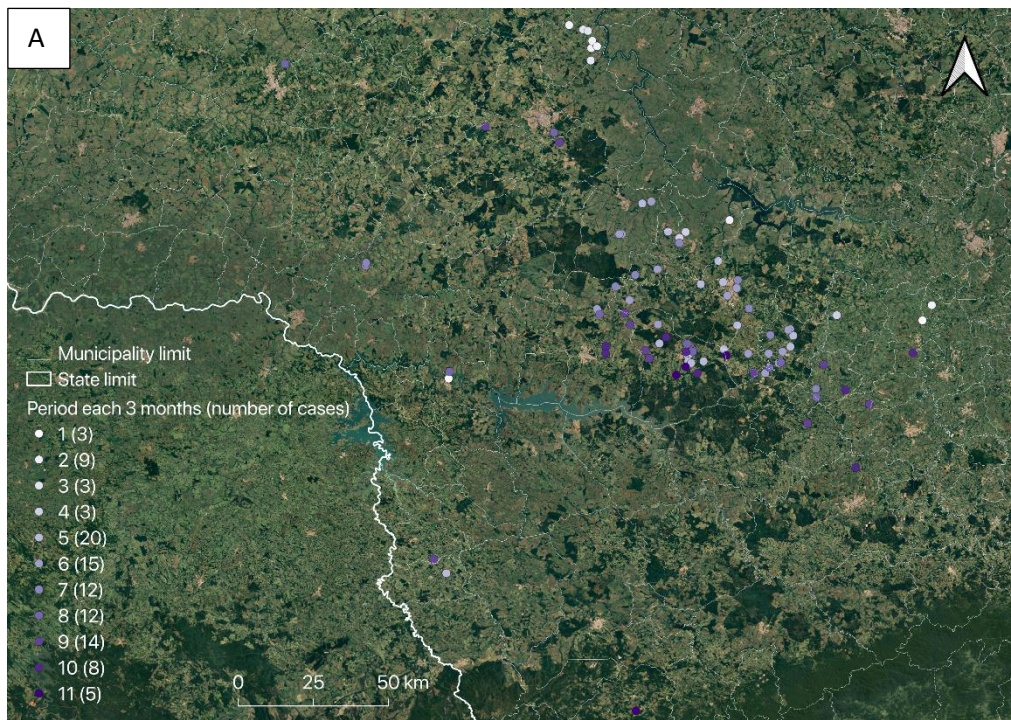
O total de abrigos mapeados no estado de São Paulo é de 5295, correspondente aos 40 EDAS. Os abrigos incluídos na área do estudo, foram os correspondentes aos 9 EDAS, cuja amostras de SNC foram positivas para raiva no SDZ, UNESP, correspondendo o total de 1553 abrigos, classificados como utilização (machos, maternidade ou harém, vazio, digestório, destruído), tipo (natural ou artificial) e situação (ativo ou destruído) como descrito na tabela 4.

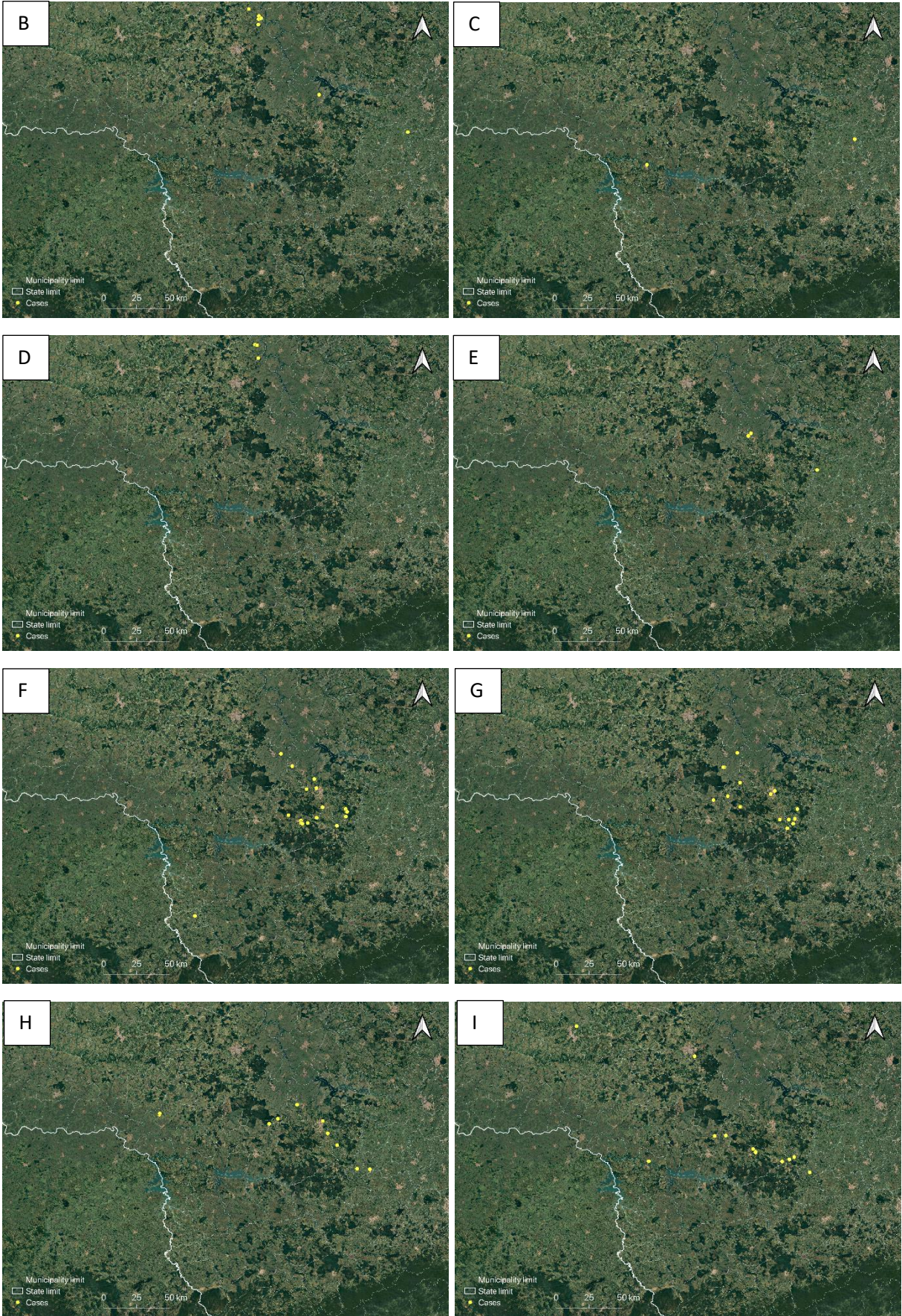
Tabela 5: Classificação dos abrigos de *Desmodus rotundus* em 9 Escritórios de Defesa Agropecuária (EDA) do estado de São Paulo, 2019.

Abrigo	Classificação	N (%)
Tipo	Artificial	1323 (85,19%)
	Natural	205 (13,20)
	Outros	25 (1,61%)
Situação	Ativo	1318 (84,87%)
	Destruído	235 (15,13%)
Utilização	Macho	697 (44,88%)
	Maternidade	662 (42,63%)
	Digestório	145 (9,34%)
	Vazio	36 (2,32%)
	Outros	13 (0,83%)
Total		1553 (100%)

O número de casos positivos recebidos no mesmo período foi dividido em trimestres (t) de acordo com a data de recebimento das amostras nos anos de 2016-2018, que corresponderam a 11 tempos (t1-t11).

Os casos de raiva em bovinos que ocorreram de 2016 a 2018 foram divididos em períodos trimestrais (t1 – t11), de acordo com a data de recebimento no SDZ e estão ilustradas na figura 7





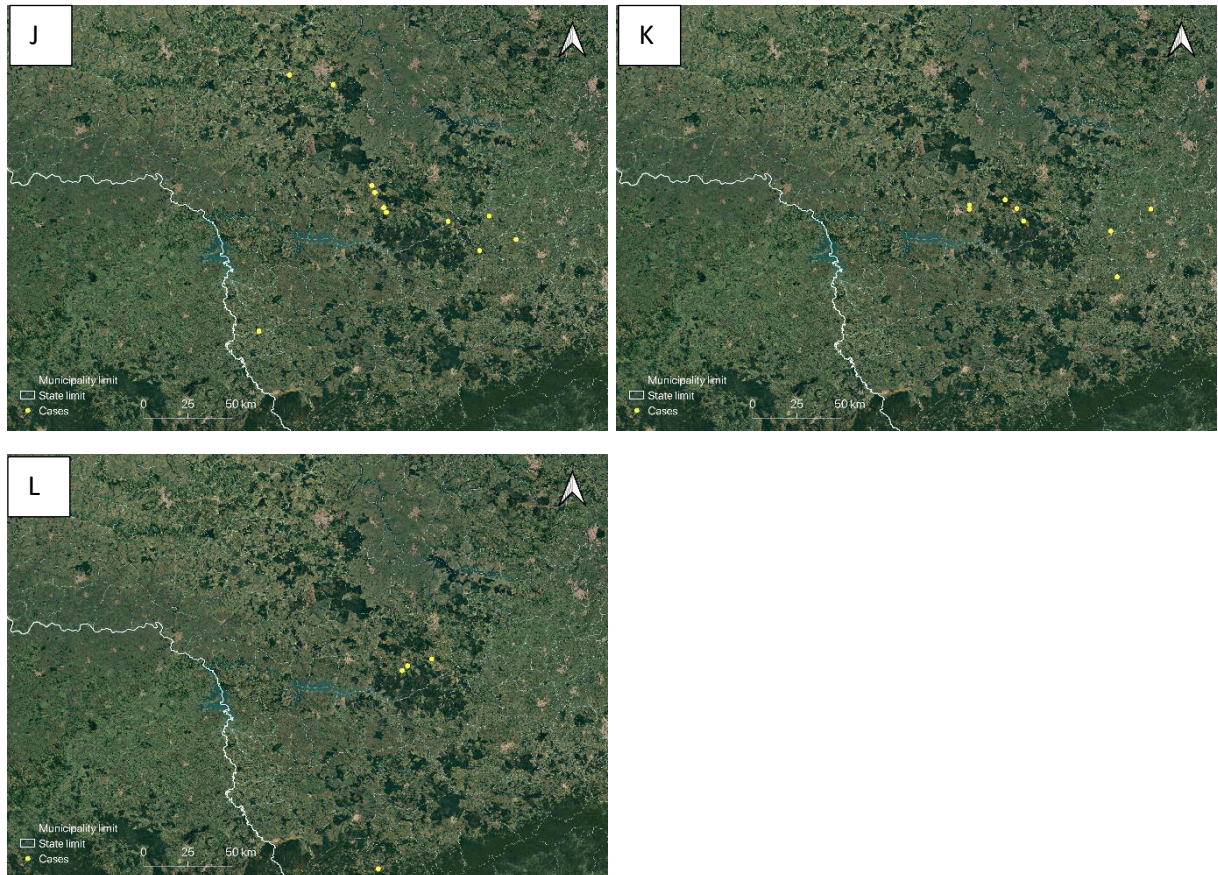
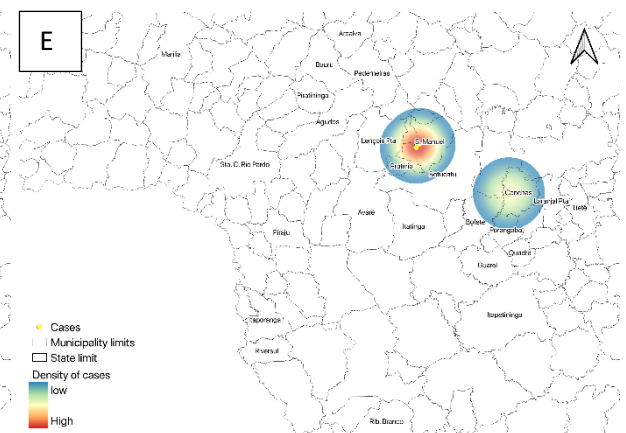
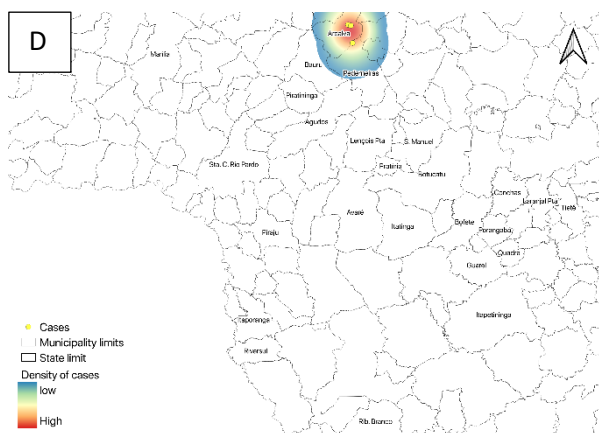
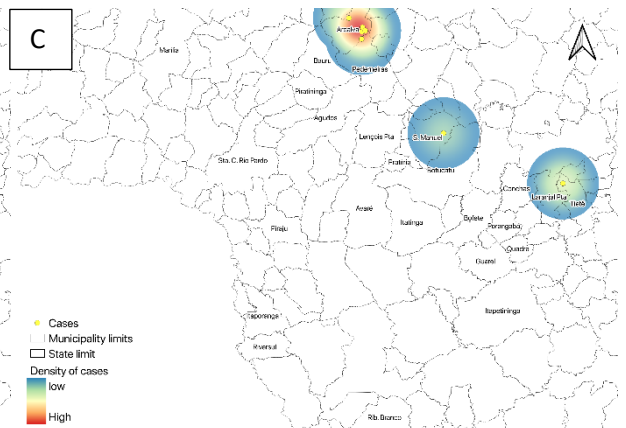
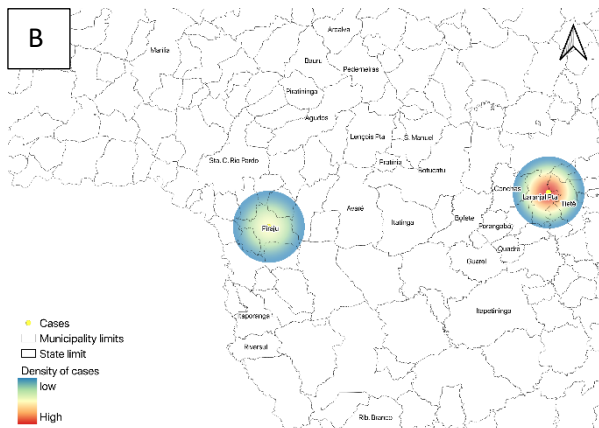
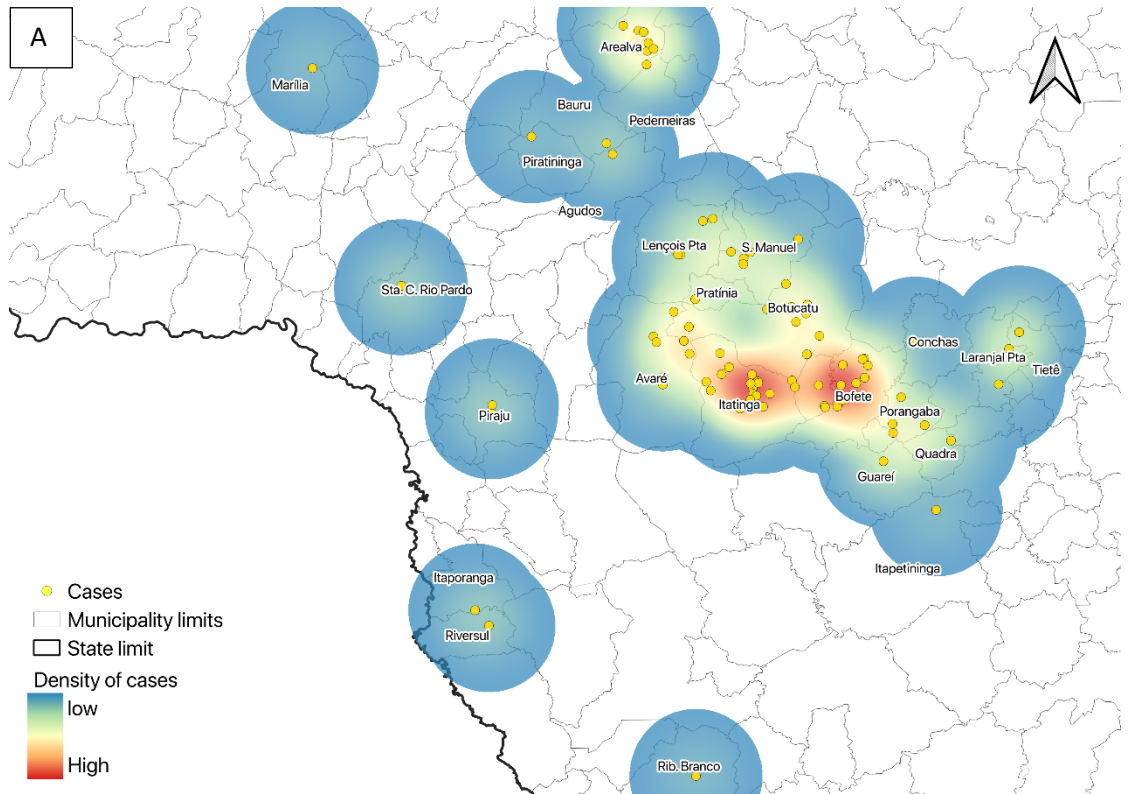


Figura 7: Distribuição temporal dos casos de raiva positivos nos anos 2016-2018 divididas em trimestres (t). A: todos os tempos no período estudado, B: t1(abril-junho/2016), C: t2(julho-setembro/2016), D: t3(outubro-dezembro/2016), E: t4(janeiro-março/2017), F: t5(abril-junho/2017), G: t6(julho-setembro/2017), H: t7(outubro-dezembro/2017), I: t8(janeiro-março/2018), J: t9(abril-junho/2018), K: t10(julho-setembro/2018), L: t11(outubro-dezembro/2018).

O mapa de Kernel representado pela figura 8 mostra a intensidade dos casos de raiva no período estudado. A região com maior densidade de casos é a região de Itatinga e Bofete, que corresponde ao EDA de Botucatu.



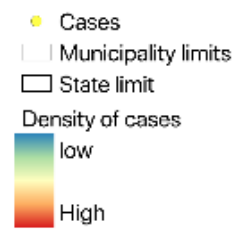
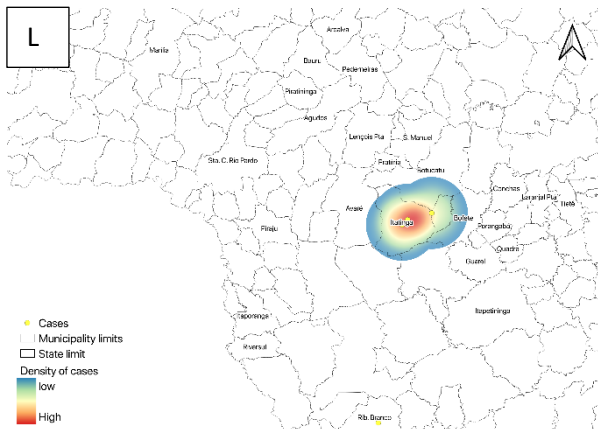
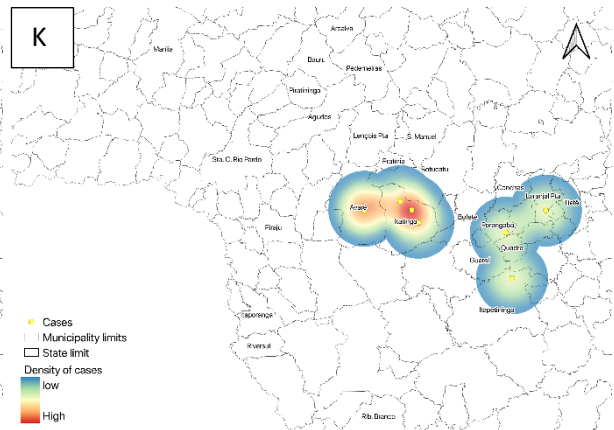
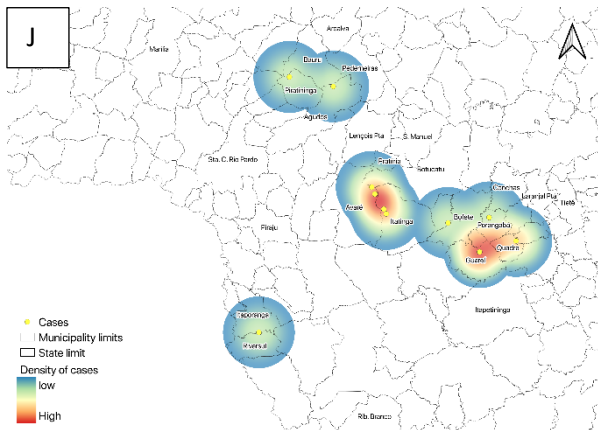
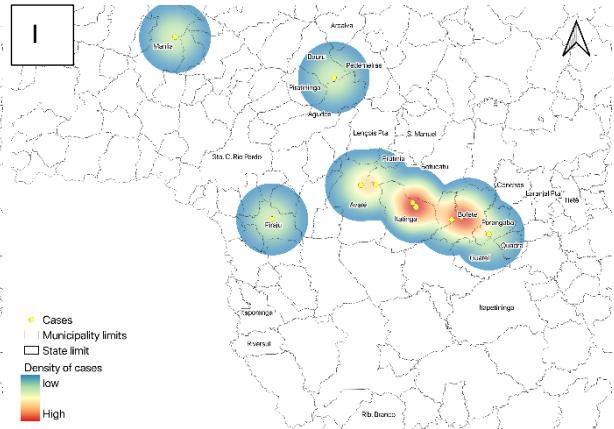
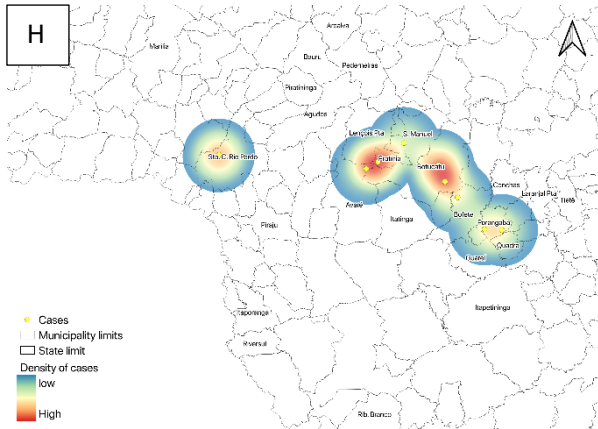
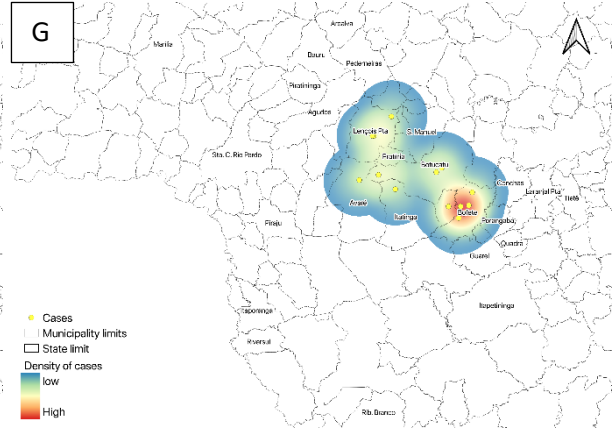
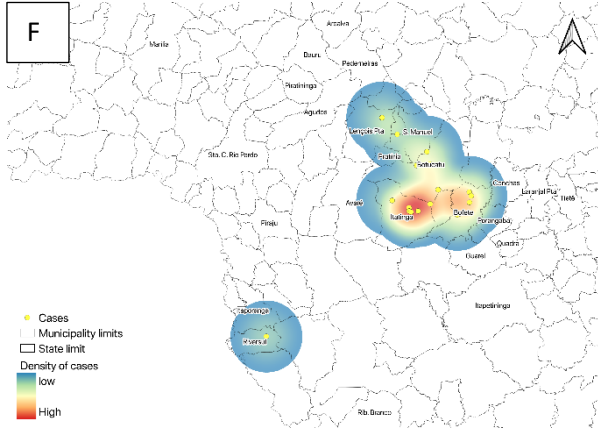


Figura 8: Densidade dos casos de raiva em bovinos nos municípios correspondentes a 9 EDAS do Estado de São Paulo-SP enviados ao SDZ, UNESP, Botucatu 2016-2018 divididas em trimestres (t). A: todos os tempos no período estudado, B: t1(abril-junho/2016), C: t2(julho-setembro/2016), D: t3(outubro-dezembro/2016), E: t4 (janeiro-março/2017), F: t5 0987 (abril-junho/2017), G: t6 (julho-setembro/2017), H: t7 (outubro-dezembro/2017), I: t8 (janeiro-março/2018), J: t9 (abril-junho/2018), K: t10 (julho-setembro/2018), L: t11 (outubro-dezembro/2018).

Foram comparadas as distancias entre os casos de um t_i com relação ao t_{i-1} . Para cada período foi realizado o teste de normalidade shapiro wilk. Uma vez que nenhum dos tempos apresentou distribuição normal foi usado o teste não paramétrico Wil-coxon para avaliar a diferença entre os períodos de forma pareada. Foi considerado significativo o $p < 0.01$.

A força das distâncias dos casos no t_i com relação ao t_{i-1} foi realizada para identificar se houve diferença na dispersão de um período para outro. Foram observadas diferenças significativas de dispersão espacial entre os casos nos períodos t1 e t2, t3 e t4, t4 e t5, t5 e t6 e t6 e t7 (Fig 9).

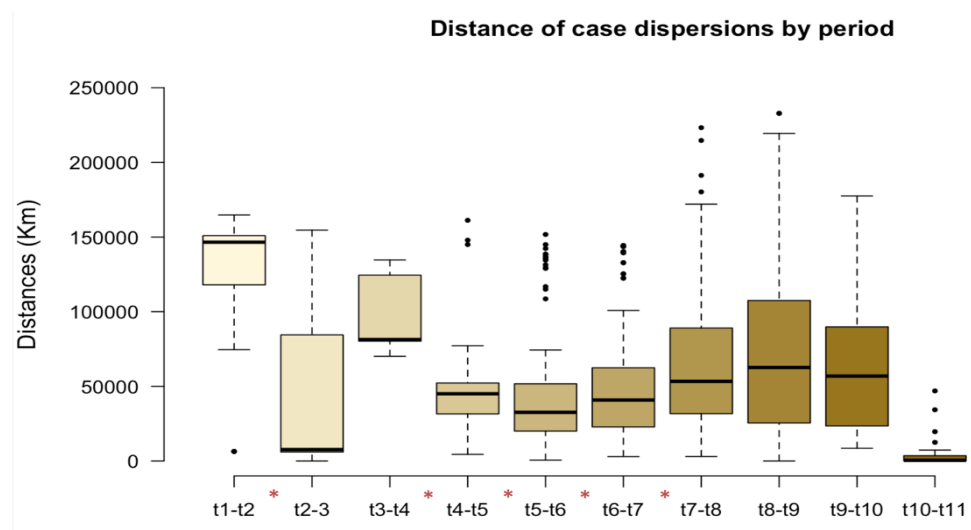


Figura 9: Distancia de dispersão dos casos de raiva por períodos trimestrais.

Legenda. Asteriscos mostram diferença significativa entre os períodos ($p < 0.005$).

Foi considerado significativo ($p < 0.01$) o fato de haver casos bovinos nas áreas dos abrigos de machos e maternidades e não haver casos em abrigos de digestório e vazios.

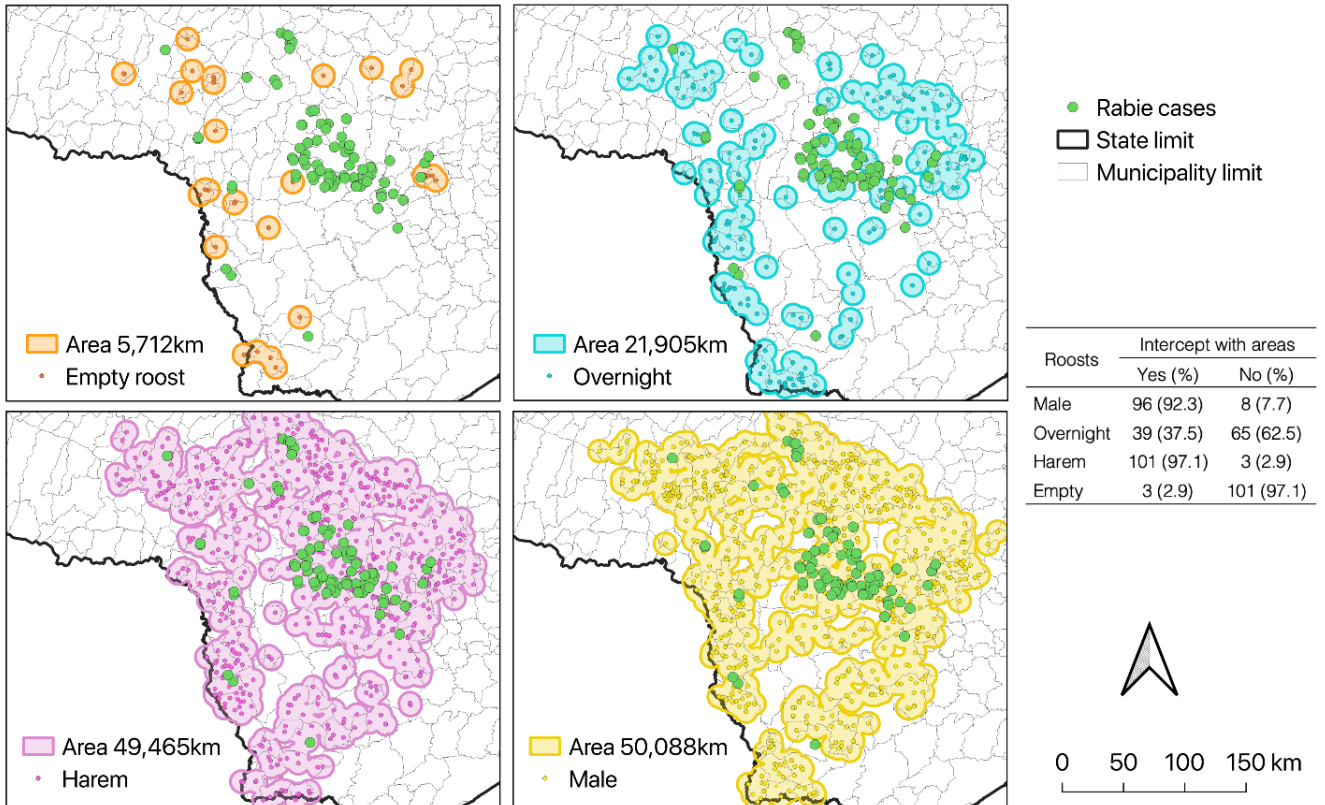


Figura 10: Relação dos tipos de abrigos encontrados na região estudada com os casos de raiva em bovinos.

A figura 11 exemplifica a presença dos abrigos em relação as principais rodovias na região de Botucatu como Marechal Rondon, Castelo Branco, João Hipólito Martins e João Melão.

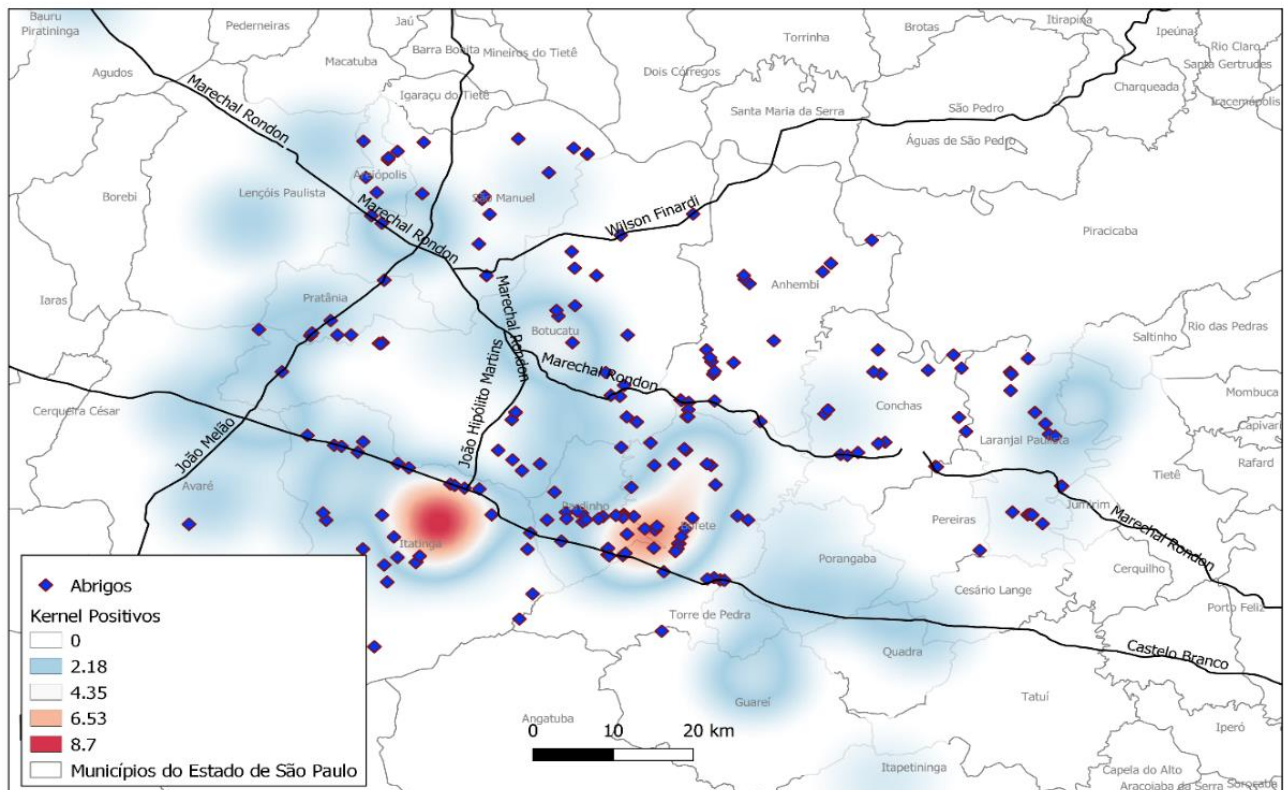


Figura 11: Densidade dos casos de raiva em bovinos comparado com as colônias mapeadas no EDA de Botucatu, onde correspondeu o maior número de casos e as suas principais rodovias.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (IBGE) disponibiliza online os dados de rebanhos de cada município. A tabela 3 mostra os dados de rebanhos nas cidades em que houve casos positivos, no período do estudo (2015-2018).

No presente trabalho, 104 fichas epidemiológicas de bovinos positivos foram analisadas, preenchidas por médicos veterinários autônomos, proprietários dos animais ou funcionários das propriedades que trouxeram o material cerebral para diagnóstico. Na análise, 47 (45,19%) requisições haviam informações sobre contato direto com os animais doentes, no total de 84 pessoas, 24 (23,08%) requisições haviam marcado não ter contato, 30 (28,85%) não haviam informações e 3 (2,88%) não foi localizada essa informação.

Tabela 6. Dados de rebanhos de bovinos dos municípios em que houve animais positivos para raiva no período de 2015 a 2018, de acordo com o IBGE. Botucatu, SP, 2019.

REBANHO DE BOVINOS/ANOS				
CIDADE	2015	2016	2017	2018
AGUDOS	40307	42151	46237	44965
AREALVA	14124	12500	12711	12410
AREIÓPOLIS	200	320	335	390
AVARÉ	45825	50391	49390	46445
BAURU	46887	50922	47577	48949
BOFETE	27440	30180	32075	33100
BOTUCATU	36520	39470	40500	39000
CESÁRIO LANGE	10334	10396	10110	10150
CONCHAS	54500	56000	65000	65530
DOIS CÓRREGOS	12499	14205	14309	12982
ESPÍRITO SANTO DO TURVO	19380	20100	18800	18000
GUAREÍ	42978	46509	44382	43892
ITAPETININGA	68806	70757	66207	71000
ITAPORANGA	34000	37000	37800	35000
ITATINGA	21200	21100	24000	19000
LARANJAL PAULISTA	35500	36000	38000	37599
LENÇÓIS PAULISTA	4524	4662	5245	4840
MARÍLIA	112419	116552	119620	122270
PIRAJU	28849	30140	28395	24742
PARDINHO	17500	17690	17000	15200
PORANGABA	25541	28493	28577	30107
QUADRA	9292	10530	9700	9250
RIBEIRÃO BRANCO	15798	15107	13926	13659
SANTA CRUZ DO RIO PARDO	48988	48600	48800	46500
SÃO MANUEL	7425	8670	8500	7650
TOTAL	780836	818445	827196	812630

Na tabela 7 são apresentados os resultados da análise filogenética de acordo com os resultados de alinhamento local e com o local de origem do animal diagnosticado de raiva.

Tabela 7. Sequências do gene N do vírus rábico isolado de 45 bovinos estudados, utilizadas na análise filogenética, de acordo com os resultados do alinhamento local (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool, BLASTn*) e com o local de origem do bovino infectado.

n	ID ¹	Município	Tamanho da sequência (pb) ²	Posição gene N (1.424 pb) ³	Primer ⁴	BLASTn			Acesso Genbank
						Identidade (%) ⁵	E value	Cobertura da sequência (%)	
1	127/16	Piraju	674	57-730	P784	100,00	0,0	100	GQ160934.1
2	147/16	Laranjal Paulista	660	80-739	21g	100,00	0,0	100	GQ160951.1
3	152/16	Conchas	655	80-734	21g	100,00	0,0	100	GQ160951.1
4	227/16	Arealva	650	81-730	21g-P784	100,00	0,0	100	GQ160951.1
5	09/17	Conchas	711	79-789	21g	99,86	0,0	100	GQ160951.1
6	116/17	São Manuel	655	80-734	21g	99,85	0,0	100	GQ160951.1
7	160/17	Itatinga	655	80-734	21g	99,69	0,0	100	KX090604.1
8	167/17	Itatinga	683	53-735	21g	99,56	0,0	100	KX090604.1
9	175/17	Itatinga	672	70-741	21g	99,85	0,0	100	GQ160951.1
10	181/17	São Manuel	655	80-734	21g	99,69	0,0	100	GQ160951.1
11	191/17	Bofete	603	80-682	21g	99,83	0,0	100	GQ160951.1
12	195/17	Botucatu	650	80-730	21g-P784	99,69	0,0	100	JF682410.1
13	213/17	Bofete	656	79-734	21g-P784	99,85	0,0	100	GQ160951.1
14	224/17	Pardinho	633	80-712	21g	99,68	0,0	100	JF682410.1
15	225/17	São Manuel	650	80-729	21g-P784	99,85	0,0	100	GQ160951.1
16	235/17	Botucatu	614	76-689	21g	99,84	0,0	100	GQ160951.1

17	243/17	Itatinga	655	80- 734	21g	99,69	0,0	100	JF682410.1
18	321/17	Avaré	651	80- 730	21g- P784	99,85	0,0	100	GQ160951.1
19	324/17	Lençóis Paulista	688	80- 767	P784	99,71	0,0	100	GQ160951.1
20	326/17	Lençóis Paulista	647	80- 726	21g	99,84	0,0	100	GQ160951.1
21	342/17	Pardinho	643	80- 722	21g	99,84	0,0	100	GQ160951.1
22	394/17	Bofete	627	80- 706	21g	99,68	0,0	100	GQ160951.1
23	402/17	Santa Cruz do Rio Pardo	644	79- 722	21g	99,84	0,0	100	JX648444.1
24	438/17	Pratânia	603	80- 682	21g	99,83	0,0	100	GQ160951.1
25	455/17	Botucatu	649	81- 729	21g- P784	99,85	0,0	100	GQ160951.1
26	477/17	Avaré	651	82- 732	21g- P784	99,85	0,0	100	GQ160951.1
27	511/17	Santa Cruz do Rio Pardo	667	75- 741	21g	99,85	0,0	100	JX648444.1
28	538/17	Porangaba	649	82- 730	P784	99,85	0,0	100	GQ160951.1
29	05/18	Avaré	718	74- 791	21g	99,72	0,0	100	GQ160951.1
30	82/18	Itatinga	749	49- 797	21g	99,73	0,0	100	KX090604.1
31	104/18	Porangaba	708	80- 787	21g	99,86	0,0	100	GQ160951.1
32	175/18	Marília	647	82- 728	21g	99,23	0,0	100	KX090585.1
33	336/18	Pardinho	603	80- 682	21g	99,83	0,0	100	GQ160951.1
34	356/18	Bauru	643	80- 722	21g	99,69	0,0	100	JF682410.1
35	400/18	Agudos	655	80- 734	21g- P784	99,69	0,0	100	JF682410.1
36	405/18	Guareí	655	80- 734	21g	99,85	0,0	100	GQ160951.1
37	407/18	Guareí	643	80- 722	21g	99,84	0,0	100	GQ160951.1

38	439/18	Guareí	661	80- 740	21g	99,85	0,0	100	GQ160951.1
39	501/18	Cesário Lange	643	80- 722	21g	99,69	0,0	100	GQ160951.1
40	504/18	Cesário Lange	655	80- 734	21g	99,85	0,0	100	GQ160951.1
41	541/18	Laranjal Paulista	655	79- 733	21g	100,00	0,0	100	GQ160951.1
42	578/18	Itapetininga	655	80- 734	21g	99,69	0,0	100	GQ160951.1
43	581/18	Itatinga	606	80- 685	21g	99,67	0,0	100	GQ160951.1
44	599/18	Avaré	647	79- 725	21g	99,38	0,0	100	GQ160951.1
45	781/18	Espírito Santo do Turvo	654	80- 733	21g	99,54	0,0	100	GQ160951.1
^{*5}	487/18	Itaporanga	608	204- 811*	21g	99,01	0,0	100	AB083808.1

Legenda: ¹ Identificação da amostra, representada pelo número da sequência de recebimento da amostra/dois últimos dígitos do ano de recebimento. ² Tamanho da sequência obtida pelo método Sanger, em pares de base (pb). ³ Sequência completa do gene N depositada no GenBank sob acesso AB685247.1. ⁴ *Primer* utilizado na reação de sequenciamento referida. ⁵ Percentual de identidade obtido com a sequência depositada no GenBank. ⁵ Amostra não será utilizada na análise filogenética pois o tamanho do fragmento é muito diferente do restante das amostras.

Das 45 sequencias de DNA geradas, foram utilizados 120 sequencias de VRab retiradas do Genbank para a construção da árvore filogenética. A árvore gerada (fig. 12) continha amostras de bovinos, equinos, *D. rotundus*, humano, *Pseudalopex vetulus*, *Cerdocyon thous*, Pasteur virus strain (CVS) e Mokola vírus.

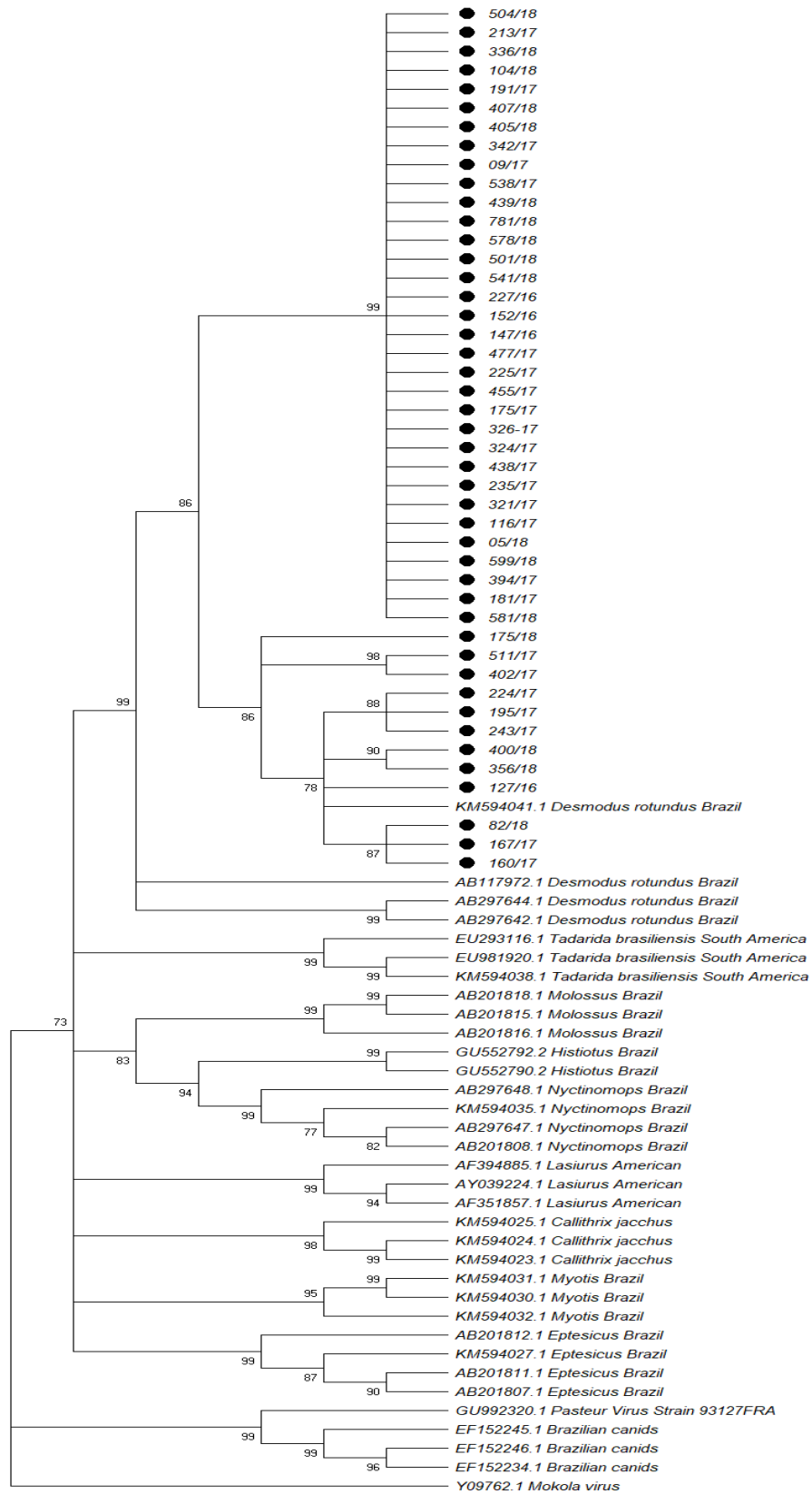


Figura 14. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança contendo 45 sequências de vírus rábico isolados de bovinos estudados (listados na

Tabela 4 e identificados na imagem com o símbolo “ • ”) e 10 diferentes linhagens do vírus rábico (21).

6. Discussão

Embora a grande maioria dos casos de raiva humana seja atribuída a mordidas de cães nos países em desenvolvimento, o vírus da raiva também infecta ao menos 80 espécies, de quatro famílias de quirópteros. Além disso, os morcegos representam uma fonte crescente para a infecção do vírus rábico em humanos e para animais domesticados nas Américas (67), principalmente em bovinos, considerada endêmica em toda a América Latina, gerando prejuízos econômicos e grande impacto na saúde pública.

Devido a ecologia do *Desmodus rotundus*, que apresenta grande capacidade adaptativa, principalmente nas mudanças de habitat e interação social entre os indivíduos, estes são fatores de extrema importância na transmissão e dispersão do vírus da raiva por meio destes indivíduos (82).

De acordo com o manual técnico de Controle da Raiva em Herbívoros, elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 2005, o controle da raiva se baseia na vigilância epidemiológica, vacinação dos herbívoros, controle seletivo direto e indireto de colônias de morcegos hematófagos e educação em saúde (56).

Interações diárias, sempre frequentes entre as colônias, incluindo cuidados sociais e compartilhamento de refeições, permite a rápida dispersão do vírus da raiva para uma população, a partir de um único indivíduo infectado, assim implementou-se o uso do controle seletivo (77), que se concentra no abate dos morcegos hematófagos, geralmente pela aplicação de venenos anticoagulantes ('vampiricida') transmitidos e ingeridos por meio desses cuidados sociais para outros indivíduos da colônia (115), reduzindo o tamanho da população hospedeira, diminuindo a transmissão viral para prevenir a raiva em humanos e animais (67).

O método seletivo direto baseia-se na captura de *D. rotundus* junto a sua fonte de alimentação realizada por técnicos dos serviços oficiais, aplicação tópica do vampiricida em seu dorso, ingerida durante o hábito de autolimpeza desses quirópteros, provocando hemorragias internas, que culmina com sua morte. Já o

método seletivo indireto não há necessidade da captura dos morcegos hematófagos, consiste na aplicação tópica da pasta vampiricida ao redor das mordeduras recentes em animais atacados, como bovinos e equinos (56). Ambos os métodos culminam, na maioria das vezes, com a morte de mais de um indivíduo na colônia, devido ao hábito de limpeza social que possuem (83).

Na América Latina, os bovinos constituem a principal fonte de alimento para os morcegos hematófagos. Fatores como o desenvolvimento da pecuária, que leva ao aumento de rebanhos, possivelmente colaborou com o aumento da densidade populacional de *D. rotundus*. Apesar de décadas de eliminação em muitos países latinos, os casos de raiva continuam ocorrendo no gado, sugerindo que os métodos utilizados para controle de *D. rotundus* são insuficientes no controle, até aumentando a disseminação do vírus da raiva, principalmente pelo aspecto da ecologia do morcego hematófago (67).

Vários autores demonstraram riscos potenciais associados à prática de eliminação, pois colônias de morcegos que foram eliminadas historicamente estão frequentemente associadas a uma maior soroprevalência para raiva. Como o vampiricida mata uma proporção maior de morcegos hematófagos adultos, que são mais propensos aos cuidados sociais do que os jovens, a eliminação pode realmente elevar a transmissão da raiva por meio da substituição de indivíduos mais velhos, com maior imunidade devido a exposições repetidas, por jovens suscetíveis, que podem adquirir e transmitir novas infecções mais facilmente (115), como recolonização por colônias próximas, ou aumento da sobrevivência de jovens, aumentando a população de morcegos suscetíveis (67,85,116).

Essa dinâmica induzida artificialmente pode estar associada à dispersão do vírus (11) e a eliminação pode ter o efeito oposto pretendido, principalmente na transmissão do vírus (116) uma vez que, a incidência da raiva no gado sugere que a raiva do morcego hematófago é mantida como uma epizootia de migração lenta, onde o vírus se espalha de colônia para colônia pela tendência de visitar colônias próximas (67,117).

No Peru, foi realizada uma simulação experimental de possíveis práticas de eliminadas para examinar o impacto na soroprevalência e na taxa de exposição esperada ao gado, indicou que a persistência da raiva entre colônias de *D. rotundus* depende da migração de indivíduos infectados das colônias vizinhas e de frequentes exposições imunizantes, mas não letais. A probabilidade de desenvolver uma infecção

letal após exposição à raiva é bastante baixa para morcegos hematófagos ($\pm 10\%$), permitindo a persistência viral de forma lenta (116).

Na América do Norte e alguns países da Europa, a vacinação de animais silvestres ajudou a diminuir o número de casos de raiva em raposas e guaxinins, porém para algumas espécies de silvestres, como os quirópteros, essa vacinação é logisticamente difícil. Houve avanços recentes no desenvolvimento de vacinas orais, Brook, et al. (115) desenvolveram uma vacina contra raiva, que são difundidas e ingeridas pelo mesmo mecanismo orotopical que o vampiricida, que se espalha entre hospedeiros não vacinados pelos contatos naturais, exigindo apenas uma pequena população a ser vacinada diretamente (115).

Geralmente, os ataques de morcegos hematófagos dependem da diversidade e dinâmica do ambiente em que estão inseridos (64). Nesse contexto, alguns fatores topográficos e geográficos estão associados a ataques de morcegos hematófagos em bovinos, como padrões de migração de surtos por infecção do vírus da raiva (117,118).

Alguns estudos utilizam dados para caracterizar o ambiente em receptividade e vulnerabilidade em albergar populações de *D. rotundus* e fatores facilitadores para difusão da doença para novas áreas. Entende-se por receptividade como a relação de um conjunto de variáveis que permitem a capacidade do ecossistema em albergar o morcego hematófago em novas áreas como a presença de bovinos, tipo de criação (intensivo ou extensivo), tipo de terreno, declividade, ocorrência de matas permanentes, localização de abrigos naturais e artificiais permanentes ou temporários. Já vulnerabilidade é a inter-relação do conjunto de variáveis relacionadas a capacidade de ingresso do *D. rotundus* em determinada área de circulação viral, como construções de usinas, ferrovias, estradas, novas áreas de pastagem, que levam ao desmatamento, retirada abrupta da fonte de alimento desses morcegos, e qualquer outra alteração ambiental (74).

Outro fator que pode ser importante são os abrigos artificiais, que no presente estudo correspondeu a 85,19% dos abrigos mapeados na região estudada. A proximidade das propriedades com rodovias e outras estradas também é um fator facilitador para a formação desses abrigos, favorecendo assim, o aumento das colônias. Destes, casas abandonadas correspondem a 32,13% e bueiros a 20,22% dos abrigos artificiais e nos abrigos naturais a maior porcentagem foi nas grutas, como

10,82% e nos ocos de árvores com 1,54%. O que sugere o dinamismo do *D. rotundus* em escolher abrigos que fiquem próximos a sua fonte alimentar.

Diferente do encontrado por Dias, et al., (74) no Vale do Rio Paraíba, representados por 2 EDAS (Guaratinguetá e Pindamonhangaba), onde o total de abrigos naturais (68,8%) correspondeu a maioria encontrado. Em outro estudo realizado no Vale do Paraíba (85) em 2017, assim como os nossos achados, os tipos de abrigos mais frequentes foram casas abandonadas, cavernas, bueiros e túneis. Ao comparar esses tipos de abrigos, foram observadas médias mais baixas de surtos nas áreas associadas a túneis e pontes.

Dados da Coordenadoria do estado de São Paulo, mostram que nos últimos cinco anos foram realizadas 18.783 fiscalizações em abrigos artificiais (pontes, tubulações de rodovia, bueiros, casas e poços abandonados) e 2.540 fiscalizações em abrigos naturais (tocas, grutas, túneis, minas e ocos de árvores), totalizando 4.799 capturas, onde 37.772 espécimes de *D. rotundus* foram capturadas e tratadas com pasta vampiricida e devolvidas à natureza (119).

Os nossos dados, corroboram com Andrade, et al. (64), na região da Amazônia, onde a maior densidade de casos de bovinos foi próxima a rodovias e também a estudos na Argentina, em que mais da metade dos abrigos eram em celeiros, casas abandonadas, poços, pontes e outras estruturas artificiais, ilustrando que os morcegos hematófagos podem habitar áreas que não possuem ninhos naturais se as presas forem encontradas de forma mais acessível (70). De acordo com Orlando, et al., (118), em análise de risco sobre ataques de morcegos hematófagos em bovinos, revelou que os currais e piquetes mais afastados das áreas habitadas por humanos, apresentam o maior risco, seguido de densidade de árvores maior que 30 árvores por hectare.

A estrutura social dos abrigos influencia também na dinâmica da transmissão da raiva e no método de controle seletivo das colônias, onde envolve grupos de fêmeas com filhotes e poucos machos adultos dominantes conhecidos como haréns ou maternidade, grupos de machos chamados de solteiros e abrigos intermediários, que são usados como digestórios (overnight). As fêmeas podem permanecer no mesmo abrigo por muitos anos, comportamento conhecido como filopatria e há maior dispersão nos machos que podem visitar outros abrigos (82,85), e promove a comunicação indireta entre quase todas as colônias dentro de uma área, formando uma rede (120).

A classificação dos abrigos relacionados aos nove EDAS se divide em abrigos maternidade/harém, machos, digestórios e vazios. A localização dos abrigos maternidade e machos foram mais associados ($p < 0,001$) aos casos de raiva positivos em relação aos abrigos vazios e digestórios. Pode-se sugerir que as colônias definitivas estão em áreas próximas a fonte de alimento, no caso, os bovinos. Indica também a predileção dos morcegos em escolherem abrigos definitivos artificiais devido à proximidade do seu raio de voo com a fonte alimentar, uma vez que necessita de uma demanda energética menor para buscar o alimento, como descrito por Rocha, et al. (86), que também relatam que os indivíduos de *D. rotundus* buscam abrigos que tenham altitude igual ou superior aos lugares de alimentação, devido a ajuda da gravidade e economia de energia, pois eles podem ficar sem se alimentar por algum período.

Além disso, 92% dos abrigos de machos estão no raio de voo de 10 km ao redor dos abrigos e também estão estatisticamente relacionados aos casos de raiva em bovinos. O mesmo acontece com os abrigos classificados como maternidade/harém, onde 97,1% estão relacionados aos casos de raiva. Com o mapa dos buffers (fig. 10), pode-se indicar a sobreposição das colônias machos e maternidade, que como já descrito, é que os abrigos dos machos são definidos pela proximidade com os abrigos das fêmeas (121).

Em um estudo realizado no Vale do Paraíba (85), no estado de São Paulo, foi feita a construção de rede de contato dos abrigos de *D. rotundus* e fazendas, para explorar a disseminação e manutenção do vírus rábico na região. Dos 260 abrigos na área de estudo, 115 (44,2%) foram registrados como harém, 60 (23,1%) como solteiro, 56 (21,5%) como digestório e 29 abrigos como vazios (11,2%). Os abrigos do tipo harém e overnight mostraram maior número de surtos registrados (85) diferente dos dados encontrados na região aqui estudada, em que os abrigos digestórios não foram estatisticamente relevantes para os casos de raiva na região, mesmo este representando um total de 9,34% dos abrigos encontrados, o que pode sugerir que os abrigos considerados definitivos estão próximos da fonte alimentar e não há necessidade de abrigos digestórios.

Como descrito por vários autores (74,75,85), os morcegos hematófagos podem voar de 1 a 2 quilômetros até 10 quilômetros para se alimentar. Essa distância é determinada pelo número de indivíduos nos abrigos, podendo variar para evitar competições entre indivíduos das colônias (85)

Foram observadas diferenças significativas de dispersão espacial entre os casos nos períodos entre 2016 e 2017, sugerindo que o vírus tenha migrado de uma região para outra. Uma possível causa dessa dispersão pode ser devido a retirada/introdução de rebanhos bovinos nas regiões em que houve a diferença estatística significativa (67,75). Alguns autores sugerem que surtos de raiva em *D. rotundus* se movem lentamente a uma taxa média de 40 km por ano (77,117).

Como observado por meio dos dados de rebanho fornecidos pelo site do IBGE, pode-se sugerir, avaliando a área estudada que, nos anos em que houve o aumento do número de casos positivos para raiva, os dados denotam que há uma movimentação na quantidade de bovinos afetados, com o aumento de 4,60% do rebanho de 2015 para 2016, 1,06% de 2016 para 2017, concomitantemente, nesse período houve um aumento do número de casos de raiva .

Quando avaliamos alguns municípios individualmente, esses números são mais fatíveis. No município de Arealva, aconteceu uma alteração repentina do rebanho entre 2015-2016 com retirada de 1624 (11,50%) do rebanho de bovinos, que pode ser um indicativo de difusão da doença para novas áreas devido a retirada abrupta da fonte alimentar desses morcegos como confirmado no gráfico de dispersão dos casos positivos.

Outro exemplo, ainda mais ressonante, se refere à movimentação de bovinos na cidade de Itatinga. Há registros de aumento de 2900 (12,08%) bovinos no ano de 2017 em relação a 2016, em que esse aumento da oferta de alimentos pode ter levado ao aumento na densidade populacional dos quirópteros e após, em 2018, houve uma retirada abrupta de 5000 (20,83%) animais, fonte alimentar dos quirópteros ali instalados, fator mais do que sugestivo do aumento do número de casos de raiva (surto) nesse ano em várias regiões (74,120).

De acordo com a análise de risco feita por Braga, et al. (75), coletando dados de municípios de 25 estados brasileiros, o município de Botucatu foi considerado como área de alto risco para raiva, e a região de Botucatu foi considerada de médio a alto risco.

Várias mudanças ambientais podem estar relacionadas ao aumento da densidade populacional do morcego hematófago. Houve um intenso reflorestamento de áreas, e esse aumento na cobertura florestal e conseqüente redução de pastagens não foram seguidos por reduções no número de bovinos. Pelo contrário, a densidade de animais aumentou durante o mesmo período. A concentração de bovinos em

pequenos fragmentos densos e dispersos pode, portanto, afetar a dispersão de *D. rotundus*, aumentando assim a dinâmica e conexão entre as colônias e da população, fator que pode ter favorecido, mais recentemente, o ressurgimento da infecção por vírus rábico em bovinos no Uruguai (47).

No México, as maiores perdas econômicas na pecuária estão associadas a raiva transmitida pelo *D. rotundus*. Em uma análise de custo-benefício para avaliar a eficiência econômica do programa de controle da raiva na América Latina, que consiste na vacinação pré-exposição dos bovinos e controle populacional do morcego hematófago, e concluiu-se que o programa de vacinação de bovinos é mais eficiente que um programa de controle de morcegos, que é considerado inclusive, ineficiente. Com base nesse estudo, os benefícios esperados pela vacinação são mais de seis vezes os custos, mesmo considerando os custos de distribuição das vacinas. O controle do *D. rotundus*, no entanto, é altamente improvável que seja eficiente, de acordo com as suposições do estudo. Isso resulta dos altos custos associados ao programa, bem como os benefícios incertos que ele oferece (48).

Além disso, a investigação da raiva transmitida por morcegos é importante para identificar a presença de circulação viral em determinada região, pois na prática, o controle dessa zoonose depende da identificação dos chamados eventos sentinela, ou seja, a primeira morte, que normalmente ocorre em bovinos, após em seres humanos. Por isso, deve haver a atenção dos serviços veterinários para os locais afetados, a fim de minimizar a disseminação da doença nas regiões vizinhas (64,83).

Embora o vírus possa ser geneticamente caracterizado utilizando amostras de morcegos hematófagos, a taxa de achados positivos da raiva nesses animais e em morcegos não hematófagos no Estado de São Paulo é baixa. A caracterização genética de amostras de RABV isoladas de bovinos pode fornecer informações importantes sobre possíveis diferenças nas linhagens genéticas do vírus que circulam nas populações de *Desmodus rotundus*. Essas diferenças são o resultado de mutações que ocorrem aleatoriamente em diferentes regiões geográficas e ao longo do tempo (122).

Apesar de ser responsável por 10, dos 11 casos de raiva em humanos no Brasil em 2018, o vírus transmitido por morcego hematófago, a taxa de achados positivos da raiva nesses animais no Estado de São Paulo é baixa, segundo dados do Ministério da Saúde, nos anos de 2016-2018 no estado de São Paulo, um total de 11 morcegos hematófagos foram diagnosticados como positivos para raiva,

desproporcionalmente relacionado aos casos de raiva em bovinos, que diferem em número de notificações no Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, com 263 e 284 casos respectivamente (22,59).

De acordo com pesquisa realizada na região de Botucatu para avaliar a situação epidemiológica por meio da vigilância passiva da infecção pelo Vrab em quirópteros no período de 2003 a 2018, realizada no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses (SDZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu. Um total de 4.271 quirópteros foram encaminhados para diagnóstico, 57 foram positivos e apenas 2 (3,5%) eram *Desmodus rotundus* (123).

A caracterização genética de amostras de RABV isoladas de bovinos pode fornecer informações importantes sobre possíveis diferenças nas linhagens genéticas do vírus que circulam nas populações de *Desmodus rotundus*. Essas diferenças são o resultado de mutações que ocorrem aleatoriamente em diferentes regiões geográficas e ao longo do tempo (122).

Para se conhecer a diversidade genética do Vrab que circula nos morcegos *Desmodus rotundus* e bovinos, no presente estudo, foi analisado as sequências da região codificadora do gene N de isolados de bovinos positivos no estado de SP e comparados a sequências disponíveis no GenBank. Foi apresentado grau de similaridade entre 99,38% a 100%, que foram representados pela árvore filogenética (Fig. 12), que foi gerada com as 45 sequências correspondentes ao gene N de isolados de bovinos positivos para raiva e sequências de amostras positivas de herbívoros, humanos e *Desmodus rotundus* obtidas no Genbank de vários estados do Brasil e países da América Latina.

As linhagens segregaram-se em dois grupos, e pode-se observar a formação de subclusters, o que pode sugerir uma distância genética e uma possível regionalização do vírus. A maioria das sequências analisadas no nosso estudo (33/45), se agruparam com sequências já conhecidas de herbívoros e *D. rotundus* de São Paulo e Minas Gerais, mostrando a mesma origem genética, pois estão no mesmo subcluster.

Do total, 12 amostras (12/45) se agruparam separadamente, onde houve a formação de 4 importantes subclusters. Essa variedade genética e adaptação viral na região foi sugestiva, podendo ocorrer devido a vários fatores como a ecologia do *Desmodus rotundus*, diferença de tempo entre os surtos, mudanças ambientais.

Os 4 subclusters formados na árvore filogenética, representado na fig. 12, mostram o subcluster 1 em que as sequencias representadas são de municípios limítrofes, Itatinga, Pardinho e Botucatu. O subcluster 2 são compostos por dois municípios limítrofes, Agudos e Bauru, que são de uma região próxima a do primeiro subcluster. No subcluster 3, 3 amostras agrupadas eram de um único município, Itatinga, porém se diferenciou das sequencias obtidas. O subcluster 4 são amostras do município de Santa Cruz do Rio Pardo, que corresponde a uma terceira região estudada. Como só houve uma sequência de cada município em alguns sub-clusters sugere-se a necessidade de obtenção de novas amostras dessas cidades para sequenciamento e análise filogenética para confirmar a regionalização viral.

Na figura 13, a árvore filogenética mostra que as amostras de bovinos estudadas agrupadas somente com amostras de vírus rábico na linhagem de *Desmodus rotundus*.

O que se pode notar em relação as duas árvores filonegéticas geradas no presente estudo que, tanto na árvore correspondente às linhagens do vírus quanto na árvore de sequências de diferentes localidades e hospedeiros, houve a formação dos mesmos subclusters, reforçando a hipótese de que é provável uma diversidade genética nessas amostras do VRab.

Em um estudo filogenético utilizando amostras de um surto de raiva bovinos no Rio Grande do Sul, ocorrido entre 2012-2016, foi observado dois grupos distintos (76). Sub-clusters correspondentes a anos diferentes puderam ser identificados, indicando a evolução e / ou a introdução de novos vírus na população. Em alguns casos, vírus do mesmo local, obtidos em um curto período, foram agrupados em diferentes sub-clusters, sugerindo a co-circulação do vírus de diferentes origens. O mesmo resultado também foi encontrado no mesmo estado, com amostras colhidas entre 2012-2015 (76,98).

Diferente dos achados de Itou et al., (124) que analisaram um surto na cidade de Nova Roma do Sul, no estado do Rio Grande do Sul, abrangendo um total de 19 fazendas de gado entre fevereiro e março de 2009 e terminou espontaneamente. A análise do gene N e da região G-L revelou que tinham sequências nucleotídicas e aminoácidos quase idênticas. Em Santa Catarina, em estudo filogenético, foi encontrado apenas a circulação de uma sub-linhagem, que se difere das linhagens encontradas nos estudos anteriores no Rio Grande do Sul (98).

Em análises de amostras de SNC oriundas de algumas cidades de São Paulo e Minas Gerais entre 2007 e 2008, as sequências de aminoácidos das proteínas N revelaram a existência de marcadores genéticos que podem indicar possíveis variações relacionadas às regiões geográficas. Porém, Garcia et al, (73) compararam isolados de vírus da raiva em São Paulo e Minas Gerais e observaram que são mais geneticamente relacionados em comparação com sequências de outras regiões geográficas. A análise filogenética sugeriu que os casos de Minas Gerais (2000-2009) provavelmente têm a mesma origem genética com a epizootia de São Paulo (1997-2002). Uma sobreposição cronológica e espacial de subpopulações virais foi observada principalmente na área epidêmica de São Paulo e pode estar relacionada à migração de colônias de morcegos nas fronteiras do estado com Minas Gerais (73).

Em outros países da América Latina, como no Peru, a mortalidade por raiva em gado se repete por muitos anos em regiões geográficas, e estudos filogenéticos revelaram existir linhagens virais de circulação independente (67).

No Equador, o sistema de vigilância OIE WAHIS (Sistema Mundial de Informação em Saúde Animal 2017) informou uma média de 46 surtos de raiva bovina por ano no período 2014-2017, em que este, é parte importante da produção agrícola no país, assim como no Brasil, que apresenta o maior rebanho do mundo, e o estado de São Paulo que respondeu por 11,58% do valor da produção em 2018. Destacando-se a produção de bovinos que foi de 8 bilhões de reais.

Em um estudo realizado por Benavides, et al. (11), avaliando o impacto da estimativa de subnotificações de mortes por raiva em animais de interesse zootécnico no Peru, a mortalidade de bovinos foi mais de quatro vezes superior ao custo implícito nos relatórios oficiais. A renda média mensal em algumas áreas do estudo em 2014 era de 243 dólares, e estão entre as regiões mais pobres do país. Assim, a perda de uma única vaca (241 dólares) é equivalente a aproximadamente um mês de renda, sendo que 61% dos agricultores utilizavam a renda, com a venda de vacas para manutenção da casa e 30% para a educação infantil. Portanto, essas perdas, embora modestas, podem reforçar a pobreza entre os pequenos agricultores da região andina que dependem do gado para subsistência (11).

Como a transmissão da raiva entre bovinos é extremamente rara, quase todos esses casos são transmitidos por outras espécies, e estudos epidemiológicos moleculares indicam a transmissão de morcegos hematófagos na grande maioria. Porém, o contato entre seres humanos e animais de produção, como bovinos e

equinos é próximo, principalmente em profissões consideradas de risco para a raiva, como os trabalhadores rurais, pecuaristas e médicos veterinários. No Brasil, há o relato de 3 mortes de raiva em humanos devido a contato com bovinos positivos para raiva, sendo um desses casos, de médico veterinário que em atendimento, entrou em contato com saliva e fluidos (125).

No presente trabalho, 104 fichas epidemiológicas foram avaliadas, 47 (45,19%) requisições haviam informações sobre contato direto com os animais doentes, no total de 84 pessoas, o que denota o alto risco dessa população em contrair a zoonose e como esse contato pode ser um sério problema de saúde pública.

Como parte de uma pesquisa na região Centro-oeste do estado de São Paulo, foi feita avaliação de dados epidemiológicos das fichas de recebimento de quirópteros positivos, destes, 25,0% dos casos, houve contato ou possível contato com animais de estimação, tanto cães, quanto gatos. Na exposição direta de quirópteros com humanos, os casos caracterizados como agressões apresentaram 8,8%, e as espécies envolvidas foram *Artibeus lituratus*, *Miotis nigricans* e *D. rotundus*. Quatro desses casos de agressões foram mordidas ou arranhões nas mãos (123), demonstrando também a importância de dados epidemiológicos para tomada de decisão para o tratamento PPE.

Os dados epidemiológicos são muito importantes para que a PPE seja feita de forma correta e eficiente. Nos últimos dez anos, a quantidade de tratamento pós-exposição para raiva administrado dobrou. Enquanto isso, o tipo e a gravidade da exposição ao vírus da raiva foram superestimados pelas autoridades de saúde brasileiras, resultando em um aumento de tratamentos, independentemente de sua necessidade. Como demonstrado no estado do Ceará, que de 2007 a 2015, foram registrados 231.694 incidentes envolvendo a potencial transmissão de raiva, desse total, havia 222.036 (95,8%) procedimentos inadequados, divergindo do tratamento profilático antirrábico recomendado pelo Ministério da Saúde (126).

Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2012 a 2016 houve um total de 1795 mil exposições de risco relacionadas a herbívoros, que mostra a importância econômica e de saúde pública em relação aos animais de interesse zootécnico.

Em estudos realizados na Argentina, foi sugerido que vacinação de todos os bovinos seria 1,7 vezes mais benéfica do que a atual cobertura vacinal e 5 vezes mais benéfica do que a não vacinação de bovinos devido ao aumento esperado na

mortalidade dos animais por raiva, por isso sugeriu-se novos investimentos em vacinação de gado. No entanto, a vacinação da população remanescente de gado pode ser um desafio, do que alcançar a cobertura atual, especialmente se esses animais pertencerem a agricultores que não consideram a doença uma ameaça (120). Portanto, gera um expressivo impacto econômico não só para os produtores de bovinos, como também a economia e para o governo (48).

No estado de São Paulo, a vacinação para raiva não é de caráter obrigatório, por isso não há dados oficiais sobre o número de animais vacinados na região estudada, mesmo havendo casos da doença em inúmeros municípios do estado. E como sugerido pelo presente estudo, há a dispersão do vírus ocorrendo em várias regiões do estado e que muitas pessoas mantêm contato com animais infectados pelo Vrab.

Por isso, a integralização de áreas “One Health”, para preservar saúde humana, animal e ambiental deve ser bem fundamentada. Campanhas de educação em saúde, vacinação da população suscetível, profissões de risco e animais expostos e conhecimento da ecologia do morcego com base no conhecimento de hábitos de vida e comportamentos alimentares, a fim de minimizar rupturas ecológicas, são as melhores estratégias combinadas para minimizar a carga viral em morcegos hematófagos (118).

7. Conclusão

Baseando-se nos resultados obtidos podemos concluir que no período estudado houve um aumento do número de casos de raiva e que houve a dispersão dos casos positivos para outros municípios, sugerindo que a transmissão do vírus tenha migrado para outras regiões do centro-oeste paulista.

Com a análise do rebanho dos municípios com animais positivos, podemos sugerir que a densidade do rebanho pode ter influenciado no aumento e dispersão dos casos de raiva.

A caracterização dos abrigos em machos e maternidade foi estatisticamente significativa em relação aos casos de raiva na região, sendo que estes abrigos foram os mais relacionados aos casos positivos, do que abrigos noturnos e/ou vazios, o que sugere também que esses morcegos não precisariam de abrigos intermediários, pois

os abrigos definitivos são próximas o suficiente do local de alimentação e o tipo de abrigo artificial foi o mais utilizado por eles, possivelmente devido à proximidade com sua presa, comprovando a capacidade adaptativa da espécie.

Apesar de haver aumento do número de casos de raiva em todo o Estado de São Paulo, a vacinação ainda não é obrigatória, levando a mortalidade de inúmeras cabeças de gado em uma região em que a agropecuária corresponde a 11% da produção do Brasil, além de ser um enorme risco a produtores e profissionais da área de agrárias devido ao contato direto com os animais infectados, levando a um sério problema de saúde pública, como foi citado neste estudo, em que um total de 84 pessoas tiveram contato direto com os animais doentes.

É necessário que haja melhorias no sistema de vigilância, pois a caracterização dos abrigos e ecologia do morcego deve ser observados, pois como sugerido por diversos autores, se a prática de controle seletivo das colônias não for bem planejada, pode haver a dispersão do vírus da raiva.

Devido aos achados sugestivos na análise filogenética, novos estudos com um número maior de amostras das regiões onde houveram a formação de sub-clusters para melhor entendimento da biologia do Vrab e suas interações com o hospedeiro *D.rotundus*. É provável que diferentes colônias de *D. rotundus* podem ter levado à adaptação do vírus.

Assim, as informações fornecidas neste estudo podem ajudar a entender a dinâmica da raiva nos bovinos e analisar a característica do vírus presente na região como: medidas rigorosas de controle devem ser estabelecidas pelas autoridades competentes, e revisão da política atual de vacinação da raiva em herbívoros, que não é obrigatória, mesmo em áreas endêmicas, investir na vigilância epidemiológica da raiva em herbívoros e morcegos hematófagos, avaliar a política sobre controle seletivo dos quirópteros hematófagos e atividades de educação em saúde;

Por fim, o conceito “one health” deve ser o pilar fundamental para integralização dos serviços de saúde humana, animal e ambiental para controlar casos de raiva.

8. Referências

1. Badrane H. Host Switching in Lyssavirus History from the Chiroptera to the

- Carnivora Orders Hassan Badrane and Noël Tordo Host Switching in Lyssavirus History from the Chiroptera to the Carnivora Orders. 2001;75(17):8096–104.
2. Peres NF. Profilaxia e controle da raiva dos herbívoros domésticos no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, no período 1997 - 2007. 2008;179. Available from: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/.../Nilton_Fidalgo_Peres.pdf
 3. Fooks AR, Banyard AC, Horton DL, Johnson N, McElhinney LM, Jackson AC. Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet* [Internet]. 2014;384(9951):1389–99. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62707-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62707-5)
 4. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7).
 5. Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, et al. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):1–20.
 6. WHO D of control of neglected tropical diseasesHealth O. Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-mediated Rabies by 2030. In: *Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-mediated Rabies by 2030* [Internet]. Geneva; 2019. p. 30. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/328053/WHO-CDS-NTD-NZD-2019.04-eng.pdf?ua=1>
 7. Anderson A, Shwiff SA. The Cost of Canine Rabies on Four Continents. *Transbound Emerg Dis*. 2015;62(4):446–52.
 8. Lavan RP, King AIMG, Sutton DJ, Tunceli K. Rationale and support for a One Health program for canine vaccination as the most cost-effective means of controlling zoonotic rabies in endemic settings. *Vaccine* [Internet]. 2017;35(13):1668–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.014>
 9. World Health Organization W. Rabies [Internet]. 29 set 2019. [cited 2020 Mar 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>
 10. Rupprecht C, Kuzmin I, Meslin F. Lyssaviruses and rabies: Current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Research*.

- 2017;6(0):1–22.
11. Benavides JA, Rojas Paniagua E, Hampson K, Valderrama W, Streicker DG. Quantifying the burden of vampire bat rabies in Peruvian livestock. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(12):1–17.
 12. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Res*. 1986;14(6):2671–83.
 13. Taxonomy IV. Genus: Lyssavirus [Internet]. [cited 2019 Oct 30]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus
 14. Fooks AR, Cliquet F, Finke S, Freuling C, Hemachudha T, Mani RS, et al. Rabies. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3.
 15. Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, Carolyn L, Wunner WH, Larson JK. The Molecular Biology of Rabies Viruses Source : Reviews of Infectious Diseases , Vol . 10 , Supplement 4 . Research towards Rabies Published by : Oxford University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4454733> Accessed : 07-07-2016 16 : 17 UTC. 1988;10.
 16. Marston DA, Ellis RJ, Wise EL, Aréchiga-Ceballos N, Freuling CM, Banyard AC, et al. Complete genome sequence of lleida bat lyssavirus. *Genome Announc*. 2017;5(2):4–5.
 17. Gunawardena PS, Marston DA, Ellis RJ, Wise EL, Karawita AC, Breed AC, et al. Lyssavirus in Indian flying Foxes, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(8):1456–9.
 18. Shipley R, Wright E, Selden D, Wu G, Aegerter J, Fooks AR, et al. Bats and viruses: Emergence of novel lyssaviruses and association of bats with viral zoonoses in the EU. *Trop Med Infect Dis*. 2019;4(1):1–22.
 19. Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EMS, Aguiar EAC, Silva LHQ, Sodr e MM, et al. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44(2):91–5.
 20. Oliveira R de N, de Souza SP, Lobo RSV, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli P, et al. Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology* [Internet]. 2010;405(2):352–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.030>

21. Menozzi BD, de Novaes Oliveira R, Paiz LM, Richini-Pereira VB, Langoni H. Antigenic and genotypic characterization of rabies virus isolated from bats (Mammalia: Chiroptera) from municipalities in São Paulo State, Southeastern Brazil. *Arch Virol*. 2017;162(5):1201–9.
22. Brasil M da AP e A. No Title [Internet]. Situação epidemiológica da raiva. 2019. Available from: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva#epidemiologia>
23. Taylor LH, Knopf L. Surveillance of Human Rabies by National Authorities - A Global Survey. *Zoonoses Public Health*. 2015;62(7):543–52.
24. Brookes VJ, Gill GS, Singh CK, Sandhu BS, Dhand NK, Singh BB, et al. Exploring animal rabies endemicity to inform control programmes in Punjab, India. *Zoonoses Public Health*. 2018;65(1):e54–65.
25. Ma J, Li S, Yang Y, Wang Q, Huo Y. Epidemiological and phylogenetic analysis of rabies virus isolated from humans in Henan province, China. *Arch Virol* [Internet]. 2019;164(11):2811–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04388-6>
26. Zhou H, Vong S, Liu K, Li Y, Mu D, Wang L, et al. Human Rabies in China, 1960-2014: A Descriptive Epidemiological Study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):1–12.
27. Yang GJ, Liu L, Zhu HR, Griffiths SM, Tanner M, Bergquist R, et al. China's sustained drive to eliminate neglected tropical diseases. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(9):881–92.
28. Wangmo K, Laven R, Cliquet F, Wasniewski M, Yang A. Comparison of antibody titres between intradermal and intramuscular rabies vaccination using inactivated vaccine in cattle in Bhutan. *PLoS One*. 2019;14(6):1–14.
29. Broban A, Tejiokem MC, Tiembré I, Druelles S, L'Azou M. Bolstering human rabies surveillance in Africa is crucial to eliminating canine-mediated rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(9):1–7.
30. Lembo T, Hampson K, Kaare MT, Ernest E, Knobel D, Kazwala RR, et al. The feasibility of canine rabies elimination in Africa: Dispelling doubts with data. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(2).
31. Bengoumi M, Mansouri R, Ghram B, Mérot J. La rage dans les pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient : situation actuelle et perspectives. *Rev Sci Tech*. 2018;37(2):497–510.
32. Jibat T, Mourits MCM, Hogeveen H. Incidence and economic impact of rabies

- in the cattle population of Ethiopia. *Prev Vet Med* [Internet]. 2016;130:67–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.06.005>
33. Hampson K, Dobson A, Kaare M, Dushoff J, Magoto M, Sindoya E, et al. Rabies exposures, post-exposure prophylaxis and deaths in a region of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(11).
 34. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;1789–858.
 35. Robardet, Bosnjak, Englund, Demetriou, Martín, Cliquet. Zero Endemic Cases of Wildlife Rabies (Classical Rabies Virus, RABV) in the European Union by 2020: An Achievable Goal. *Trop Med Infect Dis*. 2019;4(4):124.
 36. Müller TF, Schröder R, Wysocki P, Mettenleiter TC, Freuling CM. Spatio-temporal use of oral rabies vaccines in fox rabies elimination programmes in Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):1–16.
 37. Müller FT, Freuling CM. Rabies control in Europe: an overview of past, current and future strategies. *Rev Sci Tech*. 2018;37(2):409–19.
 38. Allocati N, Petrucci AG, Di Giovanni P, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discov* [Internet]. 2016;2(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.48>
 39. Xiaoyue Ma, Ben P. Monroe, Julie M. Cleaton, Lillian A. Orciari, Yu Li, Jordana D. Kirby, Richard B. Chipman, Brett W. Petersen, Ryan M. Wallace JDB. Rabies surveillance in the United States during 2017. 2019;1555–68.
 40. Wallace RM, Gilbert A, Slate D, Chipman R, Singh A, Wedd C, et al. Right place, wrong species: A 20-year review of rabies virus cross species transmission among terrestrial mammals in the United States. *PLoS One*. 2014;9(10).
 41. Middleton D, Friedman L, Johnson S, Buchan S, Warshawsky B. Human rabies postexposure prophylaxis and rabid terrestrial animals in Ontario, Canada: 2014–2016. *Canada Commun Dis Rep*. 2019;45(7/8):177–82.
 42. Nadin-Davis SA, Fehlner-Gardiner C. Origins of the arctic fox variant rabies viruses responsible for recent cases of the disease in southern Ontario. *PLoS*

- Negl Trop Dis. 2019;13(9):e0007699.
43. Freire de Carvalho M, Vigilato MAN, Pompei JA, Rocha F, Vokaty A, Molina-Flores B, et al. Rabies in the Americas: 1998-2014. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(3):1–16.
 44. Schneider MC, Aguilera XP, da Silva Junior JB, Ault SK, Najera P, Martinez J, et al. Elimination of neglected diseases in Latin America and the Caribbean: A mapping of selected diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(2).
 45. Galhardo JA, De Azevedo CS, Remonti BR, Neres Gonçalves VM, Azevedo Marques NT, Borges LO, et al. Canine rabies in the Brazil-Bolivia border region from 2006 to 2014. *Ann Glob Heal*. 2019;85(1):1–5.
 46. Medeiros R, Jusot V, Houillon G, Rasuli A, Martorelli L, Kataoka AP, et al. Persistence of Rabies Virus-Neutralizing Antibodies after Vaccination of Rural Population following Vampire Bat Rabies Outbreak in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):1–18.
 47. Botto Nuñez G, Becker DJ, Plowright RK. The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e180.
 48. Anderson A, Shwiff S, Gebhardt K, Ramírez AJ, Shwiff S, Kohler D, et al. Economic evaluation of vampire bat (*Desmodus rotundus*) rabies prevention in Mexico. *Transbound Emerg Dis*. 2014;61(2):140–6.
 49. Torres C, Lema C, Gury Dohmen F, Beltran F, Novaro L, Russo S, et al. Phylodynamics of vampire bat-transmitted rabies in Argentina. *Mol Ecol*. 2014;23(9):2340–52.
 50. Cordeiro R de A, Duarte NFH, Rolim BN, Soares Júnior FA, Franco ICF, Ferrer LL, et al. The Importance of Wild Canids in the Epidemiology of Rabies in Northeast Brazil: A Retrospective Study. *Zoonoses Public Health*. 2016;63(6):486–93.
 51. Favoretto SR, De Mattos CC, De Moraes NB, Carrieri ML, Rolim BN, Silva LM, et al. Rabies virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceará State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(12):1978–81.
 52. Páez A, Saad C, Núñez C, Bóshell J. Molecular epidemiology of rabies in northern Colombia 1994-2003. Evidence for human and fox rabies associated with dogs. *Epidemiol Infect*. 2005;133(3):529–36.
 53. Moran D, Juliao P, Alvarez D, Lindblade KA, Ellison JA, Gilbert AT, et al. Knowledge , attitudes and practices regarding rabies and exposure to bats in

- two rural communities in Guatemala. *BMC Res Notes*. 2015;v.8:1–7.
54. Brasil. Um pouco da história do Instituto Pasteur. *Vigilância em Saúde - 20 anos do SUS-SP*. 2008;(1):19–36.
 55. Babboni SD, Modolo RJ. Raiva : Origem , Importância e Aspectos Históricos Rabies : Origin , Importance and Historical Aspects. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 2011;13:349–56.
 56. Brasil M da AP e A. Controle da raiva dos herbívoros : manual técnico 2009. Brasília: 2009; 2009. p. 124.
 57. Langoni H. que pertencem à variante 3, compatível com amostras isoladas de morcego *Desmodus rotundus*. Os demais ainda continuam em estudo. Destaca-se assim a presença da variante 3 do vírus da raiva, característica de morcego. *Veterinária e Zootec*. 2007;43–6.
 58. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica B. Normas técnicas de profilaxia da raiva humana. 1 ed. Brasília; 2014. 60 p.
 59. BRASIL M da S. Situação Epidemiológica da Raiva [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. Available from: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva#epidemiologia>
 60. Benavides JA, Megid J, Campos A, Rocha S, Vigilato MAN, Hampson K. An evaluation of Brazil's surveillance and prophylaxis of canine rabies between 2008 and 2017. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(8):e0007564.
 61. Wada MY, Rocha SM, Maia-Elkhoury ANS. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2011;20(4):509–18.
 62. Vargas A, Romano APM, Merchán-Hamann E. Raiva humana no Brasil: estudo descritivo, 2000-2017*. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2019;28(2):1–9.
 63. Teixeira LHM, Tomaz LAG, Linhares GFC, Santos MFC, Jayme V de S. Distribuição espaço-temporal dos diagnósticos laboratoriais da raiva animal. *Cienc Anim Bras*. 2015;16(1):144–57.
 64. De Andrade FAG, Gomes MN, Uieda W, Begot AL, Ramos ODS, Fernandes MEB. Geographical analysis for detecting high-risk areas for bovine/human rabies transmitted by the common hematophagous bat in the Amazon region, Brazil. *PLoS One*. 2016;11(7):1–15.
 65. Kotait I, Carrieri ML, Carnieli PJ, Castilho JG, Oliveira R de N, Macedo CI, et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Bol Epidemiológico Paul [Internet]*. 2007;4(40):2–8. Available from:

- <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v4n40/v4n40a01.pdf>
66. Sheffer KC, Carrieri ML, Albas A, Kotait I, Ito FH. Rabies virus in naturally infected bats in the State of São Paulo , Southeastern Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2007;41(3).
 67. Streicker DG, Lemey P, Velasco-Villa A, Rupprecht CE. Rates of viral evolution are linked to host geography in bat rabies. *PLoS Pathog*. 2012;8(5).
 68. Galetti M, Pedrosa F, Keuroghlian A, Sazima I. Liquid lunch – vampire bats feed on invasive feral pigs and other ungulates. *Front Ecol Environ*. 2016;14(9):505–6.
 69. Favoretto SR, De Mattos CC, De Mattos CA, Campos ACA, Sacramento DRV, Durigon EL. The emergence of wildlife species as a source of human rabies infection in Brazil. *Epidemiol Infect*. 2013;141(7):1552–61.
 70. IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal [Internet]. 2020 [cited 2020 Jan 19]. Available from: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>
 71. Brasil, Ministério da Agricultura P e A. Distribuição temporal e espacial do número de casos das doenças animais no Brasil desde 1999 [Internet]. Sistema Nacional de Informação Zoossanitária - SIZ. [cited 2020 Jan 26]. p. <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/>. Available from: <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm>
 72. Souza LC, Langoni H, Silva RC, Lucheis SB. Vigilância Epidemiológica Da Raiva Na Região De Botucatu-Sp: Importância Dos Quirópteros Na Manutenção Do Vírus Na Natureza. *Ars Vet*. 2005;21(1):62–8.
 73. Estévez Garcia AI, Peixoto HC, Silva SO, Polo G, Alves AJ, Brandão PE, et al. Phylogenetic analysis of rabies virus isolated from herbivores in Minas Gerais and São Paulo border (2000-2009), Brazil. *Pesqui Vet Bras*. 2014;34(12):1196–202.
 74. Dias RA, De Souza Nogueira Filho V, Da Silva Goulart C, Telles ICO, Marques GHF, Ferreira F, et al. Modelo de risco para circulação do vírus da raiva em herbívoros no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2011;30(4):370–6.
 75. Braga GB, Grisi-Filho JHH, Leite BM, de Sena EF, Dias RA. Predictive qualitative risk model of bovine rabies occurrence in Brazil. *Prev Vet Med* [Internet]. 2014;113(4):536–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.12.011>

76. Cargnelutti JF, de Quadros JM, Martins M, Batista HBCR, Weiblen R, Flores EF. Glycoprotein-G-gene-based molecular and phylogenetic analysis of rabies viruses associated with a large outbreak of bovine rabies in southern Brazil. *Arch Virol*. 2017;162(12):3697–704.
77. Johnson N, Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setien A. Vampire bat rabies: Ecology, epidemiology and control. *Viruses*. 2014;6(5):1911–28.
78. Wang LF, Anderson DE. Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2019;34(January):79–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.007>
79. Ribeiro J, Staudacher C, Martins CM, Ullmann LS, Ferreira F, Araujo JP, et al. Bat rabies surveillance and risk factors for rabies spillover in an urban area of Southern Brazil. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):1–8.
80. Reis, Nelio R.; Peracchi, Adriano L.; Pedro, Wagner A.; Lima IP. *Morcegos do Brasil*. Londrina; 2007. 253p p.
81. Mayen F. Haematophagous Bats in Brazil, Their Role in Rabies Transmission, Impact on Public Health, Livestock Industry and Alternatives to an Indiscriminate Reduction of Bat Population. *J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal*. 2003;50(10):469–72.
82. Delpietro HA, Russo RG, Carter GG, Lord RD, Delpietro GL. Reproductive seasonality, sex ratio and philopatry in Argentina's common vampire bats. *R Soc Open Sci*. 2017;4(4).
83. Delpietro HA, Marchevsky N, Simonetti E. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. *Prev Vet Med*. 1992;14(1–2):13–20.
84. Carter G, Leffer L. Social grooming in bats: Are vampire bats exceptional? *PLoS One*. 2015;10(10):1–11.
85. Rocha F, Dias RA. The common vampire bat *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) and the transmission of the rabies virus to livestock: A contact network approach and recommendations for surveillance and control. *Prev Vet Med* [Internet]. 2020;174(August 2019):104809. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104809>
86. Rocha F, Ulloa-stanojlovic FM, Cristina V, Rabaquim V, Fadil P, Pompei JC, et al. Relations between topography , feeding sites , and foraging behavior of the

- vampire bat , *Desmodus rotundus*. *J Mammal*. 2019;(X):1–8.
87. Carnieli P, De Novaes Oliveira R, De Oliveira Fahl W, De Carvalho Ruthner Batista HB, Scheffer KC, Iamamoto K, et al. Phylogenetic analysis of partial RNA-polymerase blocks II and III of Rabies virus isolated from the main rabies reservoirs in Brazil. *Virus Genes*. 2012;45(1):76–83.
 88. de Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, et al. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):1–21.
 89. Kuzmin I V., Bozick B, Guagliardo SA, Kunkel R, Shak JR, Tong S, et al. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerg Health Threats J*. 2011;4(1):1–17.
 90. Tadei VA. Distribuição do morcego vampiro, *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae) no estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos. Impresso Especial CATI, editor. Campinas; 1991. 107 p.
 91. KUMAR S et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. KUMAR, S al MEGA X *Mol Evol Genet Anal across Comput Platforms Mol Biol Evol*. 2018;v.35(n. 6):1547–9.
 92. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547–9.
 93. TAMURA K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol*. 1992;9(4):678–87.
 94. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000.
 95. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution (N Y)*. 1985;39(4):783–91.
 96. Fahl WO, Carnieli P, Castilho JG, Carrieri ML, Kotait I, Iamamoto K, et al. *Desmodus rotundus* and *Artibeus* spp. bats might present distinct rabies virus lineages. *Brazilian J Infect Dis*. 2012 Nov;16(6):545–51.
 97. Castilho JG, Carnieli P, Durymanova EA, Fahl W de O, Oliveira R de N, Macedo CI, et al. Human rabies transmitted by vampire bats: Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from the Amazon region (Brazil and Ecuador). *Virus Res*. 2010 Oct;153(1):100–5.

98. Fernandes MES, Carnieli P, Gregório ANF, Kawai JGC, Oliveira RN, Almeida LL, et al. Phylogenetic analysis of rabies viruses isolated from cattle in southern Brazil. *Virus Genes* [Internet]. 2020;(0123456789). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31955384>
99. Ito M, Itou T, Shoji Y, Sakai T, Ito FH, Arai YT, et al. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Virol*. 2003 Apr;26(3):317–30.
100. Macedo CI, Junior PC, Fahl W de O, Lima JY de O, Oliveira R de N, Achkar SM, et al. Caracterização genética de vírus da raiva isolado de bovinos e equinos entre 2007 e 2008, nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2):116–20.
101. Ferraz C, Achkar SM, Kotait I. First report of rabies in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in an urban area, Ubatuba, São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 49(6):389–90.
102. Mochizuki N, Kobayashi Y, Sato G, Hirano S, Itou T, Ito FH, et al. Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a haematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. *J Vet Med Sci*. 2011;73(6):759–66.
103. Vieira LFP, Pereira SRFG, Brandão PE, Oliveira RN, Carnieli-Junior P, Galante AC, et al. Caracterização molecular do vírus da raiva isolado de *Desmodus rotundus* capturados no Estado do Rio de Janeiro. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2010;62(2):343–9.
104. Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, Cunha EMS, et al. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J Vet Med Sci*. 2005;67(7):647–52.
105. Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha EMS, Silva M V., et al. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Arch Virol*. 2007 Oct;152(11):1995–2004.
106. Oliveira R de N. Modos e tempo de evolução em linhagens do vírus da raiva (RABV) mantidos por reservatórios aéreos e terrestres com base em genomas completos. Universidade de São Paulo; 2014.
107. de Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, et al. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat

- Community. Kasper M, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan;10(1):e0004378.
108. Guarino H, Castilho JG, Souto J, Oliveira R de N, Carrieri ML, Kotait I. Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Res*. 2013 May;173(2):415–20.
109. Aréchiga-Ceballos N, Velasco-Villa A, Shi M, Flores-Chávez S, Barrón B, Cuevas-Domnguez E, et al. New rabies virus variant found during an epizootic in white-nosed coatis from the Yucatan Peninsula. *Epidemiol Infect*. 2010 Nov;138(11):1586–9.
110. Nadin-Davis SA, Loza-Rubio E. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus Res*. 2006;117(2):215–26.
111. Carnieli P, Castilho JG, de Oliveira Fahl W, Vêras NMC, do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky M. Genetic characterization of Rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. *Virus Res*. 2009 Sep;144(1–2):215–24.
112. Castilho JG, Carnieli P, Durymanova EA, Fahl W de O, Oliveira R de N, Macedo CI, et al. Human rabies transmitted by vampire bats: Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from the Amazon region (Brazil and Ecuador). *Virus Res* [Internet]. 2010;153(1):100–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.012>
113. Carnieli Junior P, Fahl W. O, Castilho JG, Oliveira R. N, Macedo CI, Durymanova E, et al. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Res*. 2008;131(1):33–46.
114. Le Mercier P, Jacob Y, Tordo N. The complete Mokola virus genome sequence: Structure of the RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*. 1997;78(7):1571–6.
115. Brook CE. A batty concept goes viral. *Nat Ecol Evol* [Internet]. 2019; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-019-1045-5>
116. Blackwood JC, Streicker DG, Altizer S, Rohani P. Resolving the roles of immunity , pathogenesis , and immigration for rabies persistence in vampire bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(51).
117. Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Ito T, Carvalho AAB, et al. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Vet Res*. 2008;4:1–9.

118. Orlando A, Panchana VF, Caldero JL, Mun OS. Risk Factors Associated with Attacks of Hematophagous. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2019;XX(Xx):1–7.
119. Brasil C de DA do E de SP. Secretaria de Agricultura fortalece as ações de controle da raiva dos herbívoros no Estado [Internet]. 2019 [cited 2020 Jan 26]. Available from:
<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/noticias/2019/secretaria-de-agricultura-fortalece-as-acoes-de-controle-da-raiva-dos-herbivoros-no-estado,1305.html>
120. Benavides JA, Valderrama W, Streicker DG. Spatial expansions and travelling waves of rabies in vampire bats. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2016;283(1832):1–9.
121. Gomes MN, Uieda W. Abrigos diurnos, composição de colônias, dimorfismo sexual e reprodução do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy) (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Zool.* 2004;21(3):629–38.
122. Macedo CI, Junior PC, Fahl WDO, Yoshitaka J, Lima DO, Oliveira RDN, et al. Genetic characterization of rabies virus isolated from bovines and equines between 2007 and 2008 , in the States of São Paulo and Minas Gerais
Caracterização genética de vírus da raiva isolado de bovinos e equinos entre 2007 e 2008 , nos Estados de São Pa. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):116–20.
123. Menozzi BD. Infecção pelo vírus rábico em quirópteros no município de Botucatu , São. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2019.
124. Itou T, Fukayama T, Mochizuki N, Kobayashi Y, Deberaldini ER, Carvalho AAB, et al. Molecular epidemiological tracing of a cattle rabies outbreak lasting less than a month in Rio Grande do sul in southern Brazil. *BMC Res Notes.* 2016;9(1):1–5.
125. Brito MG De, Chamone TL, José F, Wada MY, Miranda AB De. ANTEMORTEM DIAGNOSIS OF HUMAN RABIES IN A VETERINARIAN INFECTED WHEN HANDLING A HERBIVORE IN MINAS GERAIS , BRAZIL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011;53(1):39–44.
126. Cavalcante MKK de S, Florêncio CMGD, Moreno J de O, Correia FGS, Alencar CH. Post-exposure human rabies prophylaxis: Spatial patterns of inadequate procedures in ceará-Brazil, 2007 to 2015. *Rev Soc Bras Med Trop.*

2020;53(September 2019):0–2.

9. Anexos

9.1 Anexo 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Distribuição geográfica de *Desmodus rotundus*, suas implicações nos casos de raiva em bovinos e análise filogenética dos isolados virais entre 2016-2018 na região de Botucatu, São Paulo-SP." Protocolo CEUA 0066/2018, a ser conduzido por Karine Bott Mantovan, responsável/orientador Helio Langoni, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/04/2018 a 31/12/2019
Nome Comum/Espécie/Linhagem	CAMUNDONGO / MUS MUSCULUS / Balb/c
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	250
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	20 g
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 0 mes(es) e 21 dia(s).
Procedência	Biotério Central - Unesp Botucatu

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 12/04/2019

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Seção Técnica Acadêmica

Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681

(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

9.2 Anexo 2

Tabela 2. Relação de amostras de SNC de bovinos positivos nas técnicas diagnósticas para raiva nos municípios de Botucatu e região, de acordo com a inserção no estudo. Botucatu, SP, 2019

RG	ANO	MUNICÍPIO	RID	PB	PCR	PURIFICAÇÃO	SEQUENCIAMENTO	GEORREFERENCIAMENTO
127/16	2016	Piraju	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
146/16	2016	Laranjal Paulista	Sim	Sim				Sim
147/16	2016	Laranjal Paulista	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
152/16	2016	Conchas	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
153/16	2016	Conchas	Sim	Sim				Sim
183/16	2016	Arealva	Não	Sim				Sim
210/16	2016	Arealva	Sim	Sim				Sim
217/16	2016	São Manuel	Não	Sim				Sim
218/16	2016	Arealva	Sim	Sim				Sim
219/16	2016	Arealva	Sim	Sim				Sim
226/16	2016	Arealva	Sim	Sim				Sim
227/16	2016	Arealva	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
271/16	2016	Arealva	Não	Sim				Sim
272/16	2016	Arealva	Sim	Sim				Sim
308/16	2016	Arealva	Sim	Sim				Sim
09/17	2017	Conchas	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
116/17	2017	São Manuel	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
142/17	2017	São Manuel	Não	Sim				Sim
160/17	2017	Itatinga	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
167/17	2017	Itatinga	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
169/17	2017	Lençóis Paulista	Sim	Sim				Sim
175/17	2017	Itatinga	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
179/17	2017	Itatinga	Não	Sim				Sim
180/17	2017	Itatinga	Não	Sim				Sim
181/17	2017	São Manuel	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
184/17	2017	Riversul	Sim	Sim				Sim
191/17	2017	Bofete	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
195/17	2017	Botucatu	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
213/17	2017	Bofete	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
224/17	2017	Pardinho	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
225/17	2017	São Manuel	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
235/17	2017	Botucatu	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
242/17	2017	Pardinho	Sim	Sim				Sim
243/17	2017	Itatinga	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
244/17	2017	Botucatu	Sim	Sim				Sim
250/17	2017	Bofete	Sim	Sim				Sim
254/17	2017	Botucatu	Sim	Sim				Sim

264/17	2017	Pardinho	Sim	Sim				Sim
291/17	2017	Botucatu	Sim	Sim				Sim
308/17	2017	Bofete	Sim	Sim				Sim
319/17	2017	Bofete	Sim	Sim				Sim
321/17	2017	Avaré	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
322/17	2017	Botucatu	Sim	Sim				Sim
323/17	2017	Lençóis Paulista	Sim	Sim				Sim
324/17	2017	Lençóis Paulista	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
326/17	2017	Lençóis Paulista	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
330/17	2017	Bofete	Sim	Sim				Sim
337/17	2017	Bofete	Sim	Sim				Sim
342/17	2017	Pardinho	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
364/17	2017	Pratânia	Sim	Sim				Sim
387/17	2017	Avaré	Sim	Sim				Sim
394/17	2017	Bofete	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
396/17	2017	Itatinga	Sim	Sim				Sim
401/17	2017	Bofete	Sim	Sim				Sim
402/17	2017	Santa Cruz do Rio Pardo	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
430/17	2017	Botucatu	Sim	Sim				Sim
438/17	2017	Pratânia	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
447/17	2017	Pratânia	Sim	Sim				Sim
455/17	2017	Botucatu	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
477/17	2017	Avaré	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
492/17	2017	Botucatu	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
511/17	2017	Santa Cruz do Rio Pardo	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
514/17	2017	Botucatu	Sim	Sim				Sim
538/17	2017	Porangaba	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
575/17	2017	Porangaba	Sim	Sim				Sim
05/18	2018	Avaré	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
82/18	2018	Itatinga	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
104/18	2018	Porangaba	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
165/18	2018	Itatinga	Sim	Sim				Sim
166/18	2018	Avaré	Sim	Sim				Sim
175/18	2018	Marília	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
195/18	2018	Itatinga	Sim	Sim				Sim
225/18	2018	Pardinho	Sim	Sim				Sim
283/18	2018	Piraju	Sim	Sim				Sim
336/18	2018	Pardinho	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
351/18	2018	Bofete	Sim	Sim				Sim
356/18	2018	Bauru	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
391/18	2018	Avaré	Sim	Sim				Sim
400/18	2018	Agudos	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
405/18	2018	Guareí	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
407/18	2018	Guareí	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
408/18	2018	Itatinga	Sim	Sim				Sim

411/18	2018	Itatinga	Sim	Sim				Sim
418/18	2018	Porangaba	Sim	Sim				Sim
439/18	2018	Guareí	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
444/18	2018	Pardinho	Sim	Sim				Sim
457/18	2018	Avaré	Sim	Sim				Sim
487/18	2018	Itaporanga	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
496/18	2018	Piratininga	Sim	Sim				Sim
501/18	2018	Cesário Lange	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
504/18	2018	Cesário Lange	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
512/18	2018	Itatinga	Sim	Sim				Sim
541/18	2018	Laranjal Paulista	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
548/18	2018	Porangaba	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
550/18	2018	Itatinga	Sim	Sim				Sim
578/18	2018	Itapetininga	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
581/18	2018	Itatinga	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
599/18	2018	Avaré	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
617/18	2018	Avaré	Sim	Sim				Sim
663/18	2018	Ribeirão Branco	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
672/18	2018	Avaré	Sim	Sim				Sim
691/18	2018	Itatinga	Sim	Sim				Sim
699/18	2018	Itatinga	Sim	Sim				Sim
781/18	2018	Espírito Santo do Turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

9.3 Anexo 3

Tabela 4. Sequências utilizadas na análise filogenética de isolados do vírus rábico de bovinos estudados.

Acesso	Hospedeiro	Ano	Origem		Referência	
			Município	Estado /País		
JF682426	Bovino	2004	Santo Antônio da Alegria	SP/BRA	Fahl et al., (96)	
JF682418	Bovino	2004	Altinópolis	SP/BRA		
JF682419	Bovino	2005	Santo Antônio da Alegria	SP/BRA		
JF682417	Bovino	2004	Altinópolis	SP/BRA		
JF682416	Bovino	2005	Altinópolis	SP/BRA		
JF682412	Bovino	2005	Platina	SP/BRA		
JF682411	Bovino	2005	Garça	SP/BRA		
HM368179	Bovino	2007	Esmeraldas	ECU		Castilho et al., (97)
HM368178	Bovino	2007	Esmeraldas	ECU		
KX090643	Bovino	2012	Pinhal Grande	RS/BRA	Fernandes et al., (98)	
KX090605	Bovino	2013	Gravataí	RS/BRA		
KX090609	Bovino	2015	Novo Hamburgo	RS/BRA		
KX090592	Bovino	2015	Rio Fortuna	SC/BRA		
KX090591	Bovino	2015	São Martinho	SC/BRA		
KX090587	Bovino	2015	Anitápolis	SC/BRA		
AB083799	Bovino	1998	Morrinhos	GO/BRA		Ito et al., (99)
AB083818	Bovino	1999	Corumbáiba	GO/BRA		
AB083805	Bovino	1994	São Roque	SP/BRA		
AB083809	Bovino	1998	Nova Olinda	TO/BRA		
AB083811	Bovino	1999	Colinas	TO/BRA		
AB083813	Bovino	1999	Alto Taquari	MT/BRA		
AB083814	Bovino	1999	Cáceres	MT/BRA		
AB083817	Bovino	1989	Piraju	MT/BRA		
AB083806	<i>D. rotundus</i>	*	Taubaté	SP/BRA		
AB083807	<i>D. rotundus</i>	1998	Pindamonhangaba	SP/BRA		
GQ160959	Bovino	2008	Vargem	SP/BRA	Macedo et al., (100)	
GQ160958	Bovino	2008	Vargem	SP/BRA		
GQ160955	Bovino	2008	Socorro	SP/BRA		
GQ160954	Bovino	2008	Socorro	SP/BRA		
GQ160953	Bovino	2008	Serra Negra	SP/BRA		
GQ160952	Bovino	2008	Serra Negra	SP/BRA		
GQ160951	Bovino	2008	São Sebastião da Gramma	SP/BRA		
GQ160950	Bovino	2008	São Sebastião da Gramma	SP/BRA		
GQ160949	Equino	2008	São Sebastião da Gramma	SP/BRA		
GQ160945	Bovino	2008	São João da Boa Vista	SP/BRA		
GQ160944	Bovino	2008	São João da Boa Vista	SP/BRA		
GQ160943	Bovino	2008	Salesópolis	SP/BRA		
GQ160942	Bovino	2008	Piracaia	SP/BRA		
GQ160941	Bovino	2008	Piracaia	SP/BRA		
GQ160940	Bovino	2008	Pedregulho	SP/BRA		
GQ160939	Equino	2008	Pedra Bela	SP/BRA		
GQ160938	Bovino	2008	Marília	SP/BRA		
GQ160937	Bovino	2008	Lindóia	SP/BRA		
GQ160936	Bovino	2008	Lindóia	SP/BRA		
GQ160935	Equino	2008	Joanópolis	SP/BRA		
GQ160934	Bovino	2008	Iacri	SP/BRA		
GQ160932	Equino	2008	Franca	SP/BRA		
GQ160931	Equino	2008	Franca	SP/BRA		
GQ160926	Bovino	2008	Espírito Santo do Pinhal	SP/BRA		
GQ160925	Bovino	2008	Divinolândia	SP/BRA		
GQ160924	Equino	2008	Caconde	SP/BRA		

GQ160923	Bovino	2008	Caconde	SP/BRA	
GQ160916	Bovino	2007	Pedra Bela	SP/BRA	
GQ160915	Bovino	2007	Patrocínio Paulista	SP/BRA	
GQ160913	Bovino	2007	Itirapuã	SP/BRA	
GQ160912	Bovino	2007	Itapeva	SP/BRA	
GQ160910	Bovino	2007	Andradas	MG/BRA	
GQ160920	Bovino	2008	Andradas	MG/BRA	
GQ160917	Bovino	2007	Poços de Caldas	MG/BRA	
GQ160918	Bovino	2007	Poços de Caldas	MG/BRA	
GQ160921	Bovino	2008	Belo Horizonte	MG/BRA	
GQ160927	Bovino	2008	Extrema	MG/BRA	
GQ160929	Bovino	2008	Extrema	MG/BRA	
GQ160930	Equino	2008	Extrema	MG/BRA	
GQ160956	Bovino	2008	Três Corações	MG/BRA	
GU204250	<i>D. rotundus</i>	2006	Ubatuba	SP/BRA	Ferraz; Achkar; Kotait, (101)
AB519642	<i>D. rotundus</i>	2000	Região Norte	SP/BRA	Mochizuki, et al., (102)
EF428582	<i>D. rotundus</i>	2006	Quissamã	RJ/BRA	Vieira et al., (103)
EF428581	<i>D. rotundus</i>	2006	Quissamã	RJ/BRA	
EF428580	<i>D. rotundus</i>	2006	Quissamã	RJ/BRA	
EF428579	<i>D. rotundus</i>	2006	Quissamã	RJ/BRA	
AB201803	<i>D. rotundus</i>	2000	Lindóia	SP/BRA	Kobayashi et al., (104)
AB201804	<i>D. rotundus</i>	2000	Lindóia	SP/BRA	
AB201805	<i>D. rotundus</i>	2001	São José do Barreiro	SP/BRA	
AB297646	<i>D. rotundus</i>	2006	Cocalzinho de Goiás	GO/BRA	Kobayashi et al., (105)
AB297640	<i>D. rotundus</i>	2005	Guapó	GO/BRA	
AB297636	<i>D. rotundus</i>	2000	Guarulhos	SP/BRA	
AB297635	<i>D. rotundus</i>	2003	Tambaú	SP/BRA	
AB297633	<i>D. rotundus</i>	1998	Laje do Muriaé	RJ/BRA	
KM594041	<i>D. rotundus</i>	2013	Belo Horizonte	MG/BRA	Oliveira (106)
KM594042	<i>D. rotundus</i>	2013	Belo Horizonte	MG/BRA	
KM594040	<i>D. rotundus</i>	2013	Belo Horizonte	MG/BRA	
KT023101	<i>D. rotundus</i>	2010	*	GUF	De Thoisy et al., (107)
KF864322	<i>D. rotundus</i>	2006	Laguna Limpia	ARG	Torres et al., (49)
KF864397	<i>D. rotundus</i>	2008	El Alto	ARG	
KF864373	Bovino	2007	Machagai	ARG	
KF864387	Bovino	2008	El Espinillo	ARG	
KF864382	Equino	2008	Tatané	ARG	
KF864411	Bovino	2009	Las Lajitas	ARG	
EU981921	Bovino	2008	Rivera**	URU	Guarino et al., (108)
EU981925	Bovino	2008	Rivera**	URU	
EU981926	Bovino	2008	Rivera**	URU	
EU981923	Equino	2008	Rivera**	URU	
EU981927	<i>D. rotundus</i>	2008	Rivera**	URU	
GU991828	Bovino	2003	Michoacán**	MEX	Aréchiga-Ceballos, et al., (109)
GU991826	Bovino	1999	Quintana Roo**	MEX	
GU991823	Bovino	2003	Campeche**	MEX	
AY854587	Morcego hematófago	1996	Cidade do México	MEX	Nadin-Davis et al., (110)
FJ649137	Bovino	2000	Bragança Paulista	SP/BRA	Carnielli et al., (111)
FJ649107	Bovino	2000	Bragança Paulista	SP/BRA	
FJ649120	Bovino	2000	Nazaré Paulista	SP/BRA	
FJ649093	Bovino	1999	Socorro	SP/BRA	
FJ649160	Bovino	2001	Morungaba	SP/BRA	
FJ649065	Bovino	1998	Socorro	SP/BRA	
FJ649072	Bovino	1998	São João da Boa Vista	SP/BRA	
FJ649165	Bovino	2001	Monte Sião	MG/BRA	
FJ649157	Bovino	2001	Itapira	SP/BRA	
FJ649158	Bovino	2001	Campinas	SP/BRA	
FJ649155	Bovino	2000	Caconde	SP/BRA	

FJ649110	Bovino	2000	São Sebastião da Grama	SP/BRA	
EF363757	Humano	2005	Viseu	PA/BRA	Castilho et al., (97)
EF363734	Humano	2005	Turiaçu	MA/BRA	
EF363733	Humano	2005	Cândido Mendes	MA/BRA	
EF152246	<i>Pseudalope x vetulus</i>	2005	*	PI/BRA	Carnieli Junior et al., (113)
EF152245	<i>Cerdocyon thous</i>	2005	*	PE/BR	
EF152234	<i>Cerdocyon thous</i>	2003	*	BA/BRA	
GU992320	(Pasteur virus strain)	1993	*	FRA	Recuperado do GenBank (não publicado)
Y09762.1	(Mokola virus)	*	*	FRA	Le Mercier, Jacob, Tordo (114)

Legenda: *Desconhecido. **Estado ou Província