

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/05/2019.

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

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

Ana Paula Rodomilli Grisolio

Médica Veterinária

2017

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

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

Ana Paula Rodomilli Grisolio

Orientadora: Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

Coorientadores: Dra. Andressa de Souza Pollo

Dr. Luiz Fernando Pereira Vieira

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

2017

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

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

Orientadora: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

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

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

CDU 619:616.993:599.4

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: ANA PAULA RODOMILLI GRISOLIO

ORIENTADORA: ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO

COORIENTADOR: LUIZ FERNANDO PEREIRA VIEIRA

COORIENTADORA: ANDRESSA DE SOUZA POLLO

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



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



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



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



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



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

Jaboticabal, 18 de outubro de 2017

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

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

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

(Albert Einstein)

Dedico...

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

Amo vocês eternamente...

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pelas oportunidades.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito obrigada!

SUMÁRIO

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

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



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

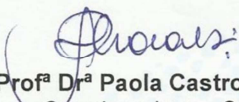


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 021916/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Filogeografia do vírus da raiva em morcegos insetívoros no Brasil"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de novembro de 2014.

Jaboticabal, 07 de novembro de 2014.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

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

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

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

7. CONCLUSÃO

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

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

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

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

9. REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SYFRES, B. **Zoonoses and communicable disease common to man and animals**. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, v. 2, 2003. p. 425.
- ALBAS, A.; CAMPOS, A. C. A.; ARAUJO, D. B.; RODRIGUES, C. S.; SODRÉ, M. M.; DURIGON, E. L.; FAVORETTO, S. R. Molecular characterization of rabies virus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 678-683, 2011.
- ALLENDORF, S. D.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; HARARY, C. M. A.; ANTUNES, J. M. A. P.; PERES, M. G.; VICENTE, A. F.; SODRÉ, M. M.; ROSA, A. R.; MEGID, J. Rabies virus distribution in tissues and molecular characterization of strains from naturally infected non-hematophagous bats. **Virus Research**, v.165, p.119-125, fev. 2012.
- ALVES, L. M.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; RICHTZENHAIN, J.; ITO, F. H. Pathogenesis of rabies vírus by ERA and PV strain administered orally in hamsters (*M. auratus*). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 79-84, 2003.
- AMOURI, I. K.; KHARMACHI, H.; DJEBBI, A.; SAADI, M.; HOGGA, N.; ZAHOUR, L. B.; GHRAM, A. Molecular characterization of rabies virus isolated from dogs in Tunísia: evidence of two phylogenetic variants. **Virus Research**, v. 158, n. 1-2, p. 246-250, 2011.
- AVISE, J.C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York. 1994.
- AZUAGA, L. B. S. **Características histomorfométricas gonadal e epididimal de *Nyctinomops laticaudatus* (É. Geoffroy, 1805) em Campos Grande/MS**. 2015. 44f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.
- BABBONI, S. D.; MODOLO, J. R. Raiva: Origem, Importância e Aspectos Históricos. **Journal of Health Sciences**, Paraná, v. 13, n. esp., p. 349-356, 2011.
- BAER, G. M. History of the rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 1-22.
- BANERJEE, A. K. Transcription and replication of Rhabdoviruses. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 66-87, 1987.

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

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.

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

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

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

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

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. p. 108.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E. M. S.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viroses in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, p.647-652, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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