

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

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Pesquisa de zoonoses virais emergentes em
morcego hematófago *Desmodus rotundus*: Uma
abordagem de saúde única**

KARINE BOTT MANTOVAN

Botucatu – SP

2023

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

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Pesquisa de zoonoses virais emergentes em
morcego hematófago *Desmodus rotundus*: Uma
abordagem de saúde única**

KARINE BOTT MANTOVAN

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Botucatu – SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Mantovan, Karine Bott.

Pesquisa de zoonoses virais emergentes em morcego
hematófago *Desmodus rotundus* : uma abordagem de saúde única
/ Karine Bott Mantovan. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502000

1. Alphavirus. 2. Flavivírus. 3. Morcegos. 4. Saúde
pública. 5. Vírus da hidrofobia.

Palavras-chave: Alphavirus; Flavivírus; Morcegos; Saúde
pública; Vírus da raiva.

Autor: Karine Bott Mantovan

Título: Pesquisa de zoonoses virais emergentes em morcego hematófago
Desmodus rotundus: Uma abordagem de saúde única

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Dr. Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva FMVZ –
UNESP - Botucatu

Dr. Benedito Donizete Menozzi

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva FMVZ –
UNESP - Botucatu

Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Membro

Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais – Bauru

Dra. Juliana Giantomassi Machado

Membro

Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP

Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva FMVZ –
UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 3 de julho de 2023.

Ao vô Domingos, vô Jeronymo e vô Santina (*in memoriam*), todo meu amor e gratidão pelos maiores ensinamentos da vida, com amor, honestidade e muita força.

Agradecimentos

Agradeço a Deus e sua infinita misericórdia, que mesmo não merecendo, colocou pessoas excepcionais no meu caminho e me concedeu saúde.

Agradeço aos meus pais, Angela Regina Bott Mantovan e José Domingos Mantovan e minha irmã, Camila Bott Mantovan, que com todas as dificuldades, nunca colocaram obstáculos e sempre fizeram o possível e impossível para que meus sonhos fossem realizados.

Agradeço os meus avós, Domingos Mantovan, José Jeronymo Bot, Santina Ciani Bot, que partiram ao longo da realização deste trabalho, porém me ensinaram tanto sobre força e amor.

Agradeço à minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos e vibram com as minhas vitórias.

Agradeço ao meu orientador, Professor Helio Langoni, muito obrigada por acreditar e confiar em mim, mesmo quando eu não era capaz. Muito obrigada pelas infinitas oportunidades e pelos anos de muito aprendizado.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu, por ser minha segunda casa e pelos infinitos conhecimentos ao longo dos anos.

Agradeço ao Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, aos docentes e funcionários pela amizade e vínculos criados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ao amigo Dr. Benedito Donizete Menozzi, que desde o início da minha jornada sempre foi meu parceiro e apoio.

Agradeço a minha amiga, Dra. Anelise Salina, parte fundamental da minha vida e grande companheira de trabalho e cafezinhos.

Agradeço às minhas amigas Evelyn Cristine, Alice Maciel e Rebecca Bastos Abib, por abrirem a porta da casa e coração de vocês para mim ao longo dos anos.

Agradeço ao médico veterinário Guilherme Shin, e toda a Coordenadoria de Defesa Agropecuária do estado de São Paulo, pela parceria, captura e envio das amostras e troca de conhecimento.

Agradeço à Professora Paula Rahal, por abrir as portas do Laboratório de Estudos Genômicos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, São José do Rio Preto, para que grande parte desse trabalho fosse realizado. Em especial a doutoranda Dayla e o Dr. Vivaldo, que me ajudaram nas análises moleculares e trocas de experiências.

Ao amigo e designer Rafael Eleotério, agradeço pela ajuda na elaboração dos mapas.

As minhas amigas eternas que a FMVZ me deu e que sempre vou carregar no meu coração, Ana Carolina Yamakawa, Evelyn Cristine, Mariana Nilsson, Gabrielle Miodutski, Lais Moraes Paiz, Anelise Salina, Sâmea Fernandes Joaquim, Alice Maciel e Rebecca Bastos Abib, eu amo vocês.

Agradeço ao Serviço de Inspeção Federal, SIF 451, que fez com que a jornada de trabalho exaustiva somada a conclusão dessa tese fosse realizada da forma mais leve possível, em especial às minhas amigas Gabriela Balbão Roncaglia e Valéria Ramalho, vocês são incríveis.

Agradeço à Dra Sederli Ranieli, minha chefe, que foi meu ponto de apoio e fundamental para que essa tese fosse concluída. Palavras nunca serão suficientes para expressar minha gratidão.

Agradeço a todas as pessoas que de uma maneira ou outra passaram pela minha vida ao longo da pós graduação. Todos foram extremamente necessários para minha evolução profissional e pessoal.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1. Introdução	12
2. Revisão de literatura.....	13
Biologia do <i>Desmodus rotundus</i>	13
O vírus da raiva (RABV)	17
Raiva: importância na saúde pública	20
Raiva no Brasil	22
Flavivírus: Definição e importância	26
Flavivirus no Brasil	30
Dengue.....	30
Febre Amarela	32
Zika Vírus	34
Alphavirus: Definição e importância.....	35
Alphavirus no Brasil	37
Vírus Chikungunya (CHIKV).....	37
Vírus Mayaro (MAYV)	38
Vírus da Encefalite Equina	40
CAPÍTULO 2	43
ARTIGOS CIENTÍFICOS	43
Artigo 1.....	44
1. Introdução	45
2. Métodos.....	47
Declaração de ética	47
Área de estudo	47
Amostras.....	49
Reação de Imunofluorescência Direta (RID)	50
Extração de RNA	50
Detecção molecular do vírus da raiva.....	50
3. Resultados.....	51
4. Discussão	53
5. Conclusão	56
6. Referências	56
Artigo 2.....	60

1. Introdução	61
2. Métodos.....	63
Declaração de ética	63
Área de estudo	63
Amostras.....	65
Extração de RNA	66
Detecção molecular de Flavivirus e Alphavirus.....	66
3. Resultados.....	67
4. Discussão	68
5. Conclusão	71
6. Referências	72
CAPÍTULO 3	75
DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
Conclusões	85
Referências	87
Material Suplementar	102
.....	103
Material Suplementar 2.....	105

RESUMO

MANTOVAN, K. B. **Pesquisa de zoonoses virais emergentes em morcego hematófago *Desmodus rotundus*: uma abordagem de saúde única**. 2023. 105 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Botucatu, 2023.

As doenças zoonóticas virais compõem uma séria ameaça à saúde pública, e responsáveis pela maioria das pandemias recentes em humanos. Os morcegos são associados a transmissão de doenças infecciosas, uma vez que abrigam uma alta diversidade viral em relação as outras ordens de mamíferos. Os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* apresentam ecologia e características sociais excepcionais que podem ter efeitos importantes na dinâmica de dispersão viral. A identificação de patógenos que tenham os *D. rotundus* como reservatórios devem ser mais bem esclarecidas, tanto para aqueles já estabelecidos, como o vírus da raiva, quanto para novas descobertas. Foram capturados 143 espécimes de *D. rotundus* como parte de um programa de vigilância epidemiológica ativa, referentes a municípios do Estado de São Paulo. Também foram registradas as coordenadas geográficas dos abrigos e suas características ecológicas. Foram coletados material cerebral para realização da reação de imunofluorescência direta para diagnóstico de raiva e RT-PCR. Para pesquisa molecular de flavivírus e alphavirus foi realizado RT-qPCR de pulmão, intestino e fígado. Ambas as técnicas diagnósticas para raiva, flavivírus e alphavirus foram negativas. As características dos abrigos evidenciaram que todos se encontravam em áreas de modificações antropogênicas como casas abandonadas e malha rodoviária. Dada a importância das doenças descritas, uma vez que são doenças tropicais negligenciadas, mesmo com os resultados negativos, estas enfermidades virais são encontradas na região e isso oferece novas oportunidades para propagação destes patógenos, diversificação genética e adaptação a novas espécies. A adoção de uma abordagem do conceito de saúde única global é extremamente necessária, além de um sistema de vigilância epidemiológica funcional para monitorar doenças infecciosas emergentes.

Palavras-chave: morcegos; saúde pública; flavivirus; alphavirus; vírus da raiva

ABSTRACT

MANTOVAN, K. B. **Research of emerging viral zoonoses in vampire bat *Desmodus rotundus*: One health approach.** 2023. 105 P. Thesis (Doctorate) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Botucatu, 2023.

Viral zoonotic diseases are a serious threat to public health, and they have caused most recent human pandemics. Bats have been associated with the transmission of infectious diseases, hosting a high viral diversity in relation to other orders of mammals. The vampire bats *Desmodus rotundus* have exceptional ecology and social characteristics and have important effects on viral dynamics and dispersion. The identification of pathogens what *Desmodus rotundus* may be reservoirs must be better clarified, among them rabies, well described in the species, and flavivirus genus diseases, which are widely disseminated. a total of 143 *D. rotundus* were collected in active surveillance, referring to municipalities in the State of São Paulo, as well as geographic orientation of the shelters and ecological characteristics. Of these, brain material was collected for direct immunofluorescence test and RT-PCR for diagnosing rabies. For molecular research of flaviviruses and alphaviruses, RT-qPCR was performed of lung, intestine and liver. Both diagnostic techniques for rabies, flavivirus and alphavirus were negative. The characteristics of the shelters showed that they were all located in areas of anthropogenic modifications such as abandoned houses and the road network. Given the importance of the described diseases, both are one of the main neglected tropical diseases. Even with negative samples, both viral diseases are found in the region and this offers new opportunities to dissemination of these pathogens, genetic diversification and adaptation to new species. The adoption of a “One Health” approach globally is badly needed, in addition to an intensive surveillance system to monitor emerging infectious diseases.

Keywords: bats; public health; flavivirus; alphavirus; rabies virus

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução

As doenças zoonóticas transmitidas por vírus são uma séria ameaça à saúde pública (WYNNE; WANG, 2013), e causaram a maioria das pandemias recentes em seres humanos (OLIVAL et al., 2017a; BENAVIDES et al., 2020a; LETKO et al., 2020; IRVING et al., 2021). Cerca de 75% das doenças infecciosas emergentes e reemergentes para humanos são consideradas zoonoses (WANG; ANDERSON, 2019; VAN BRUSSEL; HOLMES, 2022).

Uma estimativa recente sugere que os mamíferos abrigam 40.000 vírus, dos quais 10.000 podem ser transmitidos para os seres humanos, e cerca de cinco a dez vezes mais espécies de vírus do que espécies de mamíferos, com a maioria dos vírus compartilhados por alguns hospedeiros (CARLSON et al., 2019).

Um aspecto fundamental para os estudos da emergência de zoonoses é determinar quais espécies animais abrigam vírus ou outros patógenos que possam ser transmitidos para os seres humanos (WILLE; GEOGHEGAN; HOLMES, 2021), já que atualmente, a grande maioria circula silenciosamente em mamíferos selvagens (CARLSON et al., 2022).

A ascensão de novos vírus e expansão dos patógenos já conhecidos, surgiu como uma ameaça para as populações humanas, animais e meio ambiente, onde o conceito de Saúde Única, procura integrar a saúde humana, animal e do meio ambiente, visando a predição e controle de doenças com interface humano-animal-ambiental (WANG; ANDERSON, 2019). Esses fatores são fortemente influenciados e potencializados devido principalmente, aos fatores antropogênicos, como industrialização, agricultura intensiva, fragmentação de florestas, urbanização, transporte rápido e mudanças climáticas (SOKOLOW et al., 2019; SÁNCHEZ; VENKATACHALAM-VAZ; DRAKE, 2021; GARCÍA-ROMERO et al., 2023).

A expansão da agricultura e crescimento populacional promovem a invasão dos habitats da vida selvagem (GIBB et al., 2020), levando a mudanças nos ecossistemas e aproximando os humanos e animais domésticos, da vida selvagem e vetores (JONES et al., 2013) e dos ciclos silvestres de potenciais patógenos zoonóticos novos ou já conhecidos (BERGNER et al., 2021).

A mudança no uso da terra e a conversão de habitats naturais em ecossistemas agrícolas, urbanos ou antropogênicos, é um indicador global importante do risco de infecção e do surgimento de doenças em humanos (GIBB et al., 2020). A vigilância em ecossistemas de agricultura e pecuária e urbanizados, principalmente em áreas de integração entre humanos e silvestres, são necessários (JONES et al., 2013; GIBB et al., 2020).

Existem previsões que, em consequência às mudanças climáticas, a distribuição geográfica de várias espécies possa mudar cerca de cem quilômetros no próximo século, e nesse processo, muitos patógenos possivelmente serão inseridos em novos ambientes (BURROWS et al., 2014). Isso representa uma ameaça imensurável à saúde global, principalmente devido às várias epidemias e pandemias recentes de vírus originários da vida selvagem (CARLSON et al., 2022).

Essa interação pode propiciar a propagação de patógenos, a diversificação genética e adaptação viral a uma nova espécie hospedeira, culminando em um transbordamento (*spillover*) (CARLSON et al., 2022), que causa impactos generalizados nos âmbitos ambiental, social, econômico e político (SÁNCHEZ; VENKATACHALAM-VAZ; DRAKE, 2021; WALLAU et al., 2023).

2. Revisão de literatura

Biologia do *Desmodus rotundus*

Os morcegos são considerados um grupo único, porém bastante diverso de mamíferos na ordem Chiroptera (asas de mão, em grego) (IRVING et al., 2021). São considerados como o segundo grupo de maior diversidade em todo o mundo, representando 20,7% de 5416 espécies de mamíferos conhecidas (WANG; ANDERSON, 2019), com 18 famílias e 1400 espécies (ANDERSON; RUXTON, 2020). Habitam todos os continentes, exceto a Antártica (WANG; ANDERSON, 2019). O Brasil é o segundo país com maior diversidade de espécies de morcegos, abrigando 181 das espécies conhecidas em todo o mundo (WALLAU et al., 2023).

Apenas três espécies se alimentam exclusivamente de sangue, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* (JOHNSON;

ARÉCHIGA-CEBALLOS; AGUILAR-SETIEN, 2014) e são restritas às Américas (GALETTI *et al.*, 2016)

D. rotundus pertence à família Phyllostomidae, subfamília *Desmodontinae*, e gênero *Desmodus*. Dentre os hematófagos, *D. rotundus* é o único que se alimenta exclusivamente de sangue de mamíferos e é conhecido como “morcego vampiro comum” (REIS, NELIO R.; PERACCHI, ADRIANO L.; PEDRO, WAGNER A.; LIMA, 2007).

Está amplamente difundido nas Américas, desde o norte do México até o norte da Argentina. No Brasil, ele está presente em todos os estados (RIBEIRO *et al.*, 2018). É encontrado em florestas tropicais, regiões montanhosas, desertos costeiros e apresenta plasticidade tanto em ambientes nativos, quanto naqueles transformados antropogenicamente (BERGNER *et al.*, 2020; MANTOVAN *et al.*, 2022).

A ótima capacidade adaptativa abrange ampla variação de clima, recursos alimentares e presença de outras espécies de morcegos, que refletem nas características de colônias, como tamanho da população, estrutura etária e característica sexual (DELPIETRO; MARCHEVSKY; SIMONETTI, 1992; DELPIETRO *et al.*, 2017; BERGNER *et al.*, 2020). Geralmente as colônias são pequenas e contêm de 10 a 200 animais, contudo algumas colônias podem conter maior número quando não há o controle populacional da espécie (MAYEN, 2003).

Apresentam estrutura social complexa, uma única colônia pode ocupar vários abrigos diferentes (ROCHA; DIAS, 2020). O principal contém fêmeas adultas e jovens, e machos dominantes e abrigos satélites ocupados por jovens e adultos solteiros, que muitas vezes brigam pelo controle do harém (MAYEN, 2003; SOUZA *et al.*, 2018; ROCHA; DIAS, 2020).

O comportamento de lamber 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 (CARTER; LEFFER, 2015). As lambeduras estimulam o regurgitamento do alimento de uma fêmea saciada, permitindo o seu aproveitamento por outra que não tenha se alimentado (DELPIETRO; MARCHEVSKY; SIMONETTI, 1992). Essa característica está ligada ao altruísmo e coesão social (CARTER; LEFFER, 2015).

As fêmeas da espécie são consideradas poliétricas, porém apresentam sazonalidade reprodutiva, com pico de nascimentos e lactação na estação chuvosa (primavera/verão) (SOUZA et al., 2018). Considera-se de baixa taxa reprodutiva, devido ao período gestacional de 165 a 180 dias, e nascimento de apenas um filhote ao ano, é o que favorece o seu controle populacional (REIS, NELIO R.; PERACCHI, ADRIANO L.; PEDRO, WAGNER A.; LIMA, 2007; DELPIETRO et al., 2017). O acasalamento sazonal do *D. rotundus* resulta num influxo de morcegos jovens, coincidindo com o aumento de casos de raiva durante a estação chuvosa (DELPETRO et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Sugere-se que há filopatria feminina e fluxo gênico mediado por machos (HUGUIN et al., 2018). Após o nascimento, do segundo ao quarto mês de vida, os filhotes recebem alimentos regurgitados e após, se tornam independentes (REIS, NELIO R.; PERACCHI, ADRIANO L.; PEDRO, WAGNER A.; LIMA, 2007; DELPIETRO et al., 2017).

Na natureza, *D. rotundus* se alimentam principalmente de mamíferos silvestres em áreas de floresta (FOOKS et al., 2014), porém, mudanças comportamentais fizeram com que estes, expandissem seu nicho ecológico. Esse reflexo se deve ao aumento do desmatamento, intensificação da pecuária e a urbanização (CASCIO et al., 2011; JONES et al., 2013), resultando na redução de populações de animais silvestres desencadeando um aumento na predação do *D. rotundus* em animais de produção (bovinos, equinos, suínos, etc.), presas domésticas e a utilização de abrigos artificiais (JOHNSON; ARÉCHIGA-CEBALLOS; AGUILAR-SETIEN, 2014; ROCHA; DIAS, 2020; MANTOVAN et al., 2022), aumentando assim os riscos de surtos de doenças (CASCIO et al., 2011).

A intensificação da pecuária também aumenta a disponibilidade de alimento para os morcegos permitindo que as populações aumentem e se dispersem (BOTTO NUÑEZ; BECKER; PLOWRIGHT, 2019a). O Brasil tem o maior rebanho mundial de bovinos (IBGE., 2022), e estes tendem a permanecer no mesmo local por longos períodos (JOHNSON; ARÉCHIGA-CEBALLOS; AGUILAR-SETIEN, 2014).

D. rotundus podem voar até 10 km (DIAS et al., 2011) para se alimentarem, porém essa distância é determinada pelo número de indivíduos no abrigo, uma vez que eles podem voar mais longe das fontes de alimentação para

minimizar a competição (ROCHA; DIAS, 2020).

A alimentação deve ocorrer num intervalo inferior a 3 dias e geralmente escolhem as presas em altitudes mais baixas que os abrigos, pois gastam menos energia para se alimentarem (ROCHA et al., 2019). 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, que dura em torno de 30 minutos, podendo eventualmente chegar à uma hora (DELPIETRO; MARCHEVSKY; SIMONETTI, 1992).

Há séculos, os morcegos vem sendo associados a transmissão de doenças infecciosas (IRVING et al., 2021), e estes abrigam uma alta diversidade viral em relação as outras ordens de mamíferos (LETKO et al., 2020).

Devido a fatores ecológicos e ambientais, como as interações e reorganização das colônias, os deslocamentos dos indivíduos entre abrigos podem ser considerados a base da transmissão de patógenos entre morcegos (CARNIELI et al., 2012).

A exposição dos seres humanos aos morcegos pode ser relacionada a alimentação destes, principalmente relatada na grande área da floresta amazônica (BENAVIDES; VALDERRAMA; STREICKER, 2016; DE ANDRADE et al., 2016), sugerindo que tanto a exposição de morcegos a vírus transmitidos pelo sangue de suas presas quanto a exposição de presas a vírus liberados na saliva de morcegos são prováveis. Vírus excretados pelas de fezes de morcegos vampiros também podem ser transmitidos às presas por contato direto durante a alimentação ou por contaminação ambiental (BERGNER et al., 2021).

A capacidade única dos morcegos para voar pode ser um elo importante e anteriormente desconsiderado entre as mudanças de alcance causadas pelo clima e as mudanças futuras no viroma dos mamíferos. Mesmo os morcegos não migratórios podem viajar regularmente centenas de quilômetros durante a vida (ANCILLOTTO et al., 2016). Se o voo permite que os morcegos passem por mudanças de alcance mais rápidas do que outros mamíferos, supõe-se que eles conduzam a maioria das novas transmissões virais entre espécies e provavelmente tragam vírus zoonóticos para novas regiões (MORATELLI; CALISHER, 2015; SHIPLEY et al., 2019).

Os sistemas sociais dos *D. rotundus* têm efeitos importantes na dinâmica, estrutura e dispersão da população de vírus. Portanto, informações

sobre o sistema social do morcego hematófago, organização espacial e conectividade da população são necessárias para uma melhor compreensão da dinâmica dos vírus (HUGUIN et al., 2018)

Existe um risco iminente de recombinação de material genético entre essas diferentes espécies de vírus que infectam morcegos, levando ao surgimento de novas espécies ou variantes. Este fato torna necessária uma vigilância epidemiológica constante nestes animais (CUPERTINO et al., 2022).

O vírus da raiva (RABV)

O vírus da raiva pertence a ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, do gênero *Lyssavirus*, com genótipos e variantes que apresentam diferenças quanto à patogenicidade, virulência e composição antigênica (TORDO et al., 1986).

O vírion tem formato de bala, com membrana plasmática recoberta por homotrímeros da glicoproteína (FOOKS et al., 2017). Apresenta genoma de RNA de fita simples, sentido negativo, com aproximadamente 12000 nucleotídeos, que codificam cinco proteínas: a RNA polimerase (proteína *L*), glicoproteína de superfície (proteína *G*), nucleoproteína (proteína *N*), fosfoproteína (proteína *P*) e proteína matriz (proteína *M*) (FIALLO-OLIVÉ et al., 2020)

A glicoproteína viral (*G*), forma projeções para fora do envelope lipídico, reconhece receptores celulares por interação direta e faz a intermediação para que ocorra a fusão da membrana celular com a proteína *M* para facilitar a entrada do vírus nas células (GUO et al., 2019). Também são responsáveis por induzir a produção de anticorpos neutralizantes, deste modo produzindo resposta imune mediada por células, conferindo ação neurotrópica ao vírus (WUNNER et al., 1988; BANYARD; TORDO, 2018).

A matriz (*M*), localizada abaixo da membrana viral que envolve o núcleo, 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 (GUO et al., 2019; FIALLO-OLIVÉ et al., 2020).

A nucleoproteína (N), que é um dos maiores componentes do vírus e a maior proteína interna do cilindro helicoidal, 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 (WUNNER et al., 1988).

A infecção viral é iniciada quando o vírus da raiva se liga a receptores celulares inoculados por meio de uma mordida ou arranhão do animal infectado na periferia e depois migra no transporte axonal rápido e retrógrado em neurônios até o sistema nervoso central (SNC), já que estes são altamente neurotrópicos (BANYARD; TORDO, 2018). Para isso, o vírus precisa de um mecanismo de tráfego e vários fatores intracelulares (TORDO et al., 1986).

O ciclo de vida do RABV é inteiramente citoplasmático. A entrada viral é iniciada pela interação entre os receptores celulares e a glicoproteína viral. Depois que o vírus se liga à membrana celular, ele entra na célula pela via endocítica (GUO et al., 2019). O ambiente de baixo pH nos endossomos precoces, induz mudanças conformacionais na proteína G, facilitando a fusão do envelope viral com a membrana endossomal. A partir daí, ocorre o desrevestimento do genoma viral, liberando o RNP viral no citosol (BANYARD; TORDO, 2018).

A transcrição ocorre em uma “fábrica de vírus” especializada, o corpúsculo de Negri, tendo a ribonucleoproteína como modelo (BANYARD; TORDO, 2018). A proteína G é translocada para o retículo endoplasmático, enquanto as outras proteínas virais são sintetizadas em ribossomos livres, próximos aos corpos de inclusão (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018). Após a replicação, os vírions intactos são montados com RNA genômico e proteínas nos corpos de inclusão - os corpos de Negri - e então liberados extracelularmente via brotamento (FIALLO-OLIVÉ et al., 2020).

Enquanto a infecção inicial é exclusivamente retrógrada, no estágio final da infecção, o RABV muda a direção e migra para fora do SNC de forma anteretrógrada em direção à periferia, especialmente para as glândulas salivares, onde o vírus pode ser transmitido pela mordida e reiniciar o ciclo (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).

A infecção inicial por RABV é assintomática e os sinais clínicos neurológicos estão presentes apenas nos estágios avançados da doença

(FOOKS et al., 2014, 2017). O quadro clínico deteriora rapidamente a saúde do hospedeiro e leva à morte por insuficiência respiratória ou cardíaca, geralmente de sete a dez dias. Alguns exemplos incomuns de sobrevivência foram relatados em humanos, mas as intervenções não se mostraram repetíveis (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

Dentro do gênero *Lyssavirus*, há 17 espécies virais diferentes, classificadas como entidades separadas de acordo com a divergência na sequência genômica. Atualmente, o gênero inclui: Aravan lyssavirus (ARAV), Australian bat lyssavirus (ABLV), Bokeloh bat lyssavirus (BBLV), Duvenhage lyssavirus (DUVV), European bat –1 lyssavirus (EBLV-1), European bat –2 lyssavirus (EBLV- 2), Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV), Ikoma lyssavirus (IKOV), Irkut lyssavirus (IRKV), Khujand lyssavirus (KHUV), Lagos bat lyssavirus (LBV), Lleida bat lyssavirus (LLEBV), Mokola lyssavirus (MOKV), Rabies lyssavirus (RABV), Shimoni lyssavirus (SHIBV), Taiwanese Bat Lyssavirus (TBLV), West Caucasian bat lyssavirus (WCBV) (FIALLO-OLIVÉ et al., 2020). O vírus da raiva clássico (RABV) é o mais conhecido e estudado e o único de abrangência mundial (GUNAWARDENA et al., 2016; RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017; SHIPLEY et al., 2019).

A Organização Mundial da Saúde e a Organização Mundial de Sanidade Animal consideram como raiva apenas a doença causada pelo genótipo do filogrupos I (RABV), classificando as demais como encefalites relacionadas e/ou como aparentadas aos vírus pertencentes às outras espécies (WHO, 2019b).

Existem dezenas de cepas de RABV, cada uma se associa intimamente a uma espécie de mamífero hospedeiro. Os mecanismos de transmissão e evolução podem diferir dentro de cada relação vírus-hospedeiro (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).

A raiva é endêmica no Brasil e o vírus pode ser isolado de espécies domésticas e silvestres, podendo ser caracterizadas antígenicamente e geneticamente (FAVORETTO et al., 2002). Com isso, 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* (FAVORETTO et al., 2002; KOTAIT et al., 2007).

Outros perfis antigênicos não determinados também foram descritos (FAVORETTO et al., 2002). Outros quatro padrões antigênicos não compatíveis com os conhecidos, encontrados em isolados de morcegos insetívoros dos gêneros *Eptesicus*, *Nyctinomys*, *Myotis* e *Lasiurus* (OLIVEIRA et al., 2010; MENOZZI et al., 2017) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e sagui (*Calithrix jacchus*) (FAVORETTO et al., 2006; CARNIELI et al., 2008; CORDEIRO et al., 2016).

Raiva: importância na saúde pública

A raiva acomete principalmente às ordens Carnivora e Chiroptera (BADRANE, 2001), transmitida intra e interespecífica para humanos e animais pela inoculação do vírus contido na saliva (PERES, 2008).

Todos os mamíferos são suscetíveis à infecção, o vírus da raiva (RABV) pode ter evoluído na ordem Chiroptera e depois se adaptado para a ordem Carnivora (BADRANE, 2001; FOOKS et al., 2014). Esses vários eventos de troca de hospedeiro, produziram um padrão complexo de variantes do vírus da raiva, tornando desafiador entender o que governa a transmissão e disseminação viral (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).

É uma encefalite aguda grave, considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas (HOTEZ et al., 2014) e grande problema de saúde pública e saúde animal, pois com exceção da Antártica, é endêmica em todos os continentes (HAMPSON et al., 2015).

Com uma taxa de mortalidade de quase 100%, é considerada uma doença 100% prevenível por vacina (BANYARD; TORDO, 2018). 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%) (WHO, 2019b). Menos de 0,05% das mortes estimadas ocorrem 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 (HAMPSON et al., 2015).

Em todo o mundo, o número de pacientes com raiva diminuiu. No Brasil, Isso está intimamente ligado à introdução de campanhas de vacinação

canina, obrigatória desde 1973 e à expansão da profilaxia pós-exposição (GAN et al., 2023). Alguns estados brasileiros, como Santa Catarina e Rio Grande do Sul, desde 1995 não realizam campanhas massivas de vacinação em cães e gatos (BRASIL, 2022b).

A epidemiologia desta zoonose se difere nos países dependendo da região geográfica (ANDERSON; SHWIFF, 2015). Devido a subnotificações e estimativas incertas, é possível que esse número seja uma subestimação bruta do verdadeiro ônus da doença (LAVAN et al., 2017).

A raiva é uma doença totalmente prevenível por meio de vacinação e imunoglobulinas. Após a agressão, o período de incubação é tipicamente de duas a oito semanas, embora possa variar de dias a anos. Uma vez que a infecção desenvolve sintomas, a raiva é sempre fatal. Portanto, medidas preventivas devem ser tomadas o mais rápido possível (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

Em muitos países em desenvolvimento, as mortes ocorrem principalmente devido à falta de acesso a agentes biológicos necessários para profilaxia pós-exposição eficaz (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). Tratar um caso de exposição à raiva, que tem custo médio de 40 dólares na África e 49 dólares na Ásia, e é de extrema dificuldade em populações que apresentam a renda média diária de um a dois dólares por pessoa (WORLD HEALTH ORGANIZATION).

A raiva afeta predominantemente populações pobres e vulneráveis com recursos de saúde pública inadequados e acesso limitado a tratamento preventivo (LAVAN et al., 2017). A doença representa uma carga social e econômica severa e duradoura. A falta de recursos e de infraestrutura de saúde pública limitada em muitos países endêmicos, para raiva impede a coleta e análise de dados (FOOKS et al., 2014).

Quanto maior o nível de índice sociodemográfico (SDI) (renda per capita, anos médios de educação, taxa de fertilidade), menor a taxa de incidência por idade da raiva. Em 2019, a região de baixo SDI tinha uma maior taxa de incidência por idade de 48,70/10.000.000, enquanto a região de alto SDI tinha apenas 0,14 (GAN et al., 2023).

Em 2018 foi criado o plano estratégico global “Zero by 30” para erradicar as mortes humanas de raiva transmitida por cães até 2030. O plano propôs três

objetivos que são: vacinas, medicamentos, ferramentas e tecnologias de forma eficaz, gerar, inovar e medir impacto; e manter o compromisso e os recursos (WHO, 2019a).

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 (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017). Nos últimos 30 anos, México, Costa Rica, Brasil e outros países da América do Sul reduziram consideravelmente a epidemia de raiva por causa de políticas governamentais e educação em saúde da população (GAN et al., 2023)

O DALYs (Disability Adjusted Life Years) representa a carga total de saúde de uma doença, que consiste em anos de vida perdidos devido à mortalidade prematura e anos de vida perdidos devido à incapacidade (HAMPSON et al., 2015). Em 2019, os DALYs globais relacionados à raiva foram 782.052,30 (GAN et al., 2023).

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 (WHO, 2019b). As perdas por mortes de animais de interesse zootécnico atingiram 512 milhões de dólares por ano, principalmente em países com economias dependentes da pecuária (HAMPSON et al., 2015).

Raiva no Brasil

No Brasil, a raiva foi descrita inicialmente em 1908 durante um surto da doenças em equinos e bovinos (CARINI, 1911), no estado de Santa Catarina e associando-se a possível relação deste surto com morcegos hematófagos (BRASIL, 2008; ALLOCATI et al., 2016). O primeiro relato de raiva associado a morcegos foi entre os anos de 1914 e 1916 no mesmo estado (HAUPT, H. & REHAAG, 1925).

Relatórios da Organização Pan-Americana da Saúde indicaram uma redução de 95% nos casos de raiva humana e canina nas Américas (WHO, 2019a). O impacto da doença na América do Sul é maior em bovinos do que em

outras espécies domésticas e está fortemente relacionado ao ciclo aéreo enzoótico da doença transmitida por morcegos hematófagos, e estes também têm um papel epidemiológico importante na transmissão da raiva para animais de estimação (BENAVIDES et al., 2017, 2020c). No Brasil, o RABV foi isolado de 41 das 167 espécies de morcegos descritas (DE ALMEIDA CAMPOS et al., 2020)

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituiu o Programa Nacional de Controle da raiva dos Herbívoros (PNCRH) (BRASIL, 2009). O PNCRH visa a vacinação estratégica de espécies susceptíveis e do controle populacional de seu principal transmissor, *D. rotundus*. A vacinação do rebanho é considerada compulsória, somente quando há ocorrência de focos da doença (BRASIL, 2009).

No período de 2010 a 2022, foram registrados 45 casos humanos. Desses, 20% (9/45) tiveram o cão como animal transmissor, 53,33% (24/45) morcegos, 8,88% (4/45) primatas não humanos, 8,88 (4/45) os felinos foram os transmissores, e 4,44% por raposa (2/45). Em dois casos não foi possível a identificação do animal agressor (BRASIL, 2023a). Na série histórica de casos de raiva humana no Brasil, apenas dois casos evoluíram para cura, os demais evoluíram para óbito (BRASIL, 2023a).

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 (BRASIL, 2014).

Em relação a raiva animal, o Brasil fez progressos expressivos na eliminação da raiva transmitida por cães nas últimas décadas, mas alguns casos ao longo dos anos ainda aconteceram. Em 2015, na fronteira do Brasil com a Bolívia, ocorreu uma epizootia canina e um óbito humano, transmitido por cão pela variante 1 (que circula na Bolívia), nos municípios de Corumbá e Ladário, no Mato Grosso do Sul (BENAVIDES et al., 2019a; BRASIL, 2019).

Desde 2016, os casos de raiva em cães e gatos têm sido identificados com variantes de morcegos e compatível com canídeos silvestres. Mesmo em um cenário de diminuição da raiva em cães e gatos, ainda assim, é importante que se monitore a circulação do vírus e principalmente, frente a um caso positivo

de raiva nessas espécies, a identificação da variante viral envolvida, permitindo que se tome as medidas de controle necessária em cada caso (BRASIL, 2022b).

É necessário ações de vigilância e cooperação permanentes e integradas entre os países fronteiriços, concentrando-se nos diferentes elos da cadeia epidemiológica de transmissão da raiva (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011).

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 (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011; VARGAS; ROMANO; MERCHÁN-HAMANN, 2019). Desde 2016 não há registro de casos de raiva transmitida pela variante do cão (BRASIL, 2023a), devido as ações de vigilância no país.

Desde 2004, observou-se uma mudança na dinâmica na ocorrência de casos humanos e no perfil epidemiológico da doença em relação ao animal agressor, onde os morcegos passaram a ser os principais transmissores da doença (BRASIL, 2022b).

Em 2017 foram registrados seis casos de raiva humana, todos pela variante 3 de morcegos hematófagos (*D. rotundus*). Cinco casos foram provocados por agressões diretas por morcegos, no município de Barcelos/AM; e os outros dois casos ocorreram nos estados da Bahia e do Tocantins. Em 2018, foram registrados 11 casos, destes, 10 relacionados a um surto em área ribeirinha em Melgaço/Pará, todos eles com histórico de espoliação por morcegos, e sem realização de profilaxia antirrábica pós-exposição. O décimo primeiro caso, foi em um homem residente no estado do Paraná, mas que foi espoliado por morcego em Ubatuba, no estado de São Paulo (BRASIL, 2023a). Nos demais anos, os casos de raiva em humanos foram transmitidos por felinos infectados com a variante 3, ocorrendo a transmissão secundária, o chamado “spillover” pontual.

O *D. rotundus* está se tornando relativamente comum em regiões com grandes rebanhos (BENAVIDES et al., 2020c), 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, densidade populacional das colônias (DE ANDRADE et al., 2016; BENAVIDES et al., 2017).

Estes geralmente selecionam as rotas mais curtas entre o poleiro e suas presas, muitas vezes viajando vários quilômetros só de ida para encontrar a presa (ROCHA et al., 2019), e embora uma colônia permaneça relativamente estável, eles visitam regularmente abrigos vizinhos dentro de uma área de atividade de 10 a 20 km² (DIAS et al., 2011).

Essa tendência de visitar colônias vizinhas promove a comunicação indireta entre quase todas as colônias dentro de uma área formando um conjunto ou rede definida (ROCHA et al., 2019; ROCHA; DIAS, 2020). Geralmente essa conexão é feita principalmente pelos machos jovens, que tendem a visitar outros abrigos para acasalamento (DELPIETRO et al., 2017), sendo a disseminação da raiva nessa espécie ocasionada principalmente pelo contato entre os indivíduos infectados de uma colônia e os indivíduos suscetíveis de outra (KOBAYASHI et al., 2008).

No caso específico de raiva transmitida por *D. rotundus* as áreas impactadas pelas atividades agrícolas podem produzir novas características ou variáveis (MESKE et al., 2021), que criam condições para o estabelecimento de áreas com diferentes graus de risco para a doença bovina (DE ANDRADE et al., 2016). Os animais silvestres, incluindo porcos selvagens, antas e veados não vacinados, podem representar um risco para a disseminação da doença (GALETTI et al., 2016).

A incidência da raiva é maior em bovinos e equinos e é responsável por enormes prejuízos econômicos na América Latina, com 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 impactando negativamente a pecuária nacional (TEIXEIRA et al., 2015).

O aumento da ocorrência 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 pelo *D. rotundus*, primatas não humanos (*Callithrix jacchus*) e canídeos selvagens (KOTAIT et al., 2007). 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 do campo”, *Pseudalopex vetulus* (FAVORETTO et al., 2013).

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 (BENAVIDES et al., 2019b). Também com a possibilidade da realização da prevenção pré-exposição dependendo dos fatores de risco envolvidos.

Em 2018 foram registrados 738.527 casos de atendimentos antirrâbicos pós-exposição no Brasil. O estado de São Paulo foi responsável por 17% das notificações, seguido de Minas Gerais 11% e Rio de Janeiro 8%. Os atendimentos foram mais frequentes no sexo masculino (52%), menores de 15 anos (30%) e residente em zona urbana (84%). O tipo de exposição mais frequente foi por mordedura (84%), sendo em membros inferiores (31%). Cabe ressaltar que, quando não houve a indicação para o uso do soro antirrábico no tratamento, foram utilizadas cerca de 45.000 ampolas, gerando custos ao SUS de aproximadamente 3 milhões de reais (MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

Das 23 unidades federadas que realizaram campanha nacional de vacinação contra a raiva em cães e gatos no ano de 2021, apenas 12 enviaram os dados da cobertura vacinal alcançada. Com base nesses dados, o Brasil apresenta uma cobertura vacinal de 60,4% (BRASIL, 2023a), inferior a recomendada pela OMS, que é de 70% da população canina (HAMPSON et al., 2015). Dados como esse fragilizam as medidas de controle preconizadas pelo Programa Nacional de Controle da Raiva a nível nacional.

Flavivírus: Definição e importância

Os vírus da família Flaviviridae (do latim *flavus*, amarelo), infectam uma gama de hospedeiros como aves, mamíferos, incluindo os seres humanos (GOULD; SOLOMON, 2008). O gênero flavivírus é o de maior importância para a saúde pública, considerados arbovírus emergentes (SIMMONDS et al., 2017; CARLSON et al., 2019). Estão distribuídos globalmente e infectam ao redor de 400 milhões de pessoas anualmente (PIERSON; DIAMOND, 2020).

A apresentação clínica da infecção por flavivírus em humanos, pode variar de doença leve, já que aproximadamente 50–80% das infecções são

assintomáticas e causam pouca ou nenhuma doença, ou episódios febris autolimitados (BLAHOVE; CARTER, 2021). Pode evoluir ainda para a doença grave e com risco de vida como febre hemorrágica, síndrome do choque, encefalite, paralisia, defeitos congênitos, hepatite e insuficiência hepática (DIRLIKOV et al., 2018; PIERSON; DIAMOND, 2018, 2020). As infecções individuais por flavivírus se enquadram em duas grandes categorias, visceral e neurotrópica, embora algumas tenham características de ambas, por exemplo, no caso de Zika vírus (PIERSON; DIAMOND, 2018).

O potencial epidêmico dos flavivírus reflete muitos fatores relacionados às características únicas de seus insetos vetores, as consequências da urbanização mal planejada que cria habitats ideais para reprodução de artrópodes, a expansão geográfica dos vetores, mudanças nas condições ambientais e extensas viagens globais (JONES et al., 2013; PIERSON; DIAMOND, 2020).

Os arbovírus prevalentes em todo o mundo englobam o Vírus da Dengue (DENV), Vírus da Febre Amarela (YFV), Vírus do Nilo Ocidental (WNV) e Zika (ZIKV) (GOULD et al., 2017), que são transmitidos por mosquitos hematófagos pertencentes à família *Culicidae*, principalmente dos gêneros *Culex* e *Aedes* (GUBLER, 2002).

Os flavivírus são vírus de RNA de fita simples e sentido positivo, esféricos, com envelope lipídico, de 40 a 60nm de diâmetro (GOULD; SOLOMON, 2008) contendo de 9.200 a 11.000 nucleotídeos (VAN LEUR et al., 2021). O genoma apresenta uma única sequência aberta de leitura, em inglês “Open Reading Frame” (ORF), que codifica uma poliproteína, com aproximadamente 3400 aminoácidos, que ao ser processada por proteases gera 10 proteínas, sendo 03 estruturais: proteína do Capsídeo (C), proteína de Membrana (M) e uma glicoproteína de Envelope (E); e 07 não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016; SIMMONDS et al., 2017), que desempenham funções reguladoras e de expressão do vírus, como replicação, virulência e patogenicidade (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

As proteínas NS são responsáveis e indispensáveis para a correta replicação do RNA viral e também auxiliam na montagem viral e no escape da resposta imune do hospedeiro (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016).

A glicoproteína NS1 é a principal proteína do flavivírus, antagonicamente relacionada à ativação e evasão do sistema complemento (CONDE et al., 2017). É necessária no processo de multiplicação do RNA viral, possui quatro atividades enzimáticas, serino protease, NTPase, helicase e RTPase, e é encontrada em grande quantidade retida no interior das células infectadas (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016). A NS2A participa da morfogênese e também antagonista de interferon (IFN) e NS2B apresenta atividade proteolítica e ambas são dois polipeptídeos hidrofóbicos, clivados por proteases virais (GOULD; SOLOMON, 2008).

A NS3, possui várias atividades enzimáticas envolvidas no processamento da poliproteína resultante da transcrição do genoma viral, bem como na sua replicação (VAN LEUR et al., 2021). A NS5 é muito conservada e multifuncional. Está envolvida na replicação do genoma viral, uma vez que possui atividade de RNA-polimerase e são responsáveis em parte pela organização da membrana levando à formação do complexo de replicação viral (MOUREAU et al., 2007; VAN LEUR et al., 2021).

O ciclo replicativo tem seu início com a ligação entre o vírus e a célula-alvo, que são os monócitos, macrófagos e células dendríticas, sendo um ponto crítico da determinação do tropismo celular, assim como da patogênese viral (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

O vírus se liga, por intermédio da proteína E, aos receptores na superfície celular e é, então, absorvido por endocitose em vesículas recobertas de clatrina ocorrendo desnudamento (VAN LEUR et al., 2021). O baixo pH do endossoma induz a fusão do envelope do vírus com membranas celulares, provocando mudanças conformacionais da proteína E, para, então, liberar o nucleocapsídeo no citoplasma. Após a decapsidação, o genoma de RNA é liberado para o citoplasma. As partículas virais se agrupam no retículo endoplasmático e são liberadas por exocitose após o transporte pela rede trans-Golgi (CONDE et al., 2017).

Os flavivírus consistem em um grupo de mais de 70 membros diferentes antigenicamente relacionados (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016). A maioria são transmitidos por artrópodes hematófagos como mosquitos ou carrapatos infectados. Cerca de 50% dos flavivírus conhecidos são transmitidos por mosquitos, 28% são transmitidos por carrapatos e o restante transmitidos entre

roedores ou entre morcegos sem vetores artrópodes conhecidos (IGTV, ; SIMMONDS et al., 2017).

A evolução e a epidemiologia dos flavivírus são amplamente determinadas pelas necessidades epidemiológicas entre seus hospedeiros invertebrados e vertebrados (GOULD; SOLOMON, 2008). Assim como a rápida adaptação do vírus ao ambiente alterado e em mudança, a distribuição geográfica diversificada e a falta de abordagens efetivas de controle de vetores levaram ao sério risco global das doenças associadas aos flavivírus (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016).

Infectam vários hospedeiros vertebrados, como mamíferos e aves, incluindo o ser humano (GOULD; SOLOMON, 2008; PIERSON; DIAMOND, 2020). Esses hospedeiros vertebrados podem constituir importantes reservatórios estáveis e contribuir para a definição de condições que propiciem a introdução de novas espécies virais e a transmissão entre humanos (PIERSON; DIAMOND, 2020).

Nos vetores artrópodes, os vírus também podem ser transmitidos por via transovariana ou vertical, no caso dos mosquitos e carrapatos, e transestadialmente em carrapatos (AGUILAR-SETIÉN et al., 2008).

A maioria dos membros do gênero *Flavivirus* são importantes patógenos humanos e veterinários, e este é um dos gêneros virais mais estudados em morcegos (TORRES-CASTRO et al., 2021). Muitos flavivírus foram isolados de morcegos naturalmente infectados (FAGRE; KADING, 2019).

Apesar dos nichos ecológicos compartilhados entre morcegos e muitos artrópodes hematófagos como por exemplo, carrapatos e mosquitos, conhecidos por desempenhar um papel na transmissão de arbovírus importantes para a saúde pública, o conhecimento sobre o potencial dos morcegos como reservatórios de arbovírus é limitado (FAGRE; KADING, 2019; CUPERTINO et al., 2022) .

Membros da ordem *Chiroptera* foram descritos como hospedeiros naturais de vírus emergentes que acometem humanos. É possível que algumas espécies de morcegos sejam suscetíveis às essas importantes arboviroses como o vírus da dengue, em que estes possam desempenhar um papel de conservação na natureza (AGUILAR-SETIÉN et al., 2008). O vírus da febre amarela, descrito em algumas espécies de morcegos (KADING et al., 2018;

FAGRE; KADING, 2019; CUPERTINO et al., 2022). Entretanto esses dados sobre o morcego hematófago *D. rotundus* são escassos.

Flavivírus no Brasil

Dengue

A dengue é uma doença infecciosa viral, com apresentação clínica febril aguda causada por um vírus pertence à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivírus* (GOULD; SOLOMON, 2008). Tem ampla distribuição no Brasil, ocorrendo de forma endêmica com surtos, muito relacionados com as condições climáticas, especialmente nas estações mais chuvosas e quentes do ano, devido a ecologia do vetor (FIGUEIREDO, 2019)

O vírus da dengue apresenta quatro sorotipos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, muito bem documentados no ciclo urbano e é endêmica em mais de 100 países na maioria das áreas tropicais e subtropicais (YANG et al., 2021), sendo os humanos seus hospedeiros. É considerada como uma das principais doenças tropicais negligenciadas no mundo (HOTEZ et al., 2014). Cerca de 500 milhões de pessoas nas Américas correm o risco de contrair a doença, e é a arbovirose mais prevalente no continente (MESSINA et al., 2019; OPAS, 2023a).

O ciclo silvestre só foi registrado na África e na Ásia com cinco sorotipos reconhecidos, os quatro do ciclo urbano e o DENV-5 (MUSTAFA et al., 2015). Este envolve primatas não humanos como hospedeiros e tem sido sugerido um papel secundário de outros mamíferos como hospedeiros, incluindo os morcegos (HERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2021).

São classificados como arbovírus (FIGUEIREDO, 2019), transmitidos pela fêmea do mosquito do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* seu principal vetor, estando presente em quase todos os países do hemisfério, exceto Canadá e Chile continental. É um mosquito doméstico, que vive dentro e no peridomicílio das casas, que se reproduz em qualquer recipiente artificial ou natural que contenha água parada. Caracterizado por ser um vetor antropofílico (MESSINA et al., 2019).

No Brasil, os primeiros relatos de dengue são do final do século XIX, no Paraná e no início do século XX no Rio de Janeiro. No início do século XX, o

mosquito já era um problema de saúde pública por conta da febre amarela (BRAGA; VALLE, 2007). A primeira epidemia do vírus no país, documentada clínica e laboratorialmente, aconteceu em 1982, em Boa Vista (RR), causada pelos vírus DENV-1 e DENV-4. Posteriormente, em 1986, houve uma intensa circulação viral em grandes centros urbanos, com epidemias no Rio de Janeiro e em algumas capitais do Nordeste (MS/SVS, 1999).

A introdução dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 ocorreu também no Rio de Janeiro, em 1990 e 2000 respectivamente. O DENV-3 apresentou rápida dispersão para 24 estados do país no período de 2001-2003 (BRAGA; VALLE, 2007). O DENV-4 foi reintroduzido no país em 2010 no estado de Roraima, se espalhando para o restante do país. Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, endêmica ou epidemicamente (MS/SVS, 1999).

A expansão da dengue para áreas consideradas livres, vem ocorrendo devido a intensa movimentação humana e expansão dos vetores para novas regiões (YANG et al., 2021). A proliferação ampliada dos vetores precede e permite a expansão global e a transmissão local do vírus da dengue em áreas altamente urbanizadas, considerando-se suas características antropofílicas (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Estimativas recentes indicam 390 milhões de casos de infecções por dengue por ano, dos quais 96 milhões se manifestam clinicamente, com qualquer gravidade da doença (OPAS, 2023a). As mortes atribuíveis à dengue aumentaram de 28.152 em 1990 para 36.055 em 2019 mundialmente. O tempo de vida perdido devido à morte prematura e incapacidade, os DALYs, em geral aumentaram ligeiramente de 2.347.000 anos em 1990 para 2.383.400 anos em 2019 (YANG et al., 2021).

No Brasil, no ano de 2022 ocorreram 1.450.270 casos prováveis de dengue com uma taxa de incidência de 679,9 casos por 100 mil habitantes. Em comparação com o ano de 2019, houve redução de 6,2% de casos registrados para o mesmo período analisado. Quando comparado com o ano de 2021, ocorreu um aumento de 162,5% casos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b). Foram confirmados 1.473 casos de dengue grave e 18.145 casos de dengue com sinais de alarme. Ressalta-se que destes, 630 casos permanecem em investigação (OPAS, 2023a).

Febre Amarela

A febre amarela é considerada como uma febre hemorrágica viral, transmitida por mosquito que ocorre em regiões tropicais e subtropicais da África, América do Sul e Central (RENO et al., 2020). Atualmente, 44 países tem o risco de transmissão com epizootias silvestres intermitentes, casos esporádicos e surtos urbanos, onde 40 são considerados os mais vulneráveis, sendo 13 nas Américas e 27 na África (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Embora a maioria das infecções seja assintomática, o vírus da febre amarela causa uma doença febril aguda que pode resultar em hepatite, insuficiência renal, hemorragia e choque. A infecção é fatal em 20-60% dos casos sintomáticos graves (PIERSON; DIAMOND, 2020).

Os primeiros relatos de febre amarela no Brasil, datam de 1849, na capital do império brasileiro, relacionado à chegada de um navio negreiro procedente de Nova Orleans, tendo feito escalas em Havana e Salvador antes de atracar no Rio de Janeiro. Em fevereiro de 1850 a febre amarela já havia se disseminado e segundo estimativas, atingiu 90.658 dos 266 mil habitantes do Rio de Janeiro, causando 4.160 mortes (BENCHIMOL, 1994).

A principal espécie relacionada à transmissão da febre amarela no meio urbano é o mosquito *Aedes* spp, podendo também ser transmitido pelas espécies *Haemagogus* e *Sebethes* (GOULD; SOLOMON, 2008; DOUAM; PLOSS, 2018), no ciclo silvestre (DOUAM; PLOSS, 2018).

A febre amarela circula principalmente em um ciclo silvestre, entre mosquitos e primatas não humanos (RENO et al., 2020). No entanto, a invasão humana em áreas mais rurais pode introduzir o vírus da febre amarela em áreas urbanizadas caracterizado como ciclo urbano, resultando na circulação viral entre humanos por meio de mosquitos antropofílicos (DOUAM; PLOSS, 2018; BLAHOVE; CARTER, 2021).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, OPAS, o número de casos humanos confirmados no Brasil entre 1960 e 2022 são de 3443 casos e 1192 mortes por febre amarela. No mesmo período nas Américas, o total foi de 9397 casos, levando a 3315 óbitos (WHO, 2023).

No caso do Brasil, nos últimos três anos, houve uma expansão histórica do vírus causador da doença. O país tem um padrão sazonal, com

maior transmissão entre dezembro e maio. Porém, as epizootias com mortes de macacos notificadas ao longo de 2018 mostraram que a circulação do vírus da febre amarela continuou durante o período de baixa transmissão, de junho a novembro (DOUAM; PLOSS, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

No período de 2017/2018, foi registrado um dos eventos mais expressivos da história da doença no Brasil. A dispersão do vírus alcançou a costa leste brasileira, na região do bioma Mata Atlântica, que abriga uma ampla diversidade de primatas não humanos e de potenciais vetores silvestres, e onde o vírus não era registrado há décadas (BRASIL, 2023b).

Foram considerados os surtos mais significativos dos últimos 70 anos. De dezembro de 2016 a junho de 2019, mais de 15.000 epizootias em primatas não humanos foram relatadas no Brasil, em áreas silvestres, rurais e urbanas. Exames laboratoriais ou critérios epidemiológicos confirmaram pelo menos 1.567 epizootias causadas por febre amarela, em 455 municípios, nas regiões Sudeste com 90,9% dos casos e nas demais regiões Sul, Nordeste, Centro-Oeste e Norte (SILVA et al., 2020)

O Brasil, apresenta fator de risco para a reurbanização da febre amarela, pois, devido a expansão territorial da infestação do *Aedes aegypti*, já foram detectados em todas as Unidades Federadas, áreas infestadas pelos vetores superpostas a áreas de circulação do vírus, áreas urbanas infestadas próximas de áreas de risco para febre amarela silvestre, e intenso processo migratório rural-urbano, levando à possibilidade de importação do vírus dos ambientes silvestres para os urbanos (BRASIL, 2023b)

Durante o período de monitoramento em 2022, foram notificados 686 eventos envolvendo primatas não-humanos mortos e/ou doentes suspeitos de Febre Amarela. Desse total, apenas dois casos (0,3%) foram confirmados por critério laboratorial (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b).

Foram notificados 158 casos humanos suspeitos, mas nenhum foi confirmado no ano de 2022. As transmissões do vírus em primatas foram registradas nos estados de Minas Gerais e no Paraná, sinalizando a circulação ativa do vírus nas regiões Sudeste e Sul. Porém, dia 27 de janeiro de 2023, o Estado de São Paulo registrou o primeiro caso de Febre Amarela desde 2020, em morador da zona rural da cidade de Vargem Grande do Sul, cidade que faz divisa com o Estado de Minas Gerais. Tal fato, reforça a importância da vigilância

devido ao risco de transmissão às populações humanas, em casos que antecedem primeiro aos animais e extravasam para a população humana (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b).

Zika Vírus

O Zika Vírus (ZIKV) é um Flavivírus transmitido principalmente pela picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado (BLAHOVE; CARTER, 2021). Além da transmissão mosquito-humano, por meio de transmissão intrauterina resultante da infecção congênita, transmissão intraparto da mãe virêmica para o recém-nascido, transmissão sexual, transfusão de sangue e exposição laboratorial (FREITAS et al., 2020; PIELNAA et al., 2020)..

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em macacos na floresta Zika de Kampala, Uganda no ano de 1947. O primeiro isolamento humano do ZIKV foi relatado na Nigéria em 1953. Desde então, o ZIKV expandiu sua abrangência geográfica para vários países da África, Ásia, Oceania e Américas.

O ZIKV chegou ao Brasil provavelmente devido a globalização, que facilita o deslocamento de indivíduos infectados. No país, existe um histórico de epidemias por arboviroses decorrente tanto das condições socioeconômicas quanto do clima predominantemente tropical, extensas áreas de matas e regiões pantanosas, fechadas e de caatinga (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Esses tipos de ambientes contribuem para a proliferação persistente de vetores, principalmente do gênero *Aedes*, em ambientes urbanos, contribuindo para a disseminação do ZIKV para outras regiões do Brasil (FIGUEIREDO, 2019).

O maior surto de ZIKV da história ocorreu em maio de 2015 no Nordeste do Brasil, onde o Ministério da Saúde estimou a ocorrência de 440.000 a 1.300.000 casos de suspeita da doença causada pelo patógeno (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). Nesse período, foi detectada a associação da doença com a síndrome de Guillain-Barré (DIRLIKOV et al., 2018) e, em outubro, observou-se a associação entre a infecção e malformações do sistema nervoso central ao nascimento, incluindo microcefalia (KLEBER DE OLIVEIRA et al., 2016).

O comitê de emergência da Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a doença como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional em fevereiro de 2016 (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016).

Após esse período, houve uma diminuição acentuada nos casos relatados em 2017, o que provavelmente é atribuído ao efeito da imunidade coletiva (PIERSON; DIAMOND, 2018). Estudos de soroprevalência sugerem que 63% dos habitantes de Salvador, Brasil, foram infectados durante esse surto (NETTO et al., 2017)

No ano de 2022, um total de 9204 casos foram diagnosticados no país. Houve um aumento de 42% no número de casos comparado à 2021. No período, foi confirmado um óbito por zika, no estado de Goiás. Foram registrados 591 casos prováveis em gestantes. A região Nordeste apresentou maior incidência da doença (13,3 casos/100 mil hab.) (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b).

Alphavirus: Definição e importância

Alphavirus é o único gênero da família *Togaviridae* (CHEN et al., 2018), são vírus transmitidos por mosquitos e outros insetos hematófagos, como carrapatos, piolhos e percevejos (LIM et al., 2018). Considerados arbovírus emergentes, associados a importantes patógenos humanos e veterinários de interesse para a saúde pública (MOREIRA MARRERO et al., 2022).

Causam uma ampla variedade de doenças em humanos, variando de doença febril a sintomas clínicos mais graves (SKIDMORE; BRADFUTE, 2023). Esses vírus são categorizados em grupos com base em sua relação genética e manifestações clínicas. Alphavirus artritogênicos, incluindo vírus chikungunya (CHIKV), vírus Ross River (RRV), vírus O'nyong'nyong (ONNV), vírus Barmah Forest (BFV), vírus Mayaro (MAYV) e vírus Sindbis (SINV), causam doenças musculoesqueléticas que se caracteriza por febre, exantema, artralgia, mialgia, miosite e poliartrite aguda e crônica (POWERS et al., 2001; KIM; DIAMOND, 2022; DE SOUZA et al., 2023).

Alphavirus encefálicos, incluindo o vírus da encefalite equina oriental (EEEV), o vírus da encefalite equina ocidental (WEEV) e o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), infectam células do sistema nervoso central e causam meningite e encefalite, geralmente com sequelas neurológicas

debilitantes de longo prazo (KIM; DIAMOND, 2022; MOREIRA MARRERO et al., 2022).

Os Alphavirus são mantidos na natureza principalmente em ciclos de transmissão silvestre. Os vetores e espécies hospedeiras são variados, implicando na sua distribuição geográfica para causar surtos em humanos (HOLMES et al., 2020). Pelo menos um Alphavirus está presente em todos os continentes povoados e estão continuamente emergindo em novos territórios e hospedeiros (SKIDMORE; BRADFUTE, 2023). São amplamente distribuídos por todo o mundo, habitando todos os continentes, exceto a Antártica (POWERS et al., 2001).

São transmitidos por vetores que geralmente requerem o uso de uma espécie intermediária para transmitir a um hospedeiro vertebrado. O gênero *Aedes* é o principal transmissor das arboviroses no mundo (BURKETT-CADENA; VITTOR, 2018; LIM et al., 2018). Hospedeiros vertebrados incluem humanos, primatas não humanos, equídeos, aves, anfíbios, répteis, roedores e suínos. Dois Alphavirus aquáticos, que infectam mamíferos marinhos e peixes até o momento foram relatados (CHEN et al., 2018).

São vírus pequenos e envelopados com genoma de RNA fita simples e sentido positivo, linear, de 10.000 a 12.000 nucleotídeos (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Os virions são partículas esféricas envelopadas com cerca de 60 a 70nm de diâmetro, com capsídeo de simetria icosaédrica envolto com espículas na superfície (CHEN et al., 2018).

O genoma dos Alphavirus codifica 8 genes. Destes, quatro proteínas não estruturais (codificadas na ordem nsP1-nsP4), importantes no genoma, onde que medeiam a tradução viral (CHEN et al., 2018), a replicação viral, do material genético do vírus através da formação de complexos RNA replicase que se associam a membrana da célula do hospedeiro e posteriormente se fusionam com endossomos, formando vacúolos, além de atuarem na evasão da resposta imune (HOLMES et al., 2020; SKIDMORE; BRADFUTE, 2023).

As proteínas estruturais são codificadas na ordem capsídeo (C), E1 e E2 (glicoproteínas de envelope), além dos peptídeos E3 e 6K (CHEN et al., 2018), que atuam como peptídeo sinais para as glicoproteínas E2 e E1, respectivamente, e podem ter funções relacionadas a etapa de liberação de partículas virais maduras pela célula hospedeira (SKIDMORE; BRADFUTE,

2023). A proteína Alphavirus E2 facilita o envolvimento do receptor, enquanto E1 medeia principalmente a fusão da membrana após a entrada viral (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

A variabilidade genética e a adaptabilidade dos Alphavirus, juntamente com as modificações antropogênicas do habitat e mudanças climáticas, são fatores que podem alterar seu nicho ecológico, levando a eventos de emergência ou reemergência viral (MOREIRA MARRERO et al., 2022; GARCÍA-ROMERO et al., 2023).

Alphavirus no Brasil

Vírus Chikungunya (CHIKV)

O vírus Chikungunya (CHIKV) é uma grande ameaça à saúde pública mundial (DE SOUZA et al., 2023), caracterizado por sinais e sintomas agudos e crônicos, artralgia grave e crônica, podendo levar a complicações neurológicas e pode ter evolução fatal (SUHRBIER, 2019; SKIDMORE; BRADFUTE, 2023).

O vírus Chikungunya foi isolado pela primeira vez após uma epidemia de 1952-1953 na atual Tanzânia (WEAVER; LECUIT, 2015). Depois de causar várias epidemias na África e na Ásia, muitas delas envolvendo centenas de milhares de pessoas, foi relatada pela primeira vez na ilha de Saint Martin, no Caribe, em outubro de 2013 e, no final de 2015, a transmissão havia sido relatada em mais de 50 territórios (MARCONDES et al., 2017).

A transmissão ocorre principalmente entre humanos pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (NSOESIE et al., 2016), amplamente distribuídos no Brasil (DE SOUZA et al., 2023).

Durante os últimos 20 anos, mais de 10 milhões de casos de chikungunya foram relatados em mais de 125 países. Estima-se que 1,3 bilhão de pessoas vivam em áreas de risco de transmissão do CHIKV (NSOESIE et al., 2016) e muitas outras partes do mundo podem se tornar adequadas para a transmissão do CHIKV devido à mudança climática que aumenta a distribuição do *Ae aegypti* (BURKETT-CADENA; VITTOR, 2018).

Atualmente, o CHIKV é classificado em três genótipos principais: os genótipos asiático, oeste africano e asiático e centro-leste da África do Sul (ECSA), mas uma nova linhagem, a Linhagem do Oceano Índico (IOL), também

emergiu do genótipo ECSA durante a epidemia de 2004-2019 (DE SOUZA et al., 2023).

O CHIKV foi introduzido duas vezes no Brasil. Em 2013, a linhagem asiática do CHIKV entrou no norte, estado do Amapá, enquanto as linhagens leste, central e sul da África (ECSA) foram identificadas de forma independente em 2014 e relatadas no estado da Bahia (NUNES et al., 2015). Uma sequência de surtos de CHIKV tem atingido diferentes regiões do Brasil (FIGUEIREDO, 2019). Atualmente, todos os estados registram transmissão desse arbovírus e detém o maior número de casos das Américas (OPAS, 2023b).

Em 2022, os casos de chikungunya notificados foram acima da média dos últimos 4 anos (2018-2021), com um total de 263.685 casos de chikungunya, incluindo 87 mortes, reportados na Região das Américas, representando um aumento de 2 vezes nos casos e um aumento de 7 vezes nas mortes em comparação com 2021 (OPAS, 2023b). Destes, 174.517 aconteceram no Brasil (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b).

Até março de 2023, um total de 35.566 casos prováveis e confirmados de chikungunya foram reportados no Brasil, incluindo uma morte confirmada, reportada no Espírito Santo e 13 mortes sob investigação. Durante o mesmo período, a taxa de incidência cumulativa nacional representou um aumento relativo de 109,6% em relação ao mesmo período de 2022 (OPAS, 2023b).

Nas populações urbanas, durante os períodos epidêmicos, o vírus é mantido pela transmissão mosquito-homem-mosquito. Porém ainda há uma lacuna sobre os possíveis vertebrados que possam estar envolvidos nos ciclos de manutenção do CHIKV (MARCONDES et al., 2017; CELONE et al., 2021; PANDIT et al., 2022).

Vírus Mayaro (MAYV)

A infecção causada pelo vírus Mayaro (MAYV) é considerada uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e uma zoonose que representa um importante desafio de saúde pública (GANJIAN; RIVIERE-CINNAMOND, 2020).

Foi isolado pela primeira vez em Trinidad, em 1954, e o primeiro surto no Brasil foi descrito em 1955, às margens do rio Guamá, próximo de Belém/PA.

Desde então, casos esporádicos e surtos localizados têm sido registrados nas Américas, incluindo a região Amazônica do Brasil, principalmente nos estados das regiões Norte e Centro-Oeste (LOPEZ; NOZAWA; LINHARES, 2014).

A distribuição geográfica do MAYV tem sido associada aos genótipos D e L. O genótipo D foi relatado no Planalto Central e nas regiões da Amazônia brasileira, bem como no Peru, Bolívia, Venezuela, Colômbia, Argentina e Trinidad (LORENZ; FREITAS RIBEIRO; CHIARAVALLOTI-NETO, 2019). Por outro lado, o genótipo L ocorre apenas na região amazônica do estado brasileiro do Pará. O Brasil é o país com maior número de casos notificados (GANJIAN; RIVIERE-CINNAMOND, 2020; LIMA et al., 2021).

O ciclo epidemiológico do vírus Mayaro (MAYV) se assemelha ao da Febre Amarela, transmitidos principalmente por mosquitos do gênero *Haemagogus*, com hábitos estritamente diurnos e que vivem nas copas das árvores, o que favorece o contato com os hospedeiros animais (CELONE et al., 2021). Outros gêneros de mosquitos hematófagos podem participar do ciclo, como *Culex*, *Sabethes* e *Aedes* (FIGUEIREDO, 2019; GARCÍA-ROMERO et al., 2023)

Os primatas não-humanos são os principais hospedeiros além de outros hospedeiros vertebrados como pássaros, marsupiais, xenarthras (preguiças, tamanduás e tatus) e roedores, que podem atuar na amplificação. O homem é considerado um hospedeiro acidental (CELONE et al., 2021).

A manifestação clínica é difícil de distinguir de outras arboviroses como dengue, Zika e chikungunya (LORENZ; FREITAS RIBEIRO; CHIARAVALLOTI-NETO, 2019). Os sintomas clínicos da febre de Mayaro tendem a ser inespecíficos e incluem febre alta, artralgia debilitante, dor de cabeça, dor retro orbitária, mialgia, vômito, diarreia e erupção cutânea maculopapular, muitas vezes com sangramento. Semelhante à chikungunya, a infecção por MAYV pode levar ao desenvolvimento de artralgia de longo prazo (FIGUEIREDO, 2019; LIMA et al., 2021).

A taxa de letalidade da febre Mayaro ainda precisa ser determinada (GANJIAN; RIVIERE-CINNAMOND, 2020) e com isso há subnotificação de casos de MAYV. Essa subnotificação ocorre para a maioria dos patógenos transmitidos por vetores, especialmente para aqueles de doenças tropicais negligenciadas (LORENZ; FREITAS RIBEIRO; CHIARAVALLOTI-NETO, 2019)

Alguns estudos têm mostrado casos de coinfecção entre MAYV e outros arbovírus, como o Vírus da Dengue, Chikungunya e Zika (DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2022).

Há riscos para potencial urbanização da doença (HOTEZ; MURRAY, 2017; PLOWRIGHT et al., 2017). Para isso dois fatores são fundamentais: o contato da população urbana com mosquitos transmissores e a presença de hospedeiros amplificadores nas grandes cidades (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). O papel de hospedeiros amplificadores poderia ser desempenhado por primatas que vivem em áreas urbanas e as aves também surgem como possíveis hospedeiros amplificadores secundários (FIGUEIREDO, 2019).

Vírus da Encefalite Equina

As encefalites equinas são doenças infectocontagiosas zoonóticas, de caráter agudo, com uma grande variedade de hospedeiros e reservatórios, incluindo aves e mamíferos, e que apresentam intenso tropismo pelo sistema nervoso central (GO; BALASURIYA; LEE, 2014).

São compostos pelos vírus da encefalite equina leste (EEEV), vírus da encefalite equina oeste (WEEV), vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), que são transmitidos por artrópodes e moscas hematófagas (CHEN et al., 2018).

Os equinos são amplificadores do vírus e por isso é um elemento importante para prevenir o risco em humanos. Animais como aves e morcegos podem atuar como reservatórios e têm papel importante na transmissão do vírus. Os morcegos do gênero *D. rotundus* são considerados os mais vulneráveis a contrair EEV (GUPTA et al., 2021).

Alphavírus como EEEV e VEEV são patogênicos para humanos e equinos e agrupam-se em vírus neurotrópicos de origem no Novo Mundo, com base em suas distribuições geográficas originais (MARCONDES et al., 2017).

Encefalite Equina do Leste (EEEV) é uma zoonose e dentre as encefalites, foi a primeira a ser detectada. É também a que apresenta maior letalidade em equinos que pode chegar a 80% a 90% e em humanos, cerca de 65% (MARCONDES et al., 2017), são mais invasivos e neurovirulentos em idosos e crianças (GO; BALASURIYA; LEE, 2014)

O ciclo de transmissão do EEEV primariamente ocorre entre aves e mosquitos. O ser humano e o equino são hospedeiros acidentais e não contribuem para a manutenção dos vírus (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Na América do Sul, o EEEV enzoótico é amplamente distribuído na maioria das áreas de florestas tropicais, na Bacia Amazônica no Brasil e no norte da Argentina (DA SILVA SENA NUNES et al., 2021).

O vírus da Encefalite Equina Oeste (WEEV) foi isolado em 1938, na região oeste dos Estados Unidos. Há identificação de diversos subtipos, porém, só o subtipo clássico possui importância epidemiológica (GO; BALASURIYA; LEE, 2014).

O ciclo básico da WEEV é mantido em um ciclo enzoótico entre aves domésticas e silvestres, que atuam como reservatórios e hospedeiros amplificadores naturais e vetores do gênero *Culex* (BURKETT-CADENA; VITTOR, 2018). Também foi sugerido que lagomorfos e roedores podem servir como hospedeiros de amplificação quando são infectados com WEEV por mosquitos *Aedes* (GO; BALASURIYA; LEE, 2014; MARCONDES et al., 2017).

Humanos e equinos são hospedeiros acidentais, que apresentam viremia com títulos baixos. O vírus da EEO já foi isolado no Brasil, em vetores, na Floresta da Tijuca, no Rio de Janeiro, e em algumas oportunidades foram encontrados anticorpos em equinos e humanos (ZORAIDA et al., 2000).

O vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) é um dos Alphavirus mais importantes de equinos e humanos, e tem sido descrita como uma das principais doenças emergentes de animais e humanos das Américas (GUZMÁN et al., 2019; GARCÍA-ROMERO et al., 2023). Não foram notificados casos no Brasil (BRASIL, 2022a).

Surtos de doença febril tem sido frequentemente descrito na América Latina nas últimas décadas, envolvendo milhares de equinos e humanos. São classificados seis subtipos (I a VI), sendo que algumas variantes são chamadas de epizooticas e enzoóticas (POWERS et al., 2001).

O ciclo de transmissão enzoótica do VEEV é mantido entre roedores e outros vertebrados, como morcegos e gambás e mosquitos do subgênero *Culex* como vetores primários (GUZMÁN-TERÁN et al., 2020). Os equinos, nesta enfermidade, são amplificadores dos vírus e há, ainda, relatos de isolamento destes subtipos em cerca de 30 outras espécies de mamíferos (SOTOMAYOR-

BONILLA et al., 2017). Os morcegos podem atuar como hospedeiros alternativos para manutenção da circulação viral da VEEV (GARCÍA-ROMERO et al., 2023).

Os vírus do gênero Alphavirus (família Togaviridae) já foram descritos em várias espécies de morcegos, descrevendo o isolamento do vírus, evidência molecular ou soroconversão, dentre eles, o vírus de Chikungunya, Vírus da encefalite equina oriental (EEEV), Vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), Vírus da encefalite equina ocidental (WEEV) (FAGRE; KADING, 2019).

Considerando os quirópteros como hospedeiros de agentes infecciosos de caráter zoonótico, o presente estudo avaliou o papel destes mamíferos na veiculação de diferentes patógenos virais de importância na saúde pública, que são responsáveis por inúmeros casos no Brasil e no mundo como o vírus da raiva e dos gêneros Flavivirus e Alphavirus. Os resultados obtidos, visam contribuir com as autoridades de saúde, para adoção de medidas de vigilância para o controle da ocorrência destas enfermidades, com foco principal na saúde única, já que envolve a saúde humana, animal e o meio ambiente.

CAPÍTULO 2

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1

Trabalho a ser enviado para a revista Plos Neglected Tropical Disease, ISSN 1935-2727, Fator de impacto 4,78, A1 QUALIS.

Vigilância epidemiológica e molecular do vírus da raiva em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* no estado de São Paulo, Brasil

Karine Bott Mantovan^{1*}, Benedito Donizete Menozzi¹, Guilherme Shin Iwamoto Haga², Anelise Salina¹, Helio Langoni^{1*}

¹Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*Autor de correspondência

E-mail: karinebott@gmail.com

Resumo

O vírus da raiva é uma das zoonoses de maior importância para a saúde pública e saúde animal. Todos os mamíferos são suscetíveis à infecção, mas poucos são capazes de atuar como reservatórios da doença a longo prazo. Os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* apresentam a maior carga da doença na América Latina, pois apresentam ecologia e características sociais excepcionais e têm papel importante na dinâmica da dispersão viral. O objetivo do estudo foi identificar a circulação do vírus rábico em *D. rotundus* nas áreas com histórico de forrageamento e casos positivos de raiva em animais de produção. Foram capturados 143 *D. rotundus* por meio de vigilância ativa, referentes a municípios do Estado de São Paulo, assim como coordenadas geográficas dos abrigos e características ecológicas. Destes, foram coletados material cerebral para reação de imunofluorescência direta e RT-PCR para pesquisa viral. Ambas as

técnicas diagnósticas foram negativas. As características dos abrigos evidenciaram que todos se encontravam em áreas de modificações antropogênicas como casas abandonadas e malha rodoviária. A infecção ativa é rara em *D. rotundus*, impedindo informações diretas sobre a incidência em nível populacional por meio de técnicas moleculares e estudos filogenéticos virais em determinados surtos. A vigilância epidemiológica na espécie *D. rotundus* deve ser mais difundida, para melhorar entendimento da base de transmissão do vírus da raiva entre os indivíduos e minimizar o transbordamento para os seres humanos e outras espécies.

Palavras-chave: morcegos; saúde pública; zoonoses; vírus da raiva

1. Introdução

O vírus da raiva, transmitido pelo morcego hematófago *D. rotundus*, trata-se do vírus zoonótico de morcego mais estudado e importante (STREICKER et al., 2012a). A raiva é considerada um grande problema de saúde pública e para o desenvolvimento agrícola em toda a América Latina, com surtos de raiva humana e animal (BLACKWOOD et al., 2013; BENAVIDES et al., 2017). As perdas na produção pecuária ultrapassam US\$ 50 milhões anuais, sem incluir grandes investimentos em prevenção, vigilância e controle (STREICKER et al., 2019).

Todos os mamíferos são suscetíveis à infecção, mas poucos são capazes de atuar como reservatórios da doença a longo prazo. Os *D. rotundus* apresentam características ecológicas e comportamentos sociais que favorecem a dinâmica de transmissão, persistência viral e disseminação nas populações do vírus rábico (DELPIETRO; MARCHEVSKY; SIMONETTI, 1992). Essas características são associadas ao altruísmo e coesão social (JOHNSON; ARÉCHIGA-CEBALLOS; AGUILAR-SETIEN, 2014; CARTER; LEFFER, 2015).

A espécie tem uma boa capacidade adaptativa e habitam uma variedade de nichos ecológicos, usando na maioria das vezes estruturas antropogênicas (KUZMIN et al., 2011; RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017; MANTOVAN et al., 2022). Essa capacidade é muito importante, pois aumenta a oportunidade de

interação entre os morcegos com animais domésticos e o ser humano (KUZMIN et al., 2011).

Em algumas áreas da América Latina, o aumento do desmatamento e a correspondente redução de populações de animais silvestres desencadearam um aumento na predação de *D. rotundus* no gado e com isso, os riscos de surtos da doença (BOTTO NUÑEZ; BECKER; PLOWRIGHT, 2019a).

A intensificação da produção de bovinos também aumenta o recurso alimentar (MENDOZA-SÁENZ et al., 2023), abundante e de fácil exploração, o que pode resultar em um aumento nas taxas de sobrevivência e na densidade populacional (DE ANDRADE et al., 2016).

A possibilidade do *D. rotundus* de controlar a infecção e a capacidade de dispersar o vírus rábico, as transmissões entre indivíduos e a persistência viral são pontos que ainda precisam ser avaliados (STREICKER et al., 2012a) já que a ecologia dos morcegos vampiros como alimentadores de sangue obrigatórios fornece uma rota de transmissão única para o vírus da raiva (JOHNSON; ARÉCHIGA-CEBALLOS; AGUILAR-SETIEN, 2014; HORTA et al., 2022). Assim, o risco de raiva humana transmitida por *D. rotundus* está intrinsicamente ligado às alterações ambientais que influenciam as estratégias de forrageamento dos morcegos e a prevalência da infecção (FOOKS et al., 2017).

A identificação dos fatores naturais e antropogênicos que impulsionam a prevalência da infecção em morcegos para melhor entendimento da raiva circulante em uma determinada área (MENDOZA-SÁENZ et al., 2023) e os subconjuntos de populações e comunidades de morcegos que permitem a manutenção viral a longo prazo é importante (BOTTO NUÑEZ; BECKER; PLOWRIGHT, 2019b; NUÑES et al., 2020).

Dessa maneira, nosso alvo foi identificar a circulação do vírus rábico em *D. rotundus* nas áreas com histórico de forrageamento e casos positivos de raiva em animais de produção e compreender os padrões de ataque de *D. rotundus* pela influência de alguns fatores ambientais e práticas de uso do solo. A presença do vírus da raiva foi analisada em morcegos capturados, como atividade de vigilância epidemiológica, para se estimar o risco de transmissão para bovinos e humanos.

2. Métodos

Declaração de ética

O estudo foi aprovado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO 78081-1) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, com protocolo CEUA 0198/2021, em anexo.

Área de estudo

Os espécimes de *D. rotundus* foram capturados entre 2021 e 2022 em áreas rurais e periurbanas de 14 municípios do estado de São Paulo (SP) (Figura 1), como método de controle seletivo direto de colônias de *D. rotundus*, realizado pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA) do Estado de São Paulo, SP, base do Programa Nacional de Controle da Raiva em Herbívoros (BRASIL, 2009).

A busca e captura ocorreram logo após a notificação de ataques de morcegos em animais de produção e/ou notificação de casos de raiva encaminhados para o Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP.

Os abrigos foram georreferenciados e então geocodificados a partir do Google Maps (<https://www.google.com/maps>). O georreferenciamento dos abrigos de *D. rotundus* no estado de São Paulo foi obtido por meio de aparelho de GPS, pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária do estado de São Paulo.



Figura 1: Abrigos de *D. rotundus* mapeados no estado de São Paulo, SP, Brasil

Foram coletadas as coordenadas geográficas e características ecológicas de todas as colônias e uma amostragem de morcegos em cada uma delas como descrito na **tabela 1**:

Tabela 1: Características dos abrigos de *D. rotundus* mapeados no Estado de São Paulo, SP, Brasil e número de indivíduos coletados para diagnóstico de raiva.

Captura		Local		N				
N	Data	Cidade/SP	Coordenadas geográficas	Tipo de Abrigo	Característica	Macho	Fêmea	Total
1	06.04.2021	Cabreúva	S23°19'34.9" W47°05'57.4"	Artificial	Casa abandonada	s/i	s/i	9
2	30.04.2021	Pilar do Sul	S23°44'45.7" W47°38'59.4"	Artificial	Bueiro	7	0	7
3	30.04.2021	Pilar do Sul	S23°55'54.8" W47°50'49.6"	Artificial	Casa abandonada	6	0	6
4	30.04.2021	Itu	S23°10'11.9" W47°23'37.2"	Artificial	Casa abandonada	3	0	3
5	28.05.2021	São Miguel Arcanjo	S23°46'07.8" W48°02'35.5"	Artificial	Túnel	4	5	9
6	24.09.2021	Anhembi	S22°56'55" W48°14'38"	Artificial	Bueiro	4	0	4
7	24.09.2021	Laranjal Paulista	S23°06'15" W47°51'21"	Natural	Gruta	1	1	2
8	08.10.2021	Oliveira	S20°50'20.1" W47°53'40.4"	Artificial	Caixa d'água	5	8	13
9	22.10.2021	Lavrinha	S22°36'16" W44°53'40.0"	Artificial	Túnel	3	1	4

10	22.10.2021	Cachoeira Paulista	s22°36'34" w45°4'18" s22°49'13.1"	Artificial	Bueiro	4	0	4
11	22.10.2021	Lorena	w44°58'06.1" s23°21'10.5" w49°30'03.5" s22°24'16"	Artificial	Casa abandonada	1	10	11
12	12.11.2021	Fartura	w49°53'31.2" s20°56'41" w47°52'39" s23°48'20.9" w47°26'39.2"	Artificial	Bueiro	s/i	s/i	16
13	26.11.2021	Ocaçu		Artificial	Casa abandonada	10	8	18
14	25.03.2022	Jardinópolis		Artificial	Bueiro	6	15	21
15	03.12.2021	Piedade		Artificial	Casa abandonada	3	13	16
Total								143

Legenda: s/i: sem informação disponível

Amostras

Foram capturados 143 morcegos utilizando redes de neblina (Figura 2). A eutanásia foi realizada de acordo com as normas do comitê de ética para uso dos animais, por anestesia subcutânea com cetamina 80 mg/kg e xilazina 20 mg/kg. Logo após, foi coletado todo o material cerebral e os demais órgãos, armazenados em -80°C.



Figura 2: Morcegos hematófagos *D. rotundus* capturados em municípios do estado de São Paulo, Brasil.

Reação de Imunofluorescência Direta (RID)

Para a identificação de infecção pelo vírus da raiva, foi utilizada a técnica preconizada pela Organização Mundial da Saúde, a Reação de Imunofluorescência Direta (RID), segundo protocolo descrito por Rupprecht, et al., 2019 (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019).

As impressões do material cerebral foram realizadas em lâminas de microscopia utilizando o conjugado antinucleocapsídeo, cedido pelo Instituto Pasteur – SP. A diluição de uso foi variável de acordo com titulação prévia no laboratório, de acordo com o resultado obtido na titulação.

Extração de RNA

O RNA do material cerebral de cada morcego foi extraído por TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante e ressuspendido em 30µl de água tratada com DEPC (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e armazenado a -80°C.

A quantificação do material genético das amostras, foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Deteção molecular do Vírus da raiva

Os ácidos nucleicos extraídos dos cérebros dos morcegos foram submetidos à síntese de cDNA individualmente usando o *kit* M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

A RT-PCR 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), descritos no quadro 1 (OLIVEIRA et al., 2010) e adaptado no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, UNESP, Botucatu. Os tamanhos esperados de amplicons são de 1.478 pares de base (pb) para o gene N.

Quadro 1. *Primers* utilizados na prova de RT-PCR para o gene N para detecção do vírus rábico em amostras de tecido cerebral de *D. rotundus*

<i>Primer</i>	<i>Sentido</i>	<i>Sequência</i>	<i>Gene</i>	<i>Uso</i>	<i>Posição na amostra PV</i>
21g	senso	5'ATGTAACACCTCTACAATG 3'	N	RT-PCR	55-73
304	anti-senso	5'TTGACGAAGATCTTGCTCAT 3'	N	RT-PCR	1514-1533

Como controle positivo, foi utilizada suspensão de cérebro de camundongo inoculado com a amostra CVS (*Challenge Virus Standard*).

As condições de amplificação foram 5 min a 94°C, 35 ciclos a 94°C por 45 seg, anelamento a 48°C por 1,5 min e extensão a 72°C por 2 min seguida de uma extensão final a 72°C por 2 min em termociclador (Mastercycler® Eppendorf). 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®).

3. Resultados

Um total de 143 *D. rotundus* foram coletados em 14 municípios do estado de São Paulo.

As características dos abrigos encontrados estão descritas na Tabela 1, encontrou-se a maior porcentagem de abrigos artificiais (93,33%). A maioria foi de casas abandonadas (40%) e bueiros (33,33%).

Os abrigos de *D. rotundus* mapeados se encontram em áreas rurais e periurbanas, como demonstrado na figura 3. O abrigo mapeado no município de Ocaçu/SP, encontra-se dentro dos limites da zona periurbana.

Todos os abrigos descritos estão em áreas de modificações antropogênicas, tanto em construções civis, rodovias e estradas, quanto em áreas de desenvolvimento agrícola.



Figura 3: Abrigo de *D. rotundus* na cidade de Ocaçu, mapeados pela Coodenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Brasil.

Já na região de Fartura/SP, o abrigo mapeado encontrava-se em uma área bem próxima a áreas de currais para estabulação para a criação de bovinos, como demonstrado na figura 4.



Figura 4: Abrigos de *D. rotundus* localizados na zona rural do município de Fartura, SP, próximo à área de manejo de bovinos.

O único abrigo descrito que se encontrava em área de formação natural, se localizava em uma área de fragmentação florestal, como ilustrado na figura 5.



Figura 5: Abrigo de *D. rotundus* localizado em uma área de fragmentação florestal, no município de Laranjal Paulista, SP.

As amostras cerebrais foram testadas pela técnica preconizada pela OMS para diagnóstico de raiva, reação de imunofluorescência direta (RID), e todas foram negativas. Destas, 110 amostras de tecido cerebral foram submetidas à RT-PCR, para a nucleoproteína (N), sendo também negativas.

4. Discussão

A infecção pelo vírus rábico é bem conhecida em *D. rotundus* e ainda continua pouco notificada pelos órgãos oficiais. Isso reforça o consenso emergente de que o vírus da raiva sofre dinâmica de surto e extinção dentro de colônias de morcegos, revelando a necessidade de vigilância molecular no campo (BERGNER et al., 2021), o que poderia explicar os resultados obtidos neste estudo. O risco de casos humanos de raiva é 16% maior quando o vírus da raiva é detectado na vida selvagem, particularmente em morcegos (MESKE et al., 2021).

A ocorrência do vírus da raiva nas populações de morcegos hematófagos é refletida pela incidência de raiva em bovinos (KOBAYASHI et al., 2008). Desde 2004 no Brasil, houve uma mudança na dinâmica da transmissão

de raiva em humanos e também nos animais, onde o principal transmissor da doença no país passou a ser o morcego hematófago (DE ANDRADE et al., 2016; HORTA et al., 2022).

Apesar da grande importância na transmissão e milhões de dólares em prejuízos econômicos, no Brasil foram notificados apenas seis morcegos hematófagos positivos para raiva no ano de 2020, oito no ano de 2021 e nove no ano de 2022 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023a). No ano de 2021 no estado de São Paulo, segundo dados do Ministério da Saúde, 104 bovinos foram positivos para raiva, e em 2022, foram notificados 105 casos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023a). Porém, devido a logística para encaminhamento diagnóstico e extensa área de pastagem, esses números podem ser subestimados (MEGID et al., 2021).

Todas as amostras analisadas para verificar a prevalência do vírus rábico em *D. rotundus* nas colônias mapeadas em várias regiões do estado de São Paulo, foram negativas (0/143) na técnica de diagnóstico RID, preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Para detecção molecular, 110 amostras foram testadas, e também negativas. Entender o mecanismo da circulação do vírus rábico nas populações de morcegos tem sido um desafio devido aos dados escassos de *D. rotundus* positivos disponíveis (MEZA et al., 2022).

A infecção ativa é rara em morcegos com menos de 1% de animais infectados, impedindo informações diretas sobre a incidência a nível populacional por meio de RT-PCR e estudos filogenéticos virais (MEZA et al., 2022). Em outros países da América Latina, a prevalência molecular também é um desafio, como no Equador, em que a presença do vírus da raiva foi negativa nas populações de morcegos hematófagos em áreas com histórico de ataques (ORLANDO et al., 2019). No Peru, a prevalência de infecção ativa por raiva entre morcegos hematófagos foi baixa de 0,8% com apenas um (1/123) morcego positivo na RT-PCR (GRIFFITHS et al., 2020).

Cerca de 1,4% dos morcegos hematófagos estavam infectados com o vírus da raiva em ações de vigilância no estado de São Paulo (KOTAIT et al., 2007; SHEFFER et al., 2007). Outro levantamento na espécie *D. rotundus*, em 10 municípios também no estado de São Paulo, ocorrido entre 1992 e 2000, mostrou uma taxa de infecção de 0,1% (1/895) de positividade (SOUZA et al.,

2005), porém na Amazônia Peruana esse número pode chegar a 10% (STREICKER et al., 2012b; GALETTI et al., 2016). Os resultados podem ser variáveis pelas características dos biomas e condições ambientais.

Estudos indicam que a probabilidade de um morcego hematófago desenvolver uma infecção letal pelo vírus da raiva é baixa, cerca de 10% (DE THOISY et al., 2016a) e é mais provável que a maioria das exposições seja subclínica e tenha efeito imunizante (STREICKER et al., 2012a; MESKE et al., 2021), que podem desenvolver memória imunológica subdetectável. Níveis de prevalência de anticorpos neutralizantes do RABV variam entre 65 e 70% (KUZMIN et al., 2011). Porém não existem evidências recentes que provem o estado “portador saudável” e secretor do vírus (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).

Os 14 municípios do Estado de São Paulo aqui citados com ações de vigilância epidemiológica ativa para raiva pela CDA, foram em resposta aos relatos de ataques em herbívoros domésticos. Os casos positivos confirmados de raiva bovina servem também para monitorar os refúgios cadastrados e o crescimento ou estabilização da população de morcegos destes abrigos (BRASIL, 2009; DIAS et al., 2011).

A exposição a morcegos hematófagos geralmente ocorre em regiões com alterações em seu habitat (NUÑES et al., 2020). A disponibilidade de alimentos e abrigos para *D. rotundus* pode estar diretamente influenciado por padrões de uso da terra, fragmentação de florestas e transformações do ambiente que pode trazer riscos à saúde humana (HORTA et al., 2022).

As características dos abrigos mapeados, também foram descritas por outros autores no Brasil, onde áreas de alto risco para a raiva foram relacionadas a áreas com grandes mudanças antropogênicas como a presença da malha rodoviária, que favorece a formação de abrigos artificiais para a espécie (DE ANDRADE et al., 2016). No estado de São Paulo, foram descritos que a maioria dos abrigos de *D. rotundus* foram caracterizados como artificiais, destes, os mais relevantes foram casas abandonadas e bueiros, que são estruturas de escoamento de água nas rodovias, demonstrando a malha rodoviária como fator de risco para os casos de raiva (GOMES; UIEDA, 2004; ROCHA; DIAS, 2020; MANTOVAN et al., 2022).

Em outros países das Américas, como na Costa Rica (STREICKER et al., 2019), Equador (ORLANDO et al., 2019), Peru (BENAVIDES et al., 2020b), as análises dos abrigos também correspondem como a encontradas aqui, em que mais da metade dos abrigos eram estruturas artificiais e locais onde a fragmentação florestal era presente, ilustrando que os morcegos hematófagos podem habitar áreas que não possuem ninhos naturais se as presas forem encontradas de forma mais acessível (MEZA et al., 2022; MENDOZA-SÁENZ et al., 2023).

5. Conclusão

Compreender a circulação do vírus da raiva em populações de morcegos tem sido um desafio devido aos dados limitados disponíveis. A infecção ativa é rara em *D. rotundus*, dificultando a obtenção de informações diretas sobre a incidência em nível populacional por meio de técnicas moleculares e estudos filogenéticos virais em determinados surtos.

A vigilância epidemiológica na espécie *D. rotundus* deve ser mais difundida, para melhorar o entendimento de como a dinâmica das colônias de morcegos e a dispersão destes animais interagem e influenciam na incidência da raiva e no desafio em detectar animais positivos em uma determinada população de morcegos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo pelas capturas dos morcegos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6. Referências

BENAVIDES, J. A. et al. Quantifying the burden of vampire bat rabies in Peruvian livestock. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 12, p. 1–17, 2017.

- BENAVIDES, J. A. et al. Defining New Pathways to Manage the Ongoing Emergence of Bat Rabies in Latin America. *Viruses*, v. 12, n. 9, p. 1–13, 2020.
- BERGNER, L. M. et al. Characterizing and evaluating the zoonotic potential of novel viruses discovered in vampire bats. *Viruses*, v. 13, n. 2, 2021.
- BLACKWOOD, J. C. et al. Resolving the roles of immunity , pathogenesis , and immigration for rabies persistence in vampire bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 51, 2013.
- BOTTO NUÑEZ, G.; BECKER, D. J.; PLOWRIGHT, R. K. The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiology and infection*, v. 147, p. e180, 2019a.
- BOTTO NUÑEZ, G.; BECKER, D. J.; PLOWRIGHT, R. K. The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiology and Infection*, v. 147, 2019b.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. de V. em S.-S. Raiva Animal. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva/raiva-animal>>. Acesso em: 1 mar. 2023.
- BRASIL, M. da A. P. e A. Controle da raiva dos herbívoros : manual técnico 2009.
- CARTER, G.; LEFFER, L. Social grooming in bats: Are vampire bats exceptional? *PLoS ONE*, v. 10, n. 10, p. 1–11, 2015.
- DE ANDRADE, F. A. G. et al. Geographical analysis for detecting high-risk areas for bovine/human rabies transmitted by the common hematophagous bat in the Amazon region, Brazil. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2016.
- DE THOISY, B. et al. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2016.
- DELPIETRO, H. A.; 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. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 14, n. 1–2, p. 13–20, 1992.
- DIAS, R. A. et al. Modelo de risco para circulação do vírus da raiva em herbívoros no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, v. 30, n. 4, p. 370–376, 2011.
- FISHER, C. R.; STREICKER, D. G.; SCHNELL, M. J. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 241–255, 26 abr. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro.2018.11>>.
- FOOKS, A. R. et al. Rabies. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, 2017.

GALETTI, M. et al. Liquid lunch – vampire bats feed on invasive feral pigs and other ungulates. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 14, n. 9, p. 505–506, 2016.

GOMES, M. N.; 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. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, n. 3, p. 629–638, 2004.

GRIFFITHS, M. E. et al. Epidemiology and biology of a herpesvirus in rabies endemic vampire bat populations. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.

HORTA, M. A. et al. From dogs to bats: Concerns regarding vampire bat-borne rabies in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 16, n. 3, p. 6–10, 2022.

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

KOBAYASHI, Y. et al. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 4, p. 1–9, 2008.

KOTAIT, E. et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 4, n. 40, p. 2–8, 2007.

KUZMIN, I. V. et al. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerging Health Threats Journal*, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2011.

MANTOVAN, K. B. et al. Geographic Distribution of Common Vampire Bat *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) Shelters: Implications for the Spread of Rabies Virus to Cattle in Southeastern Brazil. *Pathogens*, v. 11, n. 8, 2022.

MEGID, J. et al. Serological Surveillance of Rabies in Free-Range and Captive Common Vampire Bats *Desmodus rotundus*. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, n. September, p. 1–6, 2021.

MENDOZA-SÁENZ, V. H. et al. Reducing conflict between the common vampire bat *Desmodus rotundus* and cattle ranching in Neotropical landscapes. *Mammal Review*, p. 1–12, 26 fev. 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mam.12313>>.

MESKE, M. et al. Evolution of rabies in south america and inter-species dynamics (2009–2018). *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 6, n. 2, 2021.

MEZA, D. K. et al. Ecological determinants of rabies virus dynamics in vampire bats and spillover to livestock. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 289, n. 1982, 2022.

NUÑES, G. B. et al. Synergistic Effects of Grassland Fragmentation and Temperature on Bovine Rabies Emergence. *Ecohealth.*, v. 17, n. 2, p. 203–216, 2020.

OLIVEIRA, R. de N. et al. Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology*, v. 405, n. 2, p. 352–360, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.030>>.

ORLANDO, A. et al. Risk Factors Associated with Attacks of Hematophagous. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. XX, n. Xx, p. 1–7, 2019.

ROCHA, F.; DIAS, R. A. 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. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 174, n. August 2019, p. 104809, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104809>>.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. Laboratory techniques in rabies. Fifth edition. Volume 2. Geneva: World Health Organization, v. 2, p. 217, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/rabies/resources/9789241515306/en/>>.

RUPPRECHT, C.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. Lyssaviruses and rabies: Current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Research*, v. 6, n. 0, p. 1–22, 2017.

SHEFFER, K. C. et al. Rabies virus in naturally infected bats in the State of São Paulo , Southeastern Brazil. *Rev Saúde Pública*, v. 41, n. 3, 2007.

SOUZA, L. C. et al. Vigilância Epidemiológica Da Raiva Na Região De Botucatu-Sp: Importância Dos Quirópteros Na Manutenção Do Vírus Na Natureza. *Ars Veterinaria*, v. 21, n. 1, p. 62–68, 2005.

STREICKER, D. G. et al. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: Implications for transmission and control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 279, n. 1742, p. 3384–3392, 2012a.

STREICKER, D. G. et al. Rates of viral evolution are linked to host geography in bat rabies. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 5, 2012b.

STREICKER, D. G. et al. Phylodynamics reveals extinction-recolonization dynamics underpin apparently endemic vampire bat rabies in Costa Rica. *Proc. R. Soc. B*, 2019.

Artigo 2

Trabalho a ser enviado para a revista Plos One, eISSN 1932-6203, Fator de impacto 3,75, A1 QUALIS.

Karine Bott Mantovan^{1*}, Benedito Donizete Menozzi¹, Guilherme Shin Iwamoto Haga², Anelise Salina¹, Paula Rahal³, Dayla Bott Geraldino³, Vivaldo Gomes da Costa³, Helio Langoni^{1*}

¹Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

³Laboratório de Estudos Genômicos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

*Autor de correspondência

E-mail: karinebott@gmail.com

Investigação molecular de arboviroses em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* no Estado de São Paulo, Brasil

RESUMO

As doenças zoonóticas virais são uma séria ameaça à saúde pública. O Brasil é o país com maior riqueza de arboviroses emergentes e reemergentes na América Latina. Os morcegos são associados a transmissão de doenças infecciosas, uma vez que abrigam uma alta diversidade viral em relação as outras ordens de mamíferos. A identificação de patógenos em que os *Desmodus rotundus* sejam reservatórios devem ser melhores esclarecidas. O Estudo teve como objetivo investigar a presença de vírus do gênero Flavivirus e Alphavirus

em morcegos, responsáveis por importantes epidemias em países de clima tropical. Foram coletados 100 *D. rotundus* por meio de vigilância ativa, referentes a municípios do Estado de São Paulo, assim como coordenadas geográficas dos abrigos e características ecológicas. Para pesquisa molecular de flavivírus e alphavírus, foi realizado RT-qPCR para pan-flavivírus e alphavírus de pulmão, intestino e fígado. Todas as amostras foram negativas para ambos os gêneros. As áreas onde os abrigos estavam localizados eram de intensa perturbação ambiental, caracterizadas por construção civil, malha rodoviária e formação de pastagens, fatores de risco já evidenciados para a propagação e diversificação genética e adaptação a novos reservatórios das principais arboviroses encontradas no Brasil. A adoção de uma abordagem do conceito de Uma Saúde global é extremamente necessária, além de um sistema de vigilância epidemiológica intensiva para monitorar doenças infecciosas emergentes.

Palavras-chave: morcegos; saúde pública; flavivírus; alphavírus; arbovírus

1. Introdução

As arboviroses, doenças transmitidas por artrópodes hematófagos, são mantidas principalmente em ciclos complexos envolvendo vertebrados, como os mamíferos ou aves (BLAHOVE; CARTER, 2021; CUPERTINO et al., 2022; GARCÍA-ROMERO et al., 2023).

A caracterização e identificação de doenças virais em hospedeiros silvestres ou em vetores que tem contato frequente com seres humanos e animais domésticos (BORREMANS et al., 2019; WALLAU et al., 2023), são importantes para entender a diversidade viral encontrada na natureza e se estes, podem evoluir para novas espécies hospedeiras (OLIVAL et al., 2017a; BERGNER et al., 2021).

O papel dos hospedeiros de vida selvagem na emergência ou reemergência de zoonoses virais vem se mostrando muito importantes (OLIVAL et al., 2017b; FIGUEIREDO, 2019; CUPERTINO et al., 2022), pois o ciclo e a manutenção dos vírus encontrados na natureza devem ser melhor investigados,

para entender melhor o papel destes como reservatórios (MORATELLI; CALISHER, 2015).

Na América do Sul, as arboviroses mais importantes são as da família *Flaviviridae* e *Togaviridae*, que incluem muitos arbovírus emergentes de alto impacto para a saúde pública, dentre eles, os mais prevalentes em todo mundo, os do gênero *Flavivirus*, que no Brasil são causados principalmente pelo vírus Zika (ZIKAV), vírus da Febre Amarela (FA) e vírus da Dengue (DENV) e do gênero *Alphavirus*, que correspondem ao vírus Chikungunya (CHIKV), vírus Mayaro (MAYV), e os vírus da encefalite equina (EEV) (FAGRE; KADING, 2019).

Mais de 200 vírus de 27 famílias diferentes, incluindo *Flaviviridae*, foram isolados ou detectados em morcegos (VICENTE-SANTOS et al., 2017). Vírus do gênero *Alphavirus* já foram descritos em várias espécies de morcegos, descrevendo o isolamento do vírus, evidência molecular ou soroconversão, dentre eles, o vírus de Chikungunya, Vírus da encefalite equina oriental (EEEV), Vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), Vírus da encefalite equina ocidental (WEEV) (FAGRE; KADING, 2019).

O Brasil foi classificado como o segundo país com maior diversidade de espécies de morcegos, e a espécie de morcego hematófago *D. rotundus*, presente somente nas américas, do norte do México até o norte da Argentina e no Brasil, está presente em todos os estados (RIBEIRO et al., 2018).

Estes apresentam adaptações morfológicas e fisiológicas para o voo e podem migrar para várias colônias, apresentam comportamentos sociais bastantes relevantes para a espécie (CARTER; LEFFER, 2015), e capacidade adaptativa a mudanças de habitat e utilização de abrigos criados pelo ser humano (MANTOVAN et al., 2022) que pode ter influenciado alguns aspectos do sistema imunológico e do metabolismo dos morcegos, permitindo-lhes hospedar tantos vírus (MORATELLI; CALISHER, 2015; BERGNER et al., 2021).

Nichos ecológicos compartilhados entre morcegos e artrópodes hematófagos, necessários na transmissão de arboviroses, devem ser considerados, para entender o conhecimento sobre o potencial dos morcegos atuarem como reservatórios de arbovírus (LIM et al., 2018; FAGRE; KADING, 2019) e as variações genéticas de vírus já relatados (BERGNER et al., 2021). São muitas as espécies de mosquitos que se alimentam de uma variedade diversificada de hospedeiros vertebrados (SOTOMAYOR-BONILLA et al., 2018).

É essencial melhorar a compreensão do potencial envolvimento de espécies de animais silvestres na transmissão de arbovírus emergentes. Portanto o objetivo do estudo foi investigar infecções por Flavivírus e Alphavirus emergentes no morcego hematófago *D. rotundus* na região Sudeste do Brasil, visando contribuir com o sistema de vigilância epidemiológica de zoonoses de grande impacto para a saúde pública.

A vigilância epidemiológica das áreas endêmicas deve ser realizada, intensificando o rastreamento dos principais animais silvestres que possam servir de reservatórios e vetores ainda não identificados é necessária para prever futuros surtos (BLAHOVE; CARTER, 2021).

2. Métodos

Declaração de ética

O estudo foi aprovado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO 78081-1) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, com protocolo CEUA 0198/2021 em anexo.

Área de estudo

D. rotundus foram capturados entre 2021 e 2022 em áreas rurais e periurbanas de 12 municípios do estado de São Paulo (SP) mostrados na figura 1, em função da vigilância ativa da espécie encaminhados para diagnóstico de raiva ao Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA) do Estado de São Paulo, Brasil, cujas características estão descritas na Tabela 1.

As coordenadas geográficas foram obtidas e também as características ecológicas de todos os locais de amostragem. Foram georreferenciadas a partir do Google Maps (<https://www.google.com/maps>). O georreferenciamento dos abrigos de *D. rotundus* no estado de São Paulo foi obtido por meio de aparelho de GPS, pela CDA. Após a obtenção das coordenadas geográficas e criação dos mapas, foi utilizado o Google Earth Pro versão 7.3.6.

Tabela 1: Características dos abrigos de *D. rotundus* mapeados no estado de São Paulo, SP, Brasil e número de indivíduos coletados para pesquisa de Flavivírus e Alphavírus.

Captura		Local		N				
N	Data	Cidade/SP	Coordenadas	Tipo de	Característica	Macho	Fêmea	Total
1	30.04.2021	Pilar do Sul	S23°44'45.7" W47°38'59.4"	Artificial	Bueiro	7	0	7
2	30.04.2021	Pilar do Sul	S23°55'54,8" W47°50'49,6"	Artificial	Casa abandonada	6	0	6
3	30.04.2021	Itu	S23°10'11.9" W047°23'37.2"	Artificial	Casa abandonada	3	0	3
4	28.05.2021	Sao miguel Arcanjo	S23°46'07.8" W48°02'35.5"	Artificial	Túnel	4	5	9
5	24.09.2021	Anhembi	S22°56'55" W48°14'38"	Artificial	Bueiro	4	0	4
6	24.09.2021	Laranjal Paulista	S23°06'15" W47°51'21"	Natural	Gruta	1	1	2
7	08.10.2021	Sales Oliveira	S20°50'20.1" W47°53'40.4"	Artificial	Caixa d'água	5	8	13
8	22.10.2021	Lavrinha	S22°36'16" W44°53'40.0"	Artificial	Túnel	3	1	4
9	22.10.2021	Cacoeira Paulista	S22°36'34" W45°4'18"	Artificial	Bueiro	4	0	4
10	22.10.2021	Lorena	S22°49'13.1" W44°58'06.1"	Artificial	Casa abandonada	1	10	11
11	12.11.2021	Fartura	S23°21'10.5" W49°30'03.5"	Artificial	Bueiro	s/i	s/i	16
12	26.11.2021	Ocaçu	S22°24'16" W49°53'31.2"	Artificial	Casa abandonada	10	8	18
13	25.03.2022	Jardinópolis	S20°56'41" W 47°52'39"	Artificial	Bueiro	1	8	21

Legenda: s/i – sem informação



Figura 1: Localização dos abrigos de *D. rotundus* no estado de São Paulo, Brasil.

Amostras

Foram capturados 100 morcegos utilizando redes de neblina, e informações epidemiológicas como sexo dos animais, característica dos abrigos e número de animais. Após a eutanásia, realizada por anestesia subcutânea com cetamina 80 mg/kg e xilazina 20 mg/kg, foi realizada a coleta de material cerebral para diagnóstico de raiva, fígado, intestino e pulmões para pesquisa de Flavivírus e Alphavirus (Figura 2).

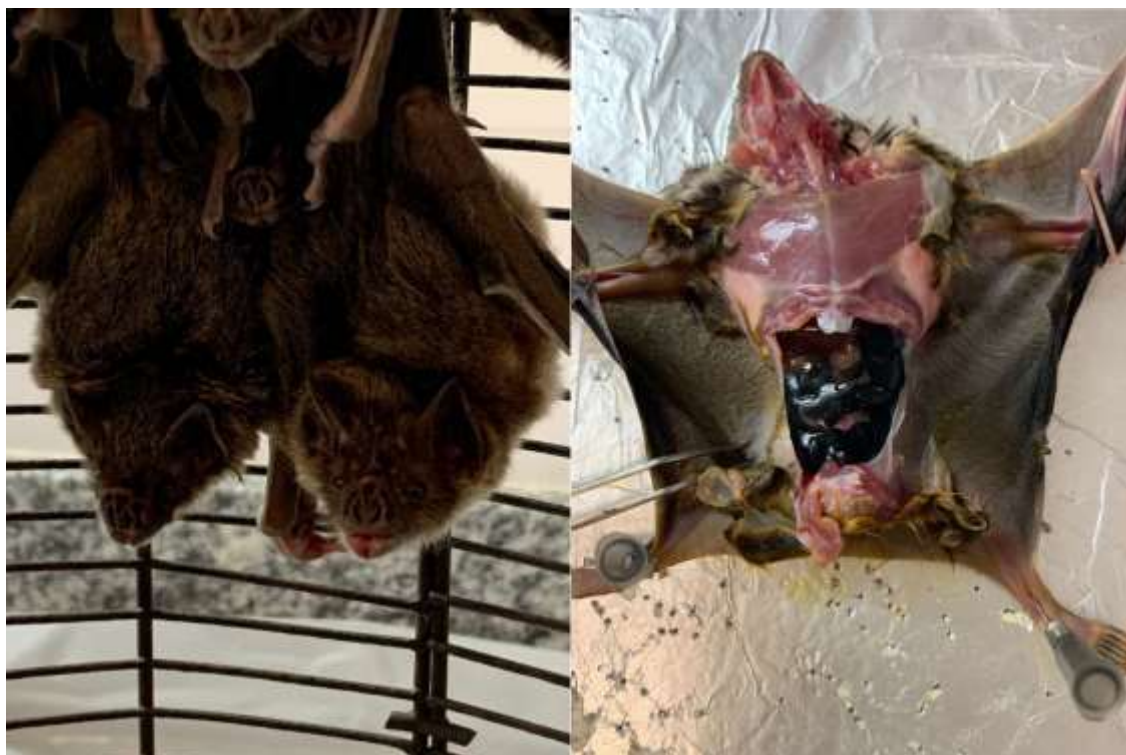


Figura 2: *Desmodus rotundus* capturados para controle seletivo direto das colônias e também para diagnóstico de raiva em municípios do estado de São Paulo, Brasil.

Extração de RNA

O RNA dos fígados, pulmões e intestinos foram extraídos por TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante e ressuspensionado em 30µl de água tratada com DEPC (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e armazenados a -80°C.

A quantificação das amostras foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Deteção molecular de Flavivirus e Alphavirus

Os ácidos nucleicos extraídos dos órgãos coletados dos morcegos individuais foram submetidos à síntese de cDNA usando o *kit* High-Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Após a síntese de cDNA, foi realizada PCR para o controle endógeno, para verificar a qualidade do RNA, utilizando os *primers* do gene GAPDH.

A detecção de flavivírus e alphavirus nas amostras de fígados, pulmões e intestinos foi realizada por ensaio de Pan-flavivirus descrito por PATEL et al., 2013 e detecção de Pan-Alphavirus proposta por GIRY et al., 2017, onde foi realizado um two-step qRT-PCR, utilizados SYBR GREEN Maxima Sybr Green (Thermo Fisher). Os *primers* estão descritos no quadro 1 e as reações descritas no quadro 2 (Material suplementar).

Quadro 1: *Primers* utilizados para detecção de Alphavirus e Flavivirus por two-step RT-qPCR.

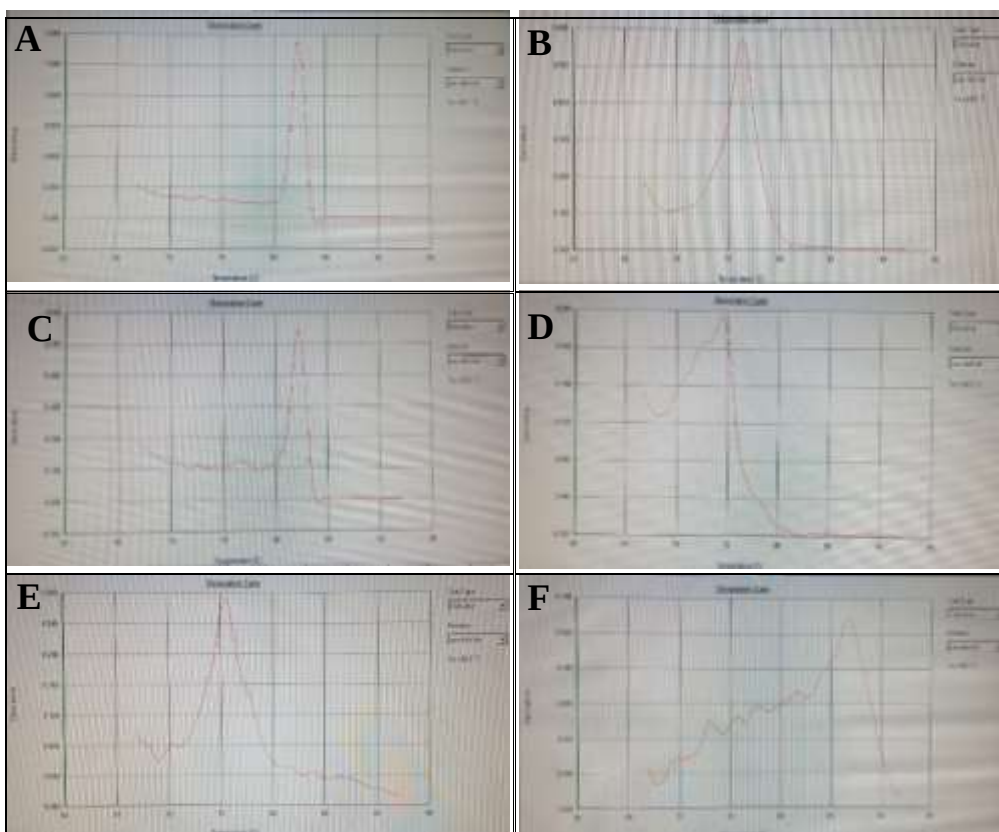
Primer	Sequência (5'-3')	Orientação	Alvo	Referência
Flavi all S	TACAACATgATggggAARAgAgARAA	S	NS5 ~260 pb	(PATEL et al., 2013)
Flavi all AS2 (correto)	gTgTCCCAgCCNgCKgTgTCATCWgC	AS		
F2A	ATGATGAARTCIGGIATGTTYT	S	nsP4 ~200 pb	(GIRY et al., 2017)
R2A	ATYTTIACTTCCATGTTTCATCCA	AS		
R3A	ATYTTIACTTCCATRTTCARCCA			
R4A	ATYTTIACTTCCATGTTGACCCA			

S: sense orientation, AS: antisense orientation. Degenerate bases: R=(A/G), W=(A/T), K=(T/G), Y=(C/T), N=(A/G/T/C).

O RNA do vírus da febre amarela, vírus mayaro e a água livre de nuclease foram usados como controles positivos e negativos em todas as reações de RT-qPCR, respectivamente isolados no Laboratório de Estudos Genômicos, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo. As amostras foram consideradas positivas quando apresentassem pico com temperatura de fusão (T_m) entre 80–84 °C. A reação foi realizada em sistema 7300 Real -Time PCR System (Thermo fisher).

3. Resultados

Todas as amostras foram negativas para RT-qPCR (SYBR) para Pan-Flavivirus e Alphavirus dos órgãos dos 100 *D. rotundus* analisados.



Legenda: A: Controle positivo de pan-flavivirus (Yellow fever virus). B: Controle negativo de pan-flavivirus. C: Controle positivo de pan-alphavirus (Mayaro virus). D: Controle negativo de pan-alphavirus. E: Amostra de morcego negativa para pan-flavivirus. F: amostra de morcego negativa para pan-alphavirus.

4. Discussão

Devido à grande expansão de doenças causadas por arbovírus globalmente, a vigilância epidemiológica é de grande importância pois a detecção precoce de surtos por meio da identificação de espécies sentinelas é necessária (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019). Mitigar os riscos nas interfaces animal-humano, bem como para indicar a circulação viral no ambiente no âmbito de saúde única (GIBB et al., 2020; BERGNER et al., 2021)

A emergência e disseminação de patógenos em novas áreas e o reconhecimento de hospedeiros selvagens é importante para avaliar a evolução dos patógenos nas populações de reservatórios de animais selvagens (GOULD; SOLOMON, 2008; PANDIT et al., 2022). Portanto, é necessário continuar com pesquisas que esclareçam os mecanismos de patogenicidade, fatores de

virulência e mecanismos de transmissão desses arbovírus (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

As mudanças ambientais antropogênicas afetam muitas dimensões da saúde e bem-estar humanos, incluindo a incidência e o surgimento de doenças zoonóticas e transmitidas por vetores (GIBB et al., 2020).

Vários estudos evidenciam que os morcegos são suscetíveis à infecção por arbovírus (MOREIRA MARRERO et al., 2022), e sugere-se que podem atuar como reservatórios de arbovírus, incluindo Flavivirus e Alphavirus (ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018; FAGRE; KADING, 2019; GUZMÁN et al., 2019; MOREIRA MARRERO et al., 2022). A contribuição dos morcegos nessa dinâmica, contudo, ainda precisa ser elucidada.

A proximidade de áreas florestais com áreas urbanizadas em países de clima tropical, como o Brasil, levou a introdução dos arbovírus do meio silvestre para ambientes periurbanos e urbanos (FIGUEIREDO, 2019), um dos abrigos pesquisados localiza-se em área periurbana, no município de Ocaçu, SP, onde de acordo com o a Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo, ocorreram sete casos de dengue notificados no ano de 2022 (CVE, 2023).

Das notificações dos casos de dengue no sudeste, 73,9% foram registrados somente no estado de São Paulo (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b). Em relação aos municípios em que os *D. rotundus* foram coletados, somente dois não tiveram casos de dengue em humanos notificados no ano de 2022, que foi Pilar do Sul e São Miguel Arcanjo. Os demais tiveram casos autóctones notificados (CVE, 2023).

As características dos abrigos em que os *D. rotundus* foram analisados, estão em áreas em que ocorreram mudanças no uso do solo e fragmentação de vegetação para a conversão em ecossistemas agrícolas, urbanos ou antropogênicos, como no desenvolvimento da construção civil, na formação da malha rodoviária (JONES et al., 2013; SÁNCHEZ; VENKATACHALAM-VAZ; DRAKE, 2021). Essa característica, presente em quase todos os abrigos mapeados, é um mediador globalmente importante do risco de infecção e doenças (GIBB et al., 2020), pois pode aumentar o contato entre humanos, animais selvagens e possíveis vetores transmissores de zoonoses (MARCONDES et al., 2017).

Para melhor definir e elucidar a contribuição dos morcegos para os ciclos de transmissão de arbovírus, são necessários mais dados sobre o contato entre morcegos com vetores (ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018), bem como a competência dessas espécies de morcegos como hospedeiros de amplificação para vírus específicos (KADING et al., 2018).

Os resultados para a análise molecular de flavivírus foram negativos para todas as amostras, embora os Flavivírus já foram documentados em morcegos (AGUILAR-SETIÉN et al., 2008; THOISY et al., 2009; VICENTE-SANTOS et al., 2017; ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018; KADING et al., 2018; FAGRE; KADING, 2019).

Vários estudos demonstraram evidências de exposições ou infecções pelo DENV em condições naturais, em vastas áreas endêmicas e vários métodos de detecção. A presença de anticorpos e/ou detecção de molecular para DENV foi encontrada em espécies de morcegos no México (AGUILAR-SETIÉN et al., 2008; CALDERÓN et al., 2021), Costa Rica (VICENTE-SANTOS et al., 2017), e na Guiana Francesa (THOISY et al., 2009), indicando uma possível suscetibilidade à infecção, sugerindo que possam desempenhar um papel de conservação de dengue na natureza (AGUILAR-SETIÉN et al., 2008; CALDERÓN et al., 2021).

No México, em *D. rotundus* (ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018), foi detectado o RNA do vírus da dengue (DENV-2) além de ter sido identificado também em moscas que parasitam morcegos (*Strebla wiedemanni*, *Trichobius parasiticus*), associadas a morcegos hematófagos comuns (ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018). Isso apoia relatos de detecção de DENV em morcegos e artrópodes além dos mosquitos *Aedes*, porém ainda merece uma investigação mais aprofundada.

A falta de evidências moleculares da infecção por flavivírus em amostras de *D. rotundus* coletadas em várias regiões do Estado de São Paulo, corrobora com outros resultados observados por autores no Brasil (BITTAR et al., 2018; CUPERTINO et al., 2022) e também em outros países tropicais (CABRERA-ROMO et al., 2016; SOTOMAYOR-BONILLA et al., 2018).

Os Alphavirus já foram descritos em várias espécies de morcegos, descrevendo o isolamento do vírus, evidência molecular ou soroconversão, dentre eles, o vírus da encefalite equina oriental (EEEV), vírus da encefalite

equina venezuelana (VEEV) (SOTOMAYOR-BONILLA et al., 2017; GUZMÁN et al., 2019), vírus da encefalite equina ocidental (WEEV) (FAGRE; KADING, 2019).

No Caribe, foi identificado que morcegos frugívoros tiveram sorologia positiva para o vírus da CHIKV, indicando que os morcegos que viviam perto e dentro de assentamentos humanos foram expostos ao CHIKV (STONE et al., 2018). Em um estudo de infecção experimental por CHIKV em morcegos, o pico de viremia desenvolvida foi relativamente baixa, mas dentro da faixa de infectividade para mosquitos hematófagos (BOSCO-LAUTH et al., 2016).

Os morcegos podem ter um papel potencial como hospedeiros dispersores desse vírus (MARCONDES et al., 2017), já os arbovírus são capazes de evoluir e infectar uma gama de espécies de vertebrados (GARCÍA-ROMERO et al., 2023).

Modelos de vigilância incorporando múltiplas variáveis, incluindo as ecológicas e climáticas, bem como características compartilhadas pelos arbovírus emergentes, Flavivírus e Alphavirus, transmitidos por vetores, tornaram-se uma ferramenta poderosa na avaliação da função potencial e do papel dos hospedeiros selvagens na suscetibilidade global às arboviroses, fornecendo possíveis alvos de doenças que são críticas para a vigilância de doenças em animais e humanos (BLAHOVE; CARTER, 2021).

5. Conclusão

Os morcegos têm características biológicas peculiares que os permitem serem reservatórios de diferentes vírus, tornando necessária a vigilância epidemiológica constante nestes animais. Ações estratégicas para prever a ocorrência de surtos e epidemias ou emergência/reemergência de doenças causadas por arbovírus, principalmente a manutenção da vigilância em animais silvestres e vetores, de forma eficiente, para previsão quanto às mutações e virulência são de extrema relevância. Ressalta-se a importância de esclarecer o papel dos morcegos como reservatórios de arbovírus e determinar se esses animais são importantes do seu ciclo enzoótico.

Agradecimento

Os autores gostariam de agradecer à Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo pelas capturas dos morcegos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6. Referências

ABUNDES-GALLEGOS, J. et al. Detection of Dengue Virus in Bat Flies (Diptera: Streblidae) of Common Vampire Bats, *Desmodus rotundus*, in Progreso, Hidalgo, Mexico. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 1, p. 70–73, 2018.

AGUILAR-SETIÉN, Á. et al. Dengue virus in Mexican bats. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 12, p. 1678–1683, 2008.

BERGNER, L. M. et al. Characterizing and evaluating the zoonotic potential of novel viruses discovered in vampire bats. **Viruses**, v. 13, n. 2, 2021.

BITTAR, C. et al. Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–10, 2018.

BLAHOVE, M. R.; CARTER, J. R. Flavivirus persistence in wildlife populations. **Viruses**, v. 13, n. 10, 2021.

BORREMANS, B. et al. Cross-species pathogen spillover across ecosystem boundaries: Mechanisms and theory. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1782, 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. de V. em S. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Ministério da Saúde - Boletim Epidemiológico**, v. 54, p. 1–14, 2023.

CABRERA-ROMO, S. et al. No Evidence of Dengue Virus Infections in Several Species of Bats Captured in Central and Southern Mexico. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 8, p. 579–583, 2016.

CALDERÓN, A. et al. Two cases of natural infection of dengue-2 virus in bats in the Colombian caribbean. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 1, 2021.

CARTER, G.; LEFFER, L. Social grooming in bats: Are vampire bats exceptional? **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–11, 2015.

CUPERTINO, M. do C. et al. Yellow fever virus investigation in tissues of vampire bats *Desmodus rotundus* during a wild yellow fever outbreak in Brazilian Atlantic Forest. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 89, n. September, p. 0–1, 2022.

CVE, C. de V. E. "Prof. A. V. **Distribuição dos casos autóctones de dengue segundo o município de residência, por semana epidemiológica de início de sintomas,ESP, 2022.** Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/dengue/2022/dengue22_import_autoc_se.htm>. Acesso em: 5

mar. 2023.

FAGRE, A. C.; KADING, R. C. Can bats serve as reservoirs for Arboviruses? **Viruses**, v. 11, n. 3, 2019.

FIGUEIREDO, L. T. M. Human urban arboviruses can infect wild animals and jump to sylvatic maintenance cycles in South America. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–6, 2019.

GARCÍA-ROMERO, C. et al. Arboviruses in Mammals in the Neotropics: A Systematic Review to Strengthen Epidemiological Monitoring Strategies and Conservation Medicine. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 1–40, 2023.

GIBB, R. et al. Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 398–402, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2562-8>>.

GIRY, C. et al. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500–509, fev. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360860238X>>.

GUZMÁN, C. et al. Eco-epidemiology of the Venezuelan equine encephalitis virus in bats of Córdoba and Sucre, Colombia. **Acta Tropica**, v. 191, n. December 2018, p. 178–184, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.016>>.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta Tropica**, v. 190, n. September 2018, p. 99–111, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010>>.

JONES, B. A. et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8399–8404, 2013.

KADING, R. C. et al. Neutralizing antibodies against flaviviruses, Babanki virus, and Rift Valley fever virus in Ugandan bats. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1439215>>.

LIM, E. X. Y. et al. Mosquitoes as suitable vectors for alphaviruses. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

MANTOVAN, K. B. et al. Geographic Distribution of Common Vampire Bat *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) Shelters: Implications for the Spread of Rabies Virus to Cattle in Southeastern Brazil. **Pathogens**, v. 11, n. 8, 2022.

MARCONDES, C. B. et al. Emergent and reemergent arboviruses in South America and the Caribbean: Why so many and why now? **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 3, p. 509–532, 2017.

MORATELLI, R.; CALISHER, C. H. Bats and zoonotic viruses: Can we

confidently link bats with emerging deadly viruses? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 1–22, 2015.

MOREIRA MARRERO, L. et al. Alphavirus Identification in Neotropical Bats. **Viruses**, v. 14, n. 2, 2022.

OLIVAL, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 646–650, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature22975>>.

OLIVAL, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 646–650, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature22975>>.

PANDIT, P. S. et al. Predicting the potential for zoonotic transmission and host associations for novel viruses. **Communications biology**, v. 5, n. 1, p. 844, 2022.

PATEL, P. et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Virology Journal>.

RIBEIRO, J. et al. Bat rabies surveillance and risk factors for rabies spillover in an urban area of Southern Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2018.

SÁNCHEZ, C. A.; VENKATACHALAM-VAZ, J.; DRAKE, J. M. Spillover of zoonotic pathogens: A review of reviews. **Zoonoses and Public Health**, v. 68, n. 6, p. 563–577, 2021.

SOTOMAYOR-BONILLA, J. et al. Potential sympatric vectors and mammalian hosts of venezuelan equine encephalitis virus in Southern Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 3, p. 657–661, 2017.

SOTOMAYOR-BONILLA, J. et al. Survey of mosquito-borne flaviviruses in the Cuitzmala River Basin, Mexico: Do they circulate in rodents and bats? **Tropical Medicine and Health**, v. 46, n. 1, p. 1–5, 2018.

STONE, D. et al. Serological evidence of widespread exposure of Grenada fruit bats to chikungunya virus. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 5, p. 505–511, 2018.

THOISY, B. De et al. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 2, p. 157–169, 2009.

VICENTE-SANTOS, A. et al. Neotropical bats that co-habit with humans function as dead-end hosts for dengue virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–18, 2017.

WALLAU, G. L. et al. The Virome of Bats Inhabiting Brazilian Biomes: Knowledge Gaps and Biases towards Zoonotic Viruses. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 1, 2023.

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada a importância dos dois gêneros de zoonoses destacados no presente estudo, sendo consideradas como importantes doenças tropicais negligenciadas da atualidade (HOTEZ et al., 2014; OLIVAL et al., 2017a), ainda há muitos fatores a serem considerados e esclarecidos. Dentro do contexto “one health” é o fator de extrema importância para compreender os mecanismos de transbordamento dessas doenças (SÁNCHEZ; VENKATACHALAM-VAZ; DRAKE, 2021). Portanto os aspectos epidemiológicos referentes as zoonoses avaliadas, são importantes principalmente quanto à pesquisa de reservatórios e vetores envolvidos na cadeia epidemiológica de transmissão das doenças de caráter zoonótico (WANG; ANDERSON, 2019).

O risco de transmissão de patógenos entre espécies é uma ameaça para as populações humanas e animais. Diversos fatores, em que há perturbações antropogênicas são considerados como fatores de riscos (WANG; ANDERSON, 2019). A industrialização, agricultura intensiva, urbanização e mudança climática são exemplos comumente encontrados na nossa região (JONES et al., 2013; GIBB et al., 2020; VAN DE VUURST et al., 2022). Tem sido sugerido que a expansão da distribuição geográfica de *D. rotundus* está ligada à heterogeneidade da paisagem, degradação e desenvolvimento agrícola (VAN DE VUURST et al., 2022).

Os abrigos mapeados de *D. rotundus* na área estudada, estão presentes nas mais diversas áreas de modificações ambientais. A espécie se adapta facilmente às perturbações humanas e é comumente encontrado em paisagens fragmentadas dominadas por diferentes tipos de matrizes paisagística (BOLÍVAR-CIMÉ et al., 2019), e principalmente em áreas de construção civil, é facilitada sua proximidade com as fontes de alimentos (DE ANDRADE et al., 2016; HORTA et al., 2022; MANTOVAN et al., 2022).

O abrigo localizado no município de Laranjal Paulista, SP, foi o único abrigo natural descrito, se encontrava em fragmentação florestal. A fragmentação de habitats é um habitat contínuo e foi dividido em manchas de habitat menores que são cercadas por um ou vários tipos de matrizes de paisagem (BOLÍVAR-CIMÉ et al., 2019). Essa característica tem fortes efeitos na movimentação dos hospedeiros com mobilidade, como os morcegos (NUÑES et al., 2020).

Na análise dos abrigos do estudo, nota-se a proximidade em áreas em

que a fragmentação florestal está presente, podendo servir de facilitador para aumentar a conectividade entre as colônias de morcegos e promover a persistência viral ao aumentar a taxa de imigração de indivíduos infectados (NUÑES et al., 2020).

A pecuária está presente em todos os municípios avaliados, com rebanhos que variam de 6.500 a 44.319 mil bovinos, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE., 2022). Devido ao vasto rebanho encontrado no estado de São Paulo e também no Brasil, os bovinos fornecem um recurso alimentar abundante para esta espécie que se alimenta exclusivamente de sangue (DE ANDRADE et al., 2016; BENAVIDES et al., 2017; ROCHA; DIAS, 2020). Fatores como o desenvolvimento da pecuária, leva ao aumento de rebanhos, colaborando com o aumento da densidade populacional de *D. rotundus* (STREICKER; ALLGEIER, 2016).

O *D. rotundus* é altamente oportunista na busca por alimentos, representam recursos alimentares valiosos e fáceis de obter (BOLÍVAR-CIMÉ et al., 2019). Assim, as populações de morcegos hematófagos são favorecidas por sua adaptabilidade a ambientes antropizados e se saem especialmente bem em paisagens em que são dominadas por animais de produção, presentes em altas densidades para consumo humano (BENAVIDES et al., 2017; BOTTO NUÑEZ; BECKER; PLOWRIGHT, 2019b; ROCHA et al., 2019).

A expansão da pecuária é uma das principais causas da mudança do uso da terra nos neotrópicos, que modifica significativamente o funcionamento dos ecossistemas e ameaça a biodiversidade (MENDOZA-SÁENZ et al., 2023). A invasão de ecossistemas naturais resulta na expansão de ecótonos, que são zonas de transição entre sistemas ecológicos adjacentes, com fins de urbanização e/ou agricultura, onde conjuntos de espécies de diferentes habitats se misturam (JONES et al., 2013). Isso oferece novas oportunidades para a propagação de patógenos, diversificação genética e adaptação. Essa associação tem sido sugerida para várias doenças, dentre elas a raiva e a febre amarela e provável causa da urbanização da dengue (DESPOMMIER; ELLIS; WILCOX, 2006).

A maioria dos estudos que compreendem a circulação do vírus da raiva entre os morcegos hematófagos baseiam-se nas notificações de mortalidade do gado (DE THOISY et al., 2016b). Áreas onde há abrigos apropriados disponíveis,

o bovino serve como sentinela para aquelas regiões que têm o vírus da raiva circulando (HORTA et al., 2022), mas esses dados são muitas vezes influenciados por níveis consideráveis de subnotificações em todo o país (MEGID et al., 2021).

No ano de 2021 no estado de São Paulo, segundo dados do Ministério da Saúde, 104 bovinos foram positivos para raiva, destes, dois (2/104) casos foram no município de Piedade, dois (2/104) no de Ocaçu, um (1/104) de Cachoeira Paulista e um (1/104) em Cabreúva. No mesmo ano em relação aos morcegos hematófagos *D. rotundus*, foram notificados 4 positivos, um (1/4) em São Miguel Arcanjo, um (1/4) em Laranjal Paulista, um (1/4) em Araçariguama e um (1/4) em Bom Jesus dos Perdões (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023a).

Em relação ao ano de 2022, foram notificados 105 casos de raiva em bovinos, sendo dez (10/105) em Pilar do Sul, dois (2/105) em Cabreúva, um (1/105) em Itu, quatro (4/105) em São Miguel Arcanjo, e dois (2/105) em Piedade (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023a).

Desses positivos no estado de São Paulo, nos anos de 2021 e 2022, observa-se que há a circulação viral nos municípios aqui estudados e ressalta a importância da vigilância epidemiológica realizada na região, onde a raiva se mantém em ciclos ao longo dos anos, e também há focos da doença em novas regiões. Já que a vacinação dessas espécies susceptíveis, como os herbívoros é considerada compulsória (BRASIL, 2009). Porém, os *D. rotundus* avaliados foram negativos para raiva nos dois métodos diagnósticos utilizados.

Nas colônias de morcegos afetadas, geralmente foi observada uma prevalência relativamente baixa de infecção, variando de <1 a 4%, impedindo informações diretas sobre a incidência em nível populacional por meio de RT-PCR e estudos filogenéticos virais (KUZMIN et al., 2011; MEZA et al., 2022). Por outro lado, os níveis de prevalência de anticorpos neutralizantes do vírus rábico podem variar entre 65 e 70% (KUZMIN et al., 2011).

Os resultados negativos das amostras testada, entre outros fatores, podem ter relação com a difícil detecção do vírus ativo. O controle populacional do morcego ocorre quando há a notificação de animais positivo, indicativo de que o vírus rábico já se encontra circulando na região (BRASIL, 2009). É um sinal muito tardio, já que o morcego infectado poderá morrer de raiva alguns dias

depois de transmitir a doença aos herbívoros, que passará por um período de incubação de 30 a 45 dias antes de morrer também. Assim, quando a equipe da vigilância e controle de morcegos investiga in loco o surto de raiva, provavelmente irá capturar e aplicar a pasta nos morcegos que sobreviveram e/ou não foram atingidos pela doença (UIEDA; ATANAENA; ANDRADE, 2020).

No estado de São Paulo, na década de 1980, houve uma epidemia, que se propagou a uma velocidade média de 20 km/mês pelas principais bacias hidrográficas paulistas, e sugerem que dentre outras características, a presença de criação bovina de subsistência, apresentam maior probabilidade de ocorrência da doença, pois estas características ecológicas são adequadas para o *D. rotundus* (TADEI, 1991).

No estado de São Paulo, em uma análise relacionada aos abrigos de *D. rotundus* mapeados, mais de 86% eram artificiais e interceptavam áreas de maior densidade nos casos de raiva em bovinos (MANTOVAN et al., 2022), semelhantes aos nossos achados. Destes, a maioria se tratava de construção civil, como casas abandonadas e a malha rodoviária, também relatado por outros autores (GOMES; UIEDA, 2004; DE ANDRADE et al., 2016). Sintetizando de forma concreta que as mudanças antropogênicas no ambiente são fatores de risco para a raiva.

O papel do *D. rotundus* nos casos de raiva já está bem definido, como principal transmissor na natureza e para os seres humanos nas Américas. Porém, ainda não ficou evidente o papel destes na ecologia e transmissão dos arbovírus emergentes, apesar de vários estudos mostrarem que estes são susceptíveis a infecção (THOISY et al., 2009; ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018; FAGRE; KADING, 2019).

Poucos estudos objetivaram a identificação de arbovírus presentes em morcegos, e principalmente em *D. rotundus*, mesmo com todo o reconhecimento destes, como importantes reservatórios de vírus zoonóticos (BITTAR et al., 2018). Alguns estudos já evidenciam que características ecológicas, comportamentais e filogenéticas podem influenciar e diversificar a resposta imunológica (HERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2021).

O interesse em desenvolver estudos sobre os flavivírus e alphavírus e seus hospedeiros são importante, pois o Brasil tem alta incidência das principais arboviroses, ocupando os primeiros lugares em números de casos em humanos

(BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b; OPAS, 2023a; WHO, 2023), e é o país com maior riqueza de arboviroses nas américas (GARCÍA-ROMERO et al., 2023).

Nos últimos anos, as arboviroses epidêmicas transmitidas por mosquitos estão aumentando em frequência, e o cenário global atual apresenta uma combinação perfeita de fatores para sua expansão: anomalias climáticas, desmatamento, contato crescente de humanos com animais reservatórios/vetores e a rápida evolução do vetor (JONES et al., 2013; GIBB et al., 2020). Na América do Sul, uma alta concentração de florestas nativas e diversos biomas - um bioma é uma grande área ecológica na superfície terrestre com grupos distintos de plantas e animais adaptados a esse ambiente específico - permite uma grande diversidade genética entre os vírus (LORENZ; FREITAS RIBEIRO; CHIARAVALLOTI-NETO, 2019).

Sobre algumas variáveis ecológicas relacionadas aos flavivírus, o tamanho da colônia também foi associado à soroprevalência de outros vírus, por exemplo, o vírus da raiva em morcegos. A precipitação e a temperatura têm sido sugeridas como variáveis explicativas para a incidência e risco de infecção de DENV no ciclo urbano (BHATT et al., 2013). Já no ciclo silvestre (VICENTE-SANTOS et al., 2017; ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018) sugerem que os casos positivos de DENV são mais frequentes em morcegos capturados durante a estação chuvosa. Essa variável também foi encontrada nos casos de raiva.

Evidência molecular da infecção por flavivírus em amostras de *D. rotundus* coletadas em várias regiões do Estado de São Paulo, corrobora com outros autores no Brasil (BITTAR et al., 2018; CUPERTINO et al., 2022) e também em outros países tropicais (CABRERA-ROMO et al., 2016; SOTOMAYOR-BONILLA et al., 2018).

Porém o vírus da dengue já foi descrito na Guiana Francesa (THOISY et al., 2009) em morcegos de várias espécies. No México, em *D. rotundus* (ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018), onde além de ser detectado em nos morcegos, o RNA do vírus da dengue (DENV-2) foi detectado em moscas que parasitam morcegos (*Strebla wiedemanni*, *Trichobius parasiticus*), associadas aos *D. rotundus* (ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018).

No Brasil, infecções por DENV foram relatadas em larvas de *Aedes albopictus* (transovariana) e *Haemagogus leucocelaenus*, podendo sugerir que

houve um possível ciclo silvestre da doença (FIGUEIREDO et al., 2010). Isso apoia relatos de detecção de DENV em morcegos e artrópodes além dos mosquitos *Aedes*, porém ainda merece investigação mais aprofundada.

A presença de anticorpos para dengue e/ou por RT-PCR foi encontrada em espécies de morcegos capturadas no México, indicando uma possível suscetibilidade à infecção, sugerindo que os morcegos possam desempenhar um papel de manutenção da dengue na natureza provavelmente em títulos baixos (AGUILAR-SETIÉN et al., 2008).

Na Costa Rica, os morcegos que coabitam com humanos estão criticamente expostos ao DENV, já que quase 9% dos morcegos testados, apresentaram RNA de DENV no sangue e 22% tinham anticorpos neutralizantes anti-DENV (VICENTE-SANTOS et al., 2017). Porém eles não amplificam o vírus de forma considerável, para poder transmiti-lo a um mosquito, sendo reservatórios sem papel no ciclo de transmissão. Possivelmente, a infecção em morcegos pode ser devido ao transbordamento de humanos para morcegos (FAGRE; KADING, 2019).

No Caribe Colombiano, a presença do sorotipo DENV-2 da dengue foi detectada molecularmente em diferentes tecidos de dois morcegos, capturados em uma área do Caribe colombiano, com lesões histopatológicas em vários órgãos sugerindo a replicação viral do vírus da dengue nos morcegos (CALDERÓN et al., 2021).

Em várias espécies de morcegos o isolamento do vírus, evidência molecular ou soroconversão para espécies do gênero *Flavivirus* já foram documentadas globalmente (FAGRE; KADING, 2019).

Das notificações dos casos de dengue no sudeste, 73,9% foram registradas somente no estado de São Paulo (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b). Em relação aos municípios em que os *D. rotundus* foram capturados, somente dois não tiveram casos de dengue em humanos notificados no ano de 2022, que foi Pilar do Sul e São Miguel Arcanjo. Os demais tiveram casos autóctones notificados (CVE, 2023).

Nenhuma evidência de viremia ou replicação foi observada em relatos de morcegos e, portanto, nenhum estudo demonstrou um mecanismo de infecção. Outra hipótese sugere que o papel dos ectoparasitas na epidemiologia do DENV pode ser semelhante ao das espécies de mosquitos silvestres, que

não o transmitem diretamente aos humanos, mas atuam como reservatórios (ABUNDES-GALLEGOS et al., 2018; FAGRE; KADING, 2019; CALDERÓN et al., 2021)

No Brasil, no último surto de febre amarela, houve uma redistribuição geográfica das áreas endêmicas, com migração de ocorrências da região da floresta amazônica para a região da mata atlântica (CUPERTINO et al., 2022). No ano de 2022 haviam registros da circulação da febre amarela somente em primatas não humanos no estado de Minas Gerais e Paraná (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b). Porém, no início de 2023 houve a notificação de um caso positivo humano, morador da zona rural da cidade de Vargem Grande do Sul, divisa com Minas Gerais.

A reemergência da febre amarela no Brasil em uma área não endêmica levanta uma questão sobre as possíveis interações bióticas existentes no ambiente silvestre, visto que já foi relatada a participação do gambá e do porco-espinho no ciclo silvestre (CUPERTINO et al., 2022).

Foram encontrados morcegos com sorologia positiva para febre amarela nas espécies de morcegos *Eidolon helvum*, *Rousettus aegyptiacus*, *Phyllostomus hastatus*, *Artibeus cinereus*, *Artibeus jamaicensis*, *Artibeus literatus*, *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Molossus ater*, *Molossus molossus*, *Phyllostomus hastatus*, *Pteronotus davyi*, *Pteronotus parnellii*, *Vampyrops helleri*, *Mops condylurus*, *Tadarida pumila*, *Epomophorus* sp. na África (KADING et al., 2018; FAGRE; KADING, 2019), indicando que os morcegos estão expostos a esse vírus na natureza, mas não há descrição sobre o vírus da febre amarela no morcego hematófago *D. rotundus*.

Tentativas de infectar experimentalmente *D. rotundus* e morcegos mastiff preto, *Molossus rufus*, por picada de mosquito (*Aedes aegypti*) não obtiveram êxito (KUMM, 1932).

O ZIKV provavelmente infectou morcegos na África por um período substancial de tempo. No entanto, com sua introdução no Novo Mundo, não se sabe quais efeitos o vírus pode ter nas populações naturais de morcegos. No entanto, há a possível falta de diferenciação entre os flavivírus devido ao método de teste (KADING; SCHOUNTZ, 2016). Há informações limitadas sobre a viremia do ZIKAV em morcegos.

No México, encontraram infecção ativa de Zika vírus em morcegos *Artibeus jamaicensis*, primeira descrição do continente americano, por detecção molecular (TORRES-CASTRO et al., 2021), ressaltando que novos estudos são necessários para verificar se há importância no ciclo de transmissão.

Os vírus do gênero Alphavirus (família Togaviridae) já foram descritos em várias espécies de morcegos, tanto em isolamento do vírus, evidência molecular ou diagnóstico sorológico, dentre eles, o Vírus da encefalite equina oriental (EEEV), Vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), Vírus da encefalite equina ocidental (WEEV), Chikungunya (CHIKV), (FAGRE; KADING, 2019).

Além disso, existem evidências sorológicas que suportam a exposição de morcegos a alfavírus encefalíticos no campo, e dados experimentais demonstram a suscetibilidade de morcegos à infecção por alphavirus (FAGRE; KADING, 2019), incluindo VEEV (MOREIRA MARRERO et al., 2022)

A circulação de CHIKV ocorre entre primatas não humanos e mosquitos, mas outros vertebrados, incluindo roedores e morcegos, é sugerida que possa ocorrer a replicação. Porém em estudos experimentais com morcegos marrons (*Eptesicus fuscus*), pico de viremia desenvolvida foi relativamente baixa, mas dentro da faixa de infectividade para mosquitos hematófagos (BOSCO-LAUTH et al., 2016).

Após uma epidemia de Chikungunya numa ilha do Caribe, foi detectado anticorpos para CHIKV em morcegos frugívoros. Essa detecção sugere que estes, estão expostos a vetores infectados, porém estudos futuros precisam ser realizados para entender a duração da resposta imune e se estes podem desenvolver viremia (STONE et al., 2018)

Recentemente, evidências moleculares e celulares de VEEV foram descritas em morcegos frugívoros na Colômbia (MOREIRA MARRERO et al., 2022). Diferentes estudos relataram evidências de infecção por VEEV, sugerindo que morcegos podem ser hospedeiros de arbovírus de impacto na saúde pública nas Américas (SOTOMAYOR-BONILLA et al., 2017; GUZMÁN et al., 2019).

No México, encontrou EEEV em uma espécie de *Artibeus turpis*. Outros estudos nos departamentos de Sucre e Córdoba relataram EEEV em espécies de morcegos *Artibeus planirostris* e *Sturnira lilium*. Esses relatórios sugerem que os morcegos frugívoros da região do Caribe na Colômbia podem desempenhar um

papel no ciclo enzoótico do vírus da encefalite equina (SOTOMAYOR-BONILLA et al., 2017). Foi descrito durante uma epizootia de encefalite equina venezuelana, foi identificado um *D. rotundus* infectado com uma cepa epidêmica do vírus (CORREA-GIRON; CALISHER; BAER, 1972).

Os morcegos podem atuar como hospedeiros alternativos para manutenção da circulação viral da VEEV (MARCONDES et al., 2017), especialmente quando muitas espécies de mamíferos silvestres terrestres adquirem imunidade (GARCÍA-ROMERO et al., 2023). Já foram isolados nas espécies *D. rotundus* e em morcegos frugívoros *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Uroderma bilobatum* (GUZMÁN et al., 2019; MOREIRA MARRERO et al., 2022)

Um aspecto importante da ecologia da transmissão dos principais arbovírus, é a influência da localização geográfica e do uso/cobertura da terra (FAGRE; KADING, 2019). A espécie de morcego capturadas no presente estudo estão amplamente distribuídas em todo o Brasil e América latina, e ocupam uma variedade de habitats, com preferências para ambientes com modificações antropogênicas, se isso facilitar sua proximidade com a fonte de alimento (JOHNSON; ARÉCHIGA-CEBALLOS; AGUILAR-SETIEN, 2014; VAN DE VUURST et al., 2022).

O desmatamento foi observado como um importante fator de risco, pois um grande número de registros positivos para arbovirose são encontrados fora das áreas florestais e dentro das frentes desmatadas dos Neotrópicos, o que está associado ao fato de que os habitats perturbados aumentam o risco de infecções por arbovírus (GARCÍA-ROMERO et al., 2023)

As condições agroecológicas, também influenciariam a presença e abundância de mosquitos vetores devido a disponibilidade de habitats larvais adequados e hospedeiros preferidos. A ocorrência de vetor, hospedeiro e vírus com a paisagem e as condições ambientais é importante para a emergência e circulação de arbovírus (KADING et al., 2018).

A coinfeção viral pode ocorrer entre famílias de vírus e vários estudos têm apresentado o impacto da coinfeção por alphavirus e flavivírus na competência vetorial dos mosquitos do gênero *Aedes*, pois o *Aedes aegypti* tem capacidade de transmitir CHIKV, DENV-2 ou ZIKV, individualmente e como coinfeções duplas e triplas (LIM et al., 2018)

Conclusões

Mesmo não havendo evidências moleculares de infecções por flavivírus e também pelo vírus da raiva em *D. rotundus* no universo amostral das regiões estudadas, ressaltamos a importância dos morcegos como reservatórios dos principais vírus que possam ser transmitidos aos seres humanos. Pesquisas epidemiológicas contínuas envolvendo esses animais para entender seu papel no ciclo enzoótico de transmissão das principais doenças tropicais negligenciadas que tem sido um desafio.

As mudanças globais de origem antropogênica estão modificando a dinâmica viral. Portanto, devemos estar preparados para futuras emergências principalmente por patógenos que são causadas pelo transbordamento do ciclo silvestre para humanos e outros animais nas fronteiras entre ecossistemas rurais e naturais.

Apesar da raiva ser a primeira zoonose transmitida por morcegos detectada e uma das mais bem estudadas, o vírus transmitido pelo *D. rotundus* ainda é considerado uma ameaça emergente à saúde pública na América Latina. Entender as características da dinâmica viral e de como ele persiste nas colônias é fundamental, já que *D. rotundus* apresentam características comportamentais de altruísmo social, fato relevante na transmissão da raiva entre os indivíduos, além da capacidade de voo e uma rede de contato entre as colônias.

Os flavivírus causam uma série de doenças de impacto para a saúde pública e estão amplamente distribuídas no Brasil, e são consideradas endêmicas no país. Na dengue e zika, a evolução do ciclo urbano para o meio silvestre deve ser analisada, pois as mudanças de hospedeiros podem causar mutações e variações genéticas. Na febre amarela, a manutenção do vírus em outros hospedeiros, que não os primatas não humanos já são relatados, e devido à plasticidade do *D. rotundus* em coabitar em diversos ambientes com mudanças antropogênicas é algo a ser considerado nas pesquisas virais, para entender como os vírus se mantêm no ambiente e se os morcegos tem participação em alguma parte do ciclo, ou se eles são apenas hospedeiros acidentais.

A adoção de uma abordagem *One Health* global é extremamente necessária, além de um sistema de vigilância intensivo para monitorar doenças

infecciosas emergentes, que será uma ferramenta indispensável no controle e prevenção de patógenos de origem zoonótica, principalmente nos morcegos, que são importantes reservatórios de diversos agentes patogênicos, principalmente de origem viral.

Referências

- ABUNDES-GALLEGOS, J. et al. Detection of Dengue Virus in Bat Flies (Diptera: Streblidae) of Common Vampire Bats, *Desmodus rotundus*, in Progreso, Hidalgo, Mexico. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 1, p. 70–73, 2018.
- AGUILAR-SETIÉN, Á. et al. Dengue virus in Mexican bats. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 12, p. 1678–1683, 2008.
- ALLOCATI, N. et al. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. **Cell Death Discovery**, v. 2, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.48>>.
- ANCILLOTTO, L. et al. Extraordinary range expansion in a common bat: The potential roles of climate change and urbanisation. **Science of Nature**, v. 103, n. 3–4, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00114-016-1334-7>>.
- ANDERSON, A.; SHWIFF, S. A. The Cost of Canine Rabies on Four Continents. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 4, p. 446–452, 2015.
- ANDERSON, S. C.; RUXTON, G. D. **The evolution of flight in bats: a novel hypothesis** *Mammal Review*, 2020. .
- 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. v. 75, n. 17, p. 8096–8104, 2001.
- BANYARD, A. C.; TORDO, N. Rabies pathogenesis and immunology. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 37, n. 2, p. 323–330, 2018.
- BENAVIDES, J. A. et al. Quantifying the burden of vampire bat rabies in Peruvian livestock. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–17, 2017.
- BENAVIDES, J. A. et al. An evaluation of Brazil's surveillance and prophylaxis of canine rabies between 2008 and 2017. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1–16, 2019a.
- BENAVIDES, J. A. et al. An evaluation of Brazil's surveillance and prophylaxis of canine rabies between 2008 and 2017. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007564, 2019b.
- BENAVIDES, J. A. et al. Using Surveillance of Animal Bite Patients to Decipher Potential Risks of Rabies Exposure From Domestic Animals and Wildlife in Brazil. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. July, p. 1–9, 2020a.
- BENAVIDES, J. A. et al. Defining New Pathways to Manage the Ongoing Emergence of Bat Rabies in Latin America. **Viruses**, v. 12, n. 9, p. 1–13, 2020b.
- BENAVIDES, J. A. et al. Abortive vampire bat rabies infections in Peruvian peridomestic livestock. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008194, 29 jun. 2020c. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008194>>.

BENAVIDES, J. A.; VALDERRAMA, W.; STREICKER, D. G. Spatial expansions and travelling waves of rabies in vampire bats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1832, p. 1–9, 2016.

BENCHIMOL, J. L. História da febre-amarela no Brasil. **Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais. Publicacoes avulsas**, v. 21, n. 2, p. 315–512, 1994.

BERGNER, L. M. et al. Demographic and environmental drivers of metagenomic viral diversity in vampire bats. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 1, p. 26–39, 2020.

BERGNER, L. M. et al. Characterizing and evaluating the zoonotic potential of novel viruses discovered in vampire bats. **Viruses**, v. 13, n. 2, 2021.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 7 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature12060>>.

BITTAR, C. et al. Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–10, 2018.

BLACKWOOD, J. C. et al. Resolving the roles of immunity , pathogenesis , and immigration for rabies persistence in vampire bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 51, 2013.

BLAHOVE, M. R.; CARTER, J. R. Flavivirus persistence in wildlife populations. **Viruses**, v. 13, n. 10, 2021.

BOLÍVAR-CIMÉ, B. et al. Influence of landscape structure on the abundance of *Desmodus rotundus* (Geoffroy 1810) in northeastern Yucatan, Mexico. **Ecosistemas y Recursos Agropecuarios**, v. 6, n. 17, p. 263–271, 2019.

BORREMANS, B. et al. Cross-species pathogen spillover across ecosystem boundaries: Mechanisms and theory. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1782, 2019.

BOSCO-LAUTH, A. M. et al. Viremia in North American mammals and birds after experimental infection with chikungunya viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 504–506, 2016.

BOTTO NUÑEZ, G.; BECKER, D. J.; PLOWRIGHT, R. K. The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. **Epidemiology and infection**, v. 147, p. e180, 2019a.

BOTTO NUÑEZ, G.; BECKER, D. J.; PLOWRIGHT, R. K. The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. **Epidemiology and Infection**, v. 147, 2019b.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil* *Aedes aegypti*: History of Control in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** 2007, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. de V. em S.-S. **Raiva Animal**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva/raiva-animal>>. Acesso em: 1 mar. 2023a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. de V. em S. Monitoramento dos casos de

arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Ministério da Saúde - Boletim Epidemiológico**, v. 54, p. 1–14, 2023b.

BRASIL. Um pouco da história do Instituto Pasteur. **Vigilância em Saúde - 20 anos do SUS-SP**, n. 1, p. 19–36, 2008.

BRASIL, M. da A. P. e A. **Controle da raiva dos herbívoros : manual técnico 2009**.

BRASIL, M. da A. P. e A. **No Title**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva#epidemiologia>>.

BRASIL, M. da A. P. e A. Situação sanitária das doenças de animais terrestres. p. 1–3, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-sisa/copy_of_Situacao_zoossanitaria_WAHID_Brasil_2022.pdf>.

BRASIL, M. da S. **Situação Epidemiológica da Raiva**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva#epidemiologia>>. Acesso em: 23 jan. 2020b.

BRASIL, M. da S. **Raiva humana**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva/raiva-humana#:~:text=Foram notificados dois casos de raiva humana no Brasil no,anos%2C agredida por uma raposa.>>>. Acesso em: 5 fev. 2023a.

BRASIL, M. da S. **Febre Amarela**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-amarela>>. Acesso em: 11 mar. 2023b.

BRASIL, M. da S. S. de V. em S. D. de V. E. **Normas técnicas de profilaxia da raiva humana**. 1 ed ed. [s.l: s.n.]

BURKETT-CADENA, N. D.; VITTOR, A. Y. Deforestation and vector-borne disease: Forest conversion favors important mosquito vectors of human pathogens. **Basic and Applied Ecology**, v. 26, p. 101–110, 2018.

BURROWS, M. T. et al. Geographical limits to species-range shifts are suggested by climate velocity. **Nature**, v. 507, n. 7493, p. 492–495, 2014.

CABRERA-ROMO, S. et al. No Evidence of Dengue Virus Infections in Several Species of Bats Captured in Central and Southern Mexico. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 8, p. 579–583, 2016.

CALDERÓN, A. et al. Two cases of natural infection of dengue-2 virus in bats in the Colombian caribbean. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 1, 2021.

CARINI, A. Sur une grande épidémiologie de rage. **Ann Inst Pasteur**, v. 25, p. 843–6, 1911.

CARLSON, C. J. et al. Global estimates of mammalian viral diversity accounting for host sharing. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 7, p. 1070–1075, 2019.

CARLSON, C. J. et al. Climate change increases cross-species viral transmission risk. **Nature**, v. 607, n. 7919, p. 555–562, 2022.

CARNIELI, P. et al. Characterization of Rabies virus isolated from canids and

identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 131, n. 1, p. 33–46, 2008.

CARNIELI, P. 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**, v. 45, n. 1, p. 76–83, 2012.

CARTER, G.; LEFFER, L. Social grooming in bats: Are vampire bats exceptional? **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–11, 2015.

CASCIO, A. et al. The socio-ecology of zoonotic infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 3, p. 336–342, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03451.x>>.

CELONE, M. et al. **A systematic review and meta-analysis of the potential non-human animal reservoirs and arthropod vectors of the Mayaro virus.** [s.l: s.n.]v. 15

CHEN, R. et al. ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 6, p. 761–762, 2018.

CONDE, J. N. et al. The complement system in flavivirus infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–7, 2017.

CORDEIRO, R. de A. et al. The Importance of Wild Canids in the Epidemiology of Rabies in Northeast Brazil: A Retrospective Study. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 6, p. 486–493, 2016.

CORREA-GIRON, P.; CALISHER, C. H.; BAER, G. M. Epidemic Strain of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus from a Vampire Bat Captured in Oaxaca, Mexico, 1970. **Science**, v. 175, n. 4021, p. 546–547, 4 fev. 1972. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.175.4021.546>>.

CUPERTINO, M. do C. et al. Yellow fever virus investigation in tissues of vampire bats *Desmodus rotundus* during a wild yellow fever outbreak in Brazilian Atlantic Forest. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 89, n. September, p. 0–1, 2022.

CVE, C. de V. E. "Prof. A. V. **Distribuição dos casos autóctones de dengue segundo o município de residência, por semana epidemiológica de início de sintomas,ESP, 2022.** Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/dengue/2022/dengue22_import_autoc_se.htm>. Acesso em: 5 mar. 2023.

DA SILVA SENA NUNES, J. do S. et al. Serological evidence of Eastern equine encephalitis circulation in equids in Pará state, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 43, p. 1–11, 2021.

DE ALMEIDA CAMPOS, A. C. et al. Phylogenetic analysis of near full-length sequences of the *Desmodus rotundus* genetic lineage of rabies virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 80, n. December 2019, p. 104179, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104179>>.

DE ANDRADE, F. A. G. et al. Geographical analysis for detecting high-risk areas

for bovine/human rabies transmitted by the common hematophagous bat in the Amazon region, Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2016.

DE SOUZA, W. M. et al. Spatiotemporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil: an epidemiological study. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 5, p. e319–e329, maio 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666524723000332>>.

DE THOISY, B. et al. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2016a.

DE THOISY, B. et al. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004378, jan. 2016b.

DELPIETRO, H. A. et al. Reproductive seasonality, sex ratio and philopatry in Argentina's common vampire bats. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 4, 2017.

DELPIETRO, H. A.; 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. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, n. 1–2, p. 13–20, 1992.

DESPOMMIER, D.; ELLIS, B. R.; WILCOX, B. A. The role of ecotones in emerging infectious diseases. **EcoHealth**, v. 3, n. 4, p. 281–289, 2006.

DIAS, R. A. et al. Modelo de risco para circulação do vírus da raiva em herbívoros no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 30, n. 4, p. 370–376, 2011.

DIRLIKOV, E. et al. Guillain-Barré Syndrome and Zika Virus Infection. v. 24, n. 1, 2018.

DOS SANTOS SOUZA MARINHO, R. et al. Re-emergence of mayaro virus and coinfection with chikungunya during an outbreak in the state of Tocantins/Brazil. **BMC Research Notes**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13104-022-06153-6>>.

DOUAM, F.; PLOSS, A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 913–928, nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27165699/>><<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5664198/>><file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf>.

FAGRE, A. C.; KADING, R. C. Can bats serve as reservoirs for Arboviruses? **Viruses**, v. 11, n. 3, 2019.

FAVORETTO, S. R. et al. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91–95, 2002.

FAVORETTO, S. R. et al. Rabies virus maintained by dogs in humans and

terrestrial wildlife, Ceará State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1978–1981, 2006.

FAVORETTO, S. R. et al. The emergence of wildlife species as a source of human rabies infection in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 7, p. 1552–1561, 2013.

FIALLO-OLIVÉ, E. et al. Rhabdoviridae-ICTV. **The Online (10th) Report of the ICTV**, p. 1–48, 2020. Disponível em: <www.ictv.global/report/filoviridae%0Awww.ictv.global/report/papillomaviridae%0Awww.ictv.global/report/flaviviridae%0Ahttps://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report%0Ahttps://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_repor>.

FIGUEIREDO, M. L. G. De et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virology Journal**, v. 7, n. Table 1, p. 152, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2913956&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

FIGUEIREDO, L. T. M. Human urban arboviruses can infect wild animals and jump to sylvatic maintenance cycles in South America. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–6, 2019.

FISHER, C. R.; STREICKER, D. G.; SCHNELL, M. J. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 241–255, 26 abr. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro.2018.11>>.

FOOKS, A. R. et al. Current status of rabies and prospects for elimination. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1389–1399, 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62707-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62707-5)>.

FOOKS, A. R. et al. Rabies. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

FREITAS, D. A. et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12 December, p. 1–27, 2020.

GALETTI, M. et al. Liquid lunch – vampire bats feed on invasive feral pigs and other ungulates. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 14, n. 9, p. 505–506, 2016.

GAN, H. et al. Global burden of rabies in 204 countries and territories, from 1990 to 2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 126, p. 136–144, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.10.046>>.

GANJIAN, N.; RIVIERE-CINNAMOND, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 44, p. 1–11, 2020.

GARCÍA-ROMERO, C. et al. Arboviruses in Mammals in the Neotropics: A Systematic Review to Strengthen Epidemiological Monitoring Strategies and Conservation Medicine. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 1–40, 2023.

GIBB, R. et al. Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 398–402, 2020. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2562-8>>.

GIRY, C. et al. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B. R.; LEE, C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 1, p. 58, 2014.

GOMES, M. N.; 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. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 3, p. 629–638, 2004.

GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500–509, fev. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360860238X>>.

GRIFFITHS, M. E. et al. Epidemiology and biology of a herpesvirus in rabies endemic vampire bat populations. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.

GUNAWARDENA, P. S. et al. Lyssavirus in Indian flying Foxes, Sri Lanka. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 8, p. 1456–1459, 2016.

GUO, Y. et al. Early events in rabies virus infection—Attachment, entry, and intracellular trafficking. **Virus Research**, v. 263, n. February, p. 217–225, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.02.006>>.

GUPTA, P. et al. Bats and viruses: a death-defying friendship. **VirusDisease**, v. 32, n. 3, p. 467–479, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13337-021-00716-0>>.

GUZMÁN-TERÁN, C. et al. Venezuelan equine encephalitis virus: The problem is not over for tropical America. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12941-020-00360-4>>.

GUZMÁN, C. et al. Eco-epidemiology of the Venezuelan equine encephalitis virus in bats of Córdoba and Sucre, Colombia. **Acta Tropica**, v. 191, n. December 2018, p. 178–184, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.016>>.

HAMPSON, K. et al. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1–20, 2015.

HAUPT, H. & REHAAG, H. Raiva epizootica nos rebanhos de Santa Catarina, sul do Brasil, transmitida por morcegos. **Bol. Soc. Bras. Med. Vet.**, v. 2, p. 17–47, 1925.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55–58, 29 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e1.htm>>.

HERNÁNDEZ-AGUILAR, I. et al. Current Knowledge and Ecological and Human

Impact Variables Involved in the Distribution of the Dengue Virus by Bats in the Americas. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 21, n. 4, p. 217–231, 2021.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta Tropica**, v. 190, n. September 2018, p. 99–111, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010>>.

HOLMES, A. C. et al. A molecular understanding of alphavirus entry. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, p. 1–20, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876>>.

HORTA, M. A. et al. From dogs to bats: Concerns regarding vampire bat-borne rabies in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 6–10, 2022.

HOTEZ, P. J. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

HOTEZ, P. J.; MURRAY, K. O. Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika—and now Mayaro? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1–5, 2017.

HUGUIN, M. et al. How Social Structure Drives the Population Dynamics of the Common Vampire Bat (*Desmodus rotundus*, Phyllostomidae). **Journal of Heredity**, v. 109, n. 4, p. 393–404, 2018.

IBGE., B. M. da A. Produção da Pecuária Municipal 2021. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**, v. 49, n. 01014234, p. 1–12, 2022. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>.

IGTV. **Gênero: Flavivirus - Flaviviridae - Vírus de RNA de sentido positivo - ICTV**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus>. Acesso em: 31 ago. 2021.

IRVING, A. T. et al. Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. **Nature**, v. 589, n. 7842, p. 363–370, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>>.

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

JONES, B. A. et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8399–8404, 2013.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 837–856, set. 2009. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.09.59>>.

KADING, R. C. et al. Neutralizing antibodies against flaviviruses, Babanki virus, and Rift Valley fever virus in Ugandan bats. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1439215>>.

KADING, R. C.; SCHOUNTZ, T. Flavivirus infections of bats: Potential role in zika virus ecology. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 993–996, 2016.

KIM, A. S.; DIAMOND, M. S. A molecular understanding of alphavirus entry and antibody protection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. June, 2022.

KLEBER DE OLIVEIRA, W. et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 9, p. 242–247, 11 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6509e2.htm>>.

KOBAYASHI, Y. et al. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 1–9, 2008.

KOTAIT, E. et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 2–8, 2007.

KUMM, H. W. Yellow fever transmission experiments with south american bats. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 207–213, 1932.

KUZMIN, I. V. et al. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. **Emerging Health Threats Journal**, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2011.

LAVAN, R. P. et al. 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**, v. 35, n. 13, p. 1668–1674, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.014>>.

LETKO, M. et al. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 461–471, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>>.

LIM, E. X. Y. et al. Mosquitoes as suitable vectors for alphaviruses. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

LIMA, W. G. et al. Rate of exposure to Mayaro virus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Virology**, v. 166, n. 2, p. 347–361, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04889-9>>.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.

LORENZ, C.; FREITAS RIBEIRO, A.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Mayaro virus distribution in South America. **Acta Tropica**, v. 198, n. May, p. 105093, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105093>>.

MANTOVAN, K. B. et al. Geographic Distribution of Common Vampire Bat *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) Shelters: Implications for the Spread of Rabies Virus to Cattle in Southeastern Brazil. **Pathogens**, v. 11, n. 8, 2022.

MARCONDES, C. B. et al. Emergent and reemergent arboviruses in South America and the Caribbean: Why so many and why now? **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 3, p. 509–532, 2017.

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. **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 50, n. 10, p. 469–472, 2003.

MEGID, J. et al. Serological Surveillance of Rabies in Free-Range and Captive Common Vampire Bats *Desmodus rotundus*. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. September, p. 1–6, 2021.

MENDOZA-SÁENZ, V. H. et al. Reducing conflict between the common vampire bat *Desmodus rotundus* and cattle ranching in Neotropical landscapes. **Mammal Review**, p. 1–12, 26 fev. 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mam.12313>>.

MENOZZI, B. D. et al. Antigenic and genotypic characterization of rabies virus isolated from bats (Mammalia: Chiroptera) from municipalities in São Paulo State, Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, n. 5, p. 1201–1209, 2017.

MESKE, M. et al. Evolution of rabies in south america and inter-species dynamics (2009–2018). **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 2, 2021.

MESSINA, J. P. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>>.

MEZA, D. K. et al. Ecological determinants of rabies virus dynamics in vampire bats and spillover to livestock. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1982, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico nº 35 - Vigilância Epidemiológica do Sarampo no Brasil 2019: Semanas Epidemiológicas 34 a 45 de 2019. v. 50, p. 1–36, 2019. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/novembro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-35.pdf>>.

MORATELLI, R.; CALISHER, C. H. Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 1–22, 2015.

MOREIRA MARRERO, L. et al. Alphavirus Identification in Neotropical Bats. **Viruses**, v. 14, n. 2, 2022.

MOUREAU, G. et al. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 467–477, 2007.

MS/SVS. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. ed. especí, p. 1980–1998, 1999.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces**

India, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

NETTO, E. M. et al. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador , Northeastern Brazil Limits the. **mBio**, v. 8, n. 6, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/content/8/6/e01390-17.abstract>>.

NSOESIE, E. O. et al. Global distribution and environmental suitability for chikungunya virus, 1952 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 20, 2016.

NUÑES, G. B. et al. Synergistic Effects of Grassland Fragmentation and Temperature on Bovine Rabies Emergence. **Ecohealth**, v. 17, n. 2, p. 203–216, 2020.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, 2015. Disponível em: <????>.

OLIVAL, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 646–650, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature22975>>.

OLIVAL, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 646–650, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature22975>>.

OLIVEIRA, R. de N. et al. Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**, v. 405, n. 2, p. 352–360, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.030>>.

OPAS, O. P. A. da S. Atualização Epidemiológica Dengue , chikungunya e Zika 25 de janeiro de 2023. **Organização Mundial da Saúde**, p. 1–8, 2023a. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/documentos/atualizacao-epidemiologica-dengue-chikungunya-e-zika-25-janeiro-2023>>.

OPAS, O. P. A. da S. **Avaliação de risco de Chikungunya - Implicações para a Região das Américas**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/documentos/avaliacao-risco-chikungunya-implicacoes-para-regiao-das-americas>>.

ORLANDO, A. et al. Risk Factors Associated with Attacks of Hematophagous. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. XX, n. Xx, p. 1–7, 2019.

PANDIT, P. S. et al. Predicting the potential for zoonotic transmission and host associations for novel viruses. **Communications biology**, v. 5, n. 1, p. 844, 2022.

PATEL, P. et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Virology Journal>.

PERES, N. F. Profilaxia e controle da raiva dos herbívoros domésticos no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, no período 1997 - 2007. p. 179, 2008. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/.../Nilton_Fidalgo_Peres.pdf>.

PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle,

clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, n. January, p. 34–42, 2020.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, v. 560, n. 7720, p. 573–581, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>>.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>>.

PLOWRIGHT, R. K. et al. Pathways to zoonotic spillover. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 502–510, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45>>.

POWERS, A. M. et al. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>>.

REIS, NELIO R.; PERACCHI, ADRIANO L.; PEDRO, WAGNER A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. [s.l: s.n.]

RENO, E. et al. Prevention of yellow fever in travellers: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. e129–e137, 2020.

RIBEIRO, J. et al. Bat rabies surveillance and risk factors for rabies spillover in an urban area of Southern Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2018.

ROCHA, F. et al. Relations between topography , feeding sites , and foraging behavior of the vampire bat , *Desmodus rotundus*. **Journal of Mammalogy**, n. X, p. 1–8, 2019.

ROCHA, F.; DIAS, R. A. 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. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 174, n. August 2019, p. 104809, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104809>>.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. Laboratory techniques in rabies. Fifth edition. Volume 2. **Geneva: World Health Organization**, v. 2, p. 217, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/rabies/resources/9789241515306/en/>>.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. v. 2, n. June, p. 327–343, 2002.

RUPPRECHT, C.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. Lyssaviruses and rabies: Current conundrums, concerns, contradictions and controversies. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 1–22, 2017.

SÁNCHEZ, C. A.; VENKATACHALAM-VAZ, J.; DRAKE, J. M. Spillover of zoonotic pathogens: A review of reviews. **Zoonoses and Public Health**, v. 68,

n. 6, p. 563–577, 2021.

SHEFFER, K. C. et al. Rabies virus in naturally infected bats in the State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 41, n. 3, 2007.

SHIPLEY, R. et al. Bats and viruses: Emergence of novel lyssaviruses and association of bats with viral zoonoses in the EU. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 1, p. 1–22, 2019.

SILVA, N. I. O. et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2020.

SIMMONDS, P. et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017.

SKIDMORE, A. M.; BRADFUTE, S. B. **The life cycle of the alphaviruses: From an antiviral perspective** Antiviral Research Elsevier B.V., , 2023. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105476>>.

SOKOLOW, S. H. et al. Ecological interventions to prevent and manage zoonotic pathogen spillover. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1782, p. 1–10, 2019.

SOTOMAYOR-BONILLA, J. et al. Potential sympatric vectors and mammalian hosts of venezuelan equine encephalitis virus in Southern Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 3, p. 657–661, 2017.

SOTOMAYOR-BONILLA, J. et al. Survey of mosquito-borne flaviviruses in the Cuitzmala River Basin, Mexico: Do they circulate in rodents and bats? **Tropical Medicine and Health**, v. 46, n. 1, p. 1–5, 2018.

SOUZA, A. C. F. et al. Reproductive functions in *Desmodus rotundus*: A comparison between seasons in a morphological context. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–15, 2018.

SOUZA, L. C. et al. Vigilância Epidemiológica Da Raiva Na Região De Botucatu-Sp: Importância Dos Quirópteros Na Manutenção Do Vírus Na Natureza. **Ars Veterinaria**, v. 21, n. 1, p. 62–68, 2005.

STONE, D. et al. Serological evidence of widespread exposure of Grenada fruit bats to chikungunya virus. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 5, p. 505–511, 2018.

STREICKER, D. G. et al. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: Implications for transmission and control. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1742, p. 3384–3392, 2012a.

STREICKER, D. G. et al. Rates of viral evolution are linked to host geography in bat rabies. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012b.

STREICKER, D. G. et al. Phylodynamics reveals extinction-recolonization dynamics underpin apparently endemic vampire bat rabies in Costa Rica. **Proc. R. Soc. B**, 2019.

STREICKER, D. G.; ALLGEIER, J. E. Foraging choices of vampire bats in diverse landscapes: potential implications for land-use change and disease transmission.

Journal of Applied Ecology, v. 53, n. 4, p. 1280–1288, 2016.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 597–611, 3 out. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41584-019-0276-9>>.

TADEI, V. A. **Distribuição do morcego vampiro, Desmodus rotundus (Chiroptera, Phyllostomidae) no estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos**. [s.l.: s.n.]

TEIXEIRA, L. H. M. et al. Distribuição espaço-temporal dos diagnósticos laboratoriais da raiva animal. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 144–157, 2015.

THOISY, B. De et al. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 2, p. 157–169, 2009.

TORDO, N. et al. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 6, p. 2671–2683, 1986.

TORRES-CASTRO, M. et al. West Nile and Zika viruses in bats from a suburban area of Merida, Yucatan, Mexico. **Zoonoses and Public Health**, n. April, p. 1–8, 2021.

UIEDA, W.; ATANAENA, F.; ANDRADE, G. De. Should the use the vampiricide paste be abolished in the control of the hematophagous bat, the main transmitter of rabies to humans and herbivores in Latin America? **American Journal of Biomedical Science & Research**, v. 10, n. 14, p. 396–397, 2020.

VAN BRUSSEL, K.; HOLMES, E. C. Zoonotic disease and virome diversity in bats. **Current Opinion in Virology**, v. 52, n. January, p. 192–202, fev. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625721001668>>.

VAN DE VUURST, P. et al. A database of common vampire bat reports. **Scientific Data**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2022.

VAN LEUR, S. W. et al. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2814–2838, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>>.

VARGAS, A.; ROMANO, A. P. M.; MERCHÁN-HAMANN, E. Raiva humana no Brasil: estudo descritivo, 2000-2017. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 28, n. 2, p. e2018275, 2019.

VICENTE-SANTOS, A. et al. Neotropical bats that co-habit with humans function as dead-end hosts for dengue virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–18, 2017.

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

WALLAU, G. L. et al. The Virome of Bats Inhabiting Brazilian Biomes: Knowledge Gaps and Biases towards Zoonotic Viruses. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n.

1, 2023.

WANG, L. F.; ANDERSON, D. E. Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. **Current Opinion in Virology**, v. 34, n. January, p. 79–89, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.007>>.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

WHO. First annual progress report: global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030. **Who/Cds/Ntd/Nzd/2019.04**, p. 1–38, 2019a.

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, Geneva. **Anais...** Geneva: 2019b. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/328053/WHO-CDS-NTD-NZD-2019.04-eng.pdf?ua=1>>.

WHO, O. P. A. H. O.-W. H. O. **YELLOW FEVER: Number of Confirmed Human Cases and Deaths in Endemic Countries of the Americas, since 1960**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://ais.paho.org/phi/viz/ed_yellowfever.asp>.

WILLE, M.; GEOGHEGAN, J. L.; HOLMES, E. C. HWILLE, M.; GEOGHEGAN, J. L.; HOLMES, E. C. How accurately can we assess zoonotic risk? **PLoS Biology**, v. 19, n. 4, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3001135>>.ow accurately can we assess zoonotic risk? **PLoS Biology**, v. 19, n. 4, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3001135>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **Rabies**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>>. Acesso em: 4 mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics 2017-2026**. [s.l.: s.n.]

WUNNER, W. H. et al. 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. v. 10, 1988.

WYNNE, J. W.; WANG, L. F. Bats and Viruses: Friend or Foe? **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1–4, 2013.

YANG, X. et al. Global burden for dengue and the evolving pattern in the past 30 years. **Journal of Travel Medicine**, v. 28, n. 8, p. 1–11, 2021.

ZORAIDA, F. et al. Identificação do vírus causador de encefalomielite eqüina, Paraná, Brasil. **Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 232–267, 2000. Disponível em: <www.fsp.usp.br/rsp>.

Material Suplementar

Figura 1: Características dos abrigos de *D. rotundus* mapeados no estado de São Paulo, Brasil, entre os anos 2021 e 2022.





Legenda: (A) Anhembi, (B) Pilar do Sul, (C) São Miguel Arcanjo, (D) Pilar do Sul, (E) Piedade, (F) Cabreúva, (G) Itu, (H) Lavrinha, (I) Lorena, (J) Sales Oliveira, (K) Jardinópolis.

Material Suplementar 2:

Quadro 2: qPCR de pan-flavivirus e alphavirus

RT-HIGH CAPACITY			SYBR GREEN qPCR-MIX FLAVIVIRUS			SYBR GREEN qPCR-MIX ALPHAVIRUS		
Reagentes	μL	X	Reagentes	μL	X	Reagentes	μL	X
H ₂ O DEPC	2,5		Master Mix-SYBR	12,5		Master Mix-SYBR	12,5	
Buffer	1,0		Flavi all-S (F) [10 μM]	2,0		F2A (F) [10 μM]	1,85	
Primer-R [10 μM]	0,5		Flavi all-S2 (R) [10 μM]	2,0		R2A (R) [10 μM]	1,85	
dNTPs [100 μM]	0,4		H ₂ O DEPC	3,5		R3A (R) [10 μM]	1,85	
Multiscribe RT	0,5					R4A (R) [10 μM]	1,85	
RNase out	0,1					H ₂ O Milli Q	0,1	
SubTotal MIX				20,0			20,0	
+ RNA	5,0		+ cDNA	5,0		+ cDNA	5,0	
Total	10,0			25,0			25,0	
Incubação:			1 ciclo: 2 min/50°C 1 ciclo: 10 min/95°C 40 ciclos: 15 seg/95°C 1 min/60°C 1 ciclo: 15 seg/95°C 1 ciclo: 1 min/60°C 1 ciclo: 15 seg/95°C			1 ciclo: 2 min/50°C 1 ciclo: 10 min/95°C 40 ciclos: 15 seg/95°C 1 min/60°C 1 ciclo: 15 seg/95°C 1 ciclo: 1 min/60°C 1 ciclo: 15 seg/95°C		
			NS5			nsP4 ~ 200 pb		

Legenda: Pan-Flavi F Pan-Flavi R