NATHALIA GABRIEL DA CRUS

Caracterização genética de espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado do Ceará e sua correlação com o vírus da raiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2018

NATHALIA GABRIEL DA CRUS

Caracterização genética de espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado do Ceará e sua correlação com o vírus da raiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Silvana Regina Favoretto Lazarini

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Crus, Nathalia Gabriel da
Caracterização genética de espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado do Ceará e sua correlação com o vírus da raiva / Nathalia Gabriel da Crus; orientadora Dra. Silvana Regina Favoretto Lazarini. -- São Paulo, 2018.
78 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Canídeos silvestres. 2. Caracterização genética. 3. Raiva. 4. Ceará. 5. Nordeste do Brasil. I. Favoretto Lazarini, Dra. Silvana Regina, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

Candidato (a): Nathalia Gabriel da Crus

Título da Dissertação: Caracterização genética de espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado do Ceará e sua correlação com o vírus da raiva.

Orientadora: Dra. Silvana Regina Favoretto Lazarini

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o (a) candidato (a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **810/2016** referente ao projeto intitulado: ***"Caracterização molecular das espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado do Ceará e sua correlação com o vírus da raiva"*** sob a responsabilidade de ***Nathalia Gabriel da Crus*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Edison Luiz Durigon***, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 19 de maio de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 31/5/16
REL. N.º 966

A meus pais, Silvia e Altair, por acreditarem em mim e não medirem esforços para realizar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu a sabedoria para continuar e forças para não desistir.

Aos meus pais, Silvia e Altair e aos meus irmãos Karolyna e Vinycius. Vocês são as minhas certezas de que o amor é a única revolução verdadeira.

Ao meu noivo Bruno, por toda paciência, colaboração e amor nesses 3 anos de pesquisa. Obrigada por sempre estar disposto a fazer qualquer coisa para me ajudar.

A minha orientadora, Dra. Silvana Regina Favoretto Lazarini, por me aceitar como orientanda, por todo o ensinamento no decorrer do projeto e na execução deste trabalho. És uma inspiração.

A Dra. Danielle Bastos Araújo, por todo ensinamento e companheirismo na conclusão deste trabalho. Por tudo o que foi feito e dito. És uma inspiração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão da bolsa e auxílio financeiro, respectivamente, para a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, especialmente a vovó Neuza e a Tia Márcia por todas as lições e todo o amor que serão levados por toda a minha vida.

Ao Instituto Pasteur de São Paulo, por toda colaboração e oportunidades que me proporcionou.

A todo pessoal do NUVET e LACEN do Ceará, pela parceria no trabalho proposto, podendo assim, o mesmo ser concluído.

Ao Dr. Edison Luis Durigon, por me aceitar no laboratório de Virologia Clínica e Molecular e por ser uma grande inspiração de profissional e pessoa.

A Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira Durigon, por todas as vezes que me auxiliou, por todo ensinamento e amizade.

Aos professores da Universidade de São Paulo por todo conhecimento adquirido.

Ao Biomédico Flavio Mesquita e ao Biólogo Rafael Rahal, por todas as vezes que me ajudaram, por todo companheirismo e amizade.

A todos os alunos e funcionários do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho e por toda amizade.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Fábia, Eliane e Vânia por toda paciência e auxílio.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que torceram por mim e acreditaram que eu conseguiria.

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas."

Steve Jobs

(JOBS, 2007)

RESUMO

CRUS, Nathalia Gabriel da. **Caracterização genética de espécies de canídeos silvestres de ocorrência no estado do Ceará e sua correlação com o vírus da raiva**. 2018. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Mesmo sendo uma das zoonoses mais antigas descritas pelo homem, a raiva ainda é um grande desafio em todo o mundo. O ciclo da enfermidade em espécies silvestres apresenta importância emergente no Brasil e a região Nordeste apresenta uma epidemiologia única em comparação ao restante do país, por ser endêmica para o vírus da raiva em silvestres terrestres. Nesta região, foram identificadas as duas variantes do vírus da raiva responsáveis pelo acometimento da doença em seres humanos, que são mantidas e transmitidas por animais silvestres terrestres. Registros de casos nas espécies descritas como reservatórios, em outras espécies silvestres, domésticas e em humanos ocorrem anualmente. Estas variantes virais foram identificadas primeiramente no Estado do Ceará, uma em saguis do tufo branco (*Callithrix jacchus*) e a outra em canídeos silvestres, estando restritas à região Nordeste do Brasil até o momento. O objetivo do presente estudo foi identificar geneticamente, utilizando DNA mitocondrial, as espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado do Ceará, que atuam como reservatório e fonte de infecção do vírus da raiva, e a correlação entre esses reservatórios e o vírus. Para que fosse possível, utilizamos as técnicas de amplificação do gene Citocromo C Oxidase I (COI), bem como a amplificação da nucleoproteína do vírus da raiva pela Transcriptase Reversa e a Reação em Cadeia da Polimerase (RT - PCR). Todas as amostras que apresentaram banda representativa em gel de agarose, para ambos os casos, foram submetidas ao sequenciamento genético das regiões amplificadas. De um total de 101 amostras recebidas, 89 obtiveram sequências satisfatórias para a identificação da espécie de canídeo silvestre, sugerindo que a principal espécie de canídeo silvestre presente no Estado do Ceará é o *Cerdocyon thous* e, 50 amostras obtiveram banda representativa para o vírus da raiva. Dessas, 48 apresentaram sequência satisfatória para a caracterização do vírus. Os resultados obtidos indicam alta positividade para o vírus da raiva em canídeos silvestres nessa região do Brasil, e sugerem que *C. thous* é a principal espécie de canídeo silvestre atuando como reservatório e transmissor do vírus da raiva no

Estado do Ceará. Esses dados fornecem informações valiosas sobre as espécies de canídeos envolvidas nos casos de raiva ocorridos no Estado do Ceará, possibilitando a adoção de estratégias efetivas de prevenção e controle da raiva, além de resultados inéditos em relação às espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado e sua importância na epidemiologia da enfermidade.

Palavras-chave: Canídeos Silvestres, Caracterização Genética, Raiva, Ceará, Nordeste do Brasil.

ABSTRACT

CRUS, Nathalia Gabriel da. **Genetic characterization of species of wild canids in the state of Ceara and its correlation with the rabies virus**. 2018. 78p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Although it is one of the most ancient diseases related in human history, rabies still presents a great challenge throughout the world. Wild animals have emergent importance in Brazil and the Northeast region, an endemic region, presents a unique epidemiology compared to the rest of the country. In this region, two variants of the rabies virus responsible for the disease in humans, were identified which are maintained and transmitted by terrestrial wild animals. These variants were initially identified in the State of Ceara, one maintained by populations of marmosets (*Callithrix jacchus*) and other by wild canids, both being restricted to time to the Northeast. The aim of this study was to identify genetically, using the mitochondrial DNA, the species of wild canids in Ceara that act as reservoir and transmitters of the rabies virus. We used the Polymerase Chain Reaction by Reverse Transcriptase (RT - PCR) tecnique for amplification of Citocrhome C Oxidase I (COI) gene to species characterization and the viral nucleoprotein to detect the rabies virus. All the samples that presented representative band on agarose gel, in both cases, were submitted to the genetic sequencing. Of a total of 101 samples received, 89 obtained satisfactory sequences to identify the wild canid species, suggesting that the main wild canid species occurring in Ceara state is *Cerdocyon thous.* Out of 50 samples with representative band to rabies virus, 48 presented satisfactory sequences to the viral characterization. The results indicate high positivity for rabies virus in wild canids in this region of Brazil, and suggest that *C. thous* is the main terrestrial wild reservoir e transmitter of rabies virus in Ceara State. These data provide valuable information about canids species involved in rabies cases in Ceara state, implying in the adoption of effective strategies for prevention and control of rabies, and also unpublished results regarding the occurrence of species of wild canids in the State and its importance in the disease epidemiology.

Key-words: Wild canids, Genetic characterization, Rabies, Ceara, Northeast of Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do vírus da Raiva. 25

Figura 2. Representação esquemática da organização do genoma do vírus da raiva. 26

Figura 3. Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva. 28

Figura 4. Cachorro do mato *Cerdocyon thous*.....33

Figura 5. Distribuição geográfica do *Cerdocyon thous* (adaptado).....34

Figura 6. Raposa do campo *Lycalopex vetulus*. 35

Figura 7. Distribuição geográfica do *Lycalopex vetulus* (adaptado). 36

Figura 8. Representação esquemática do DNA mitocondrial animal.....38

Figura 9. Mapa do Brasil evidenciando o Estado do Ceará (adaptado). 41

Figura 10. Mapa do Estado do Ceará evidenciando os municípios pertinentes às amostras (adaptado). 42

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para o Citocromo C Oxidase I (COI). 53

Figura 12. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) construída pelo programa MEGA 7.0, para o Citocromo C Oxidase I (COI). 54

Figura 13. Resultado da análise no sistema BLAST da amostra CanSilvCE478_13 com o banco de dados do NCBI.....56

Figura 14. Resultado da análise no sistema BLAST da amostra CanSilvCE138_16 com o banco de dados do NCBI.....56

Figura 15. Resultado das análises no sistema BLAST das amostras CanSilvCE362_12, CanSilvCE56_13, CanSilvCE276_13, CanSilvCE296_13, CanSilvCE329_13, CanSilvCE02_14, CanSilvCE14_15, CanSilvCE363_15, CanSilvCE454_15 e CanSilvCE388_16 com o banco de dados do NCBI. 57

Figura 16. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (maximum likelihood) contruída pelo programa MEGA 7.0, para o Citocromo C Oxidase I (COI). 58

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para a nucleoproteína do vírus da raiva. 60

Figura 18. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) construída pelo programa MEGA 7.0, para a nucleoproteína do vírus da raiva. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primer*, polaridade, sequência dos *primers* e localização no gene, utilizados para amplificação do DNA mitocondrial de canídeos silvestres e detecção do RNA do vírus da raiva. 44

Tabela 2. Identificação e procedência das amostras de canídeos silvestres do Estado do Ceará, Brasil. 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. – Antes de Cristo

AgV1 – Variante Antigênica 1

AgV2 – Variante Antigênica 2

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

cDNA – DNA complementar

COI – Citocromo Oxidase subunidade I

DEPEC - Dietilpirocarbonato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: *Desoxy Nucleic Acid*)

DNAmit – DNA mitocondrial

et al. – E colaboradores

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

g - Gramas

ICTV – Comitê de Taxonomia Viral (do inglês: *International Comittee on Taxonomy of Viruses*)

IFD – Imunofluorescência Indireta

IVC – Inoculação Viral em Camundongos

kb – Kilobase

kg - Quilograma

MAbs – Anticorpos Monoclonais (do inglês *Monoclonal antibodies*)

mL – Mililitros

µL – Microlitros

mM – Milimolar

µM - Micromolar

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

nm – Nanômetros

NUEND - Núcleo de Controle das Endemias Transmissíveis por Vetores

NUVET - Núcleo de Controle de Vetores

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal (do inglês: *World Organisation for Animal Health*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*)

pH – Potencial hidrogeniônico

RABV – *Rabies lyssavirus*

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic Acid*)

RNP – Ribonucleoproteína

rpm – Rotações por minuto

rRNA – RNA ribossômico

RT – Transcriptase Reversa (do inglês: *Reverse Transcriptase*)

SisBio - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SNC – Sistema Nervoso Central

ssRNA – RNA fita simples (do inglês *single-stranded RNA*)

tRNA – RNA transportador

U - Unidades

UV – Ultravioleta

VSV - Vírus da estomatite vesicular

WHO – World Health Organization

SÍMBOLOS

% - Percentual

°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 REVISÃO DA LITERATURA 22
2.1 Breve histórico da raiva 22
2.2 Classificação do vírus 23
2.3 Morfologia, estrutura e replicação viral 25
2.4 Fisiopatologia 28
2.5 Diagnóstico da raiva 29
2.6 A raiva silvestre no Brasil 30
2.7 Os canídeos silvestres e o vírus da raiva 31
2.8 Identificação de espécies utilizando o DNA mitocondrial 37
3 OBJETIVO GERAL 40
3.1 Objetivos específicos 40
4 MATERIAIS E MÉTODOS 41
4.1 Área de estudo e amostras 41
4.2 Extração do ácido nucleico total 43
4.3 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 44
4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) 44
4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase e Transcriptase Reversa (RT- PCR) 45
4.6 Sequenciamento genético 46
4.7 Análises filogenéticas 47
5 RESULTADOS 49
5.1 Área de estudos e amostras 49
5.2 Análises filogenéticas dos canídeos silvestres 53
5.3 Análises filogenéticas do vírus da raiva 59
6 DISCUSSÃO 63
7 CONCLUSÃO 68
REFERÊNCIAS 69

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose responsável por cerca de milhares de mortes e 15 milhões de tratamentos pós-exposição de seres humanos em todo o mundo anualmente (WHO, 2018).

O vírus da raiva é composto de ácido ribonucleico (RNA) fita simples, linear, não segmentado de polaridade negativa. Apresenta cinco genes responsáveis por codificar as proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase viral (L) (TORDO et al., 1986a). A proteína N é primordial para a disseminação viral e um dos principais alvos para diagnóstico da doença (KOPROWSKI, 1995).

Todos os seres pertencentes à classe Mammalia são susceptíveis ao vírus da raiva, em especial os das ordens Carnivora e Chiroptera. A doença acontece em dois ciclos epidemiológicos: o terrestre, com os cães como principal reservatório e transmissor, além de várias espécies de silvestres terrestres, e o aéreo, mantido e transmitido por espécies de quirópteros (FAVORETTO et al., 2013).

As espécies responsáveis pela manutenção dos ciclos irão variar em relação às regiões geográficas. No Brasil, foram identificadas cinco linhagens genéticas do vírus responsáveis pela transmissão direta a seres humanos: três linhagens em espécies silvestres: cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) e sagui do tufo branco (*Callithrix jacchus*), e duas linhagens genéticas mantidas por populações de cães domésticos, relacionadas às variantes antigênicas 1 e 2 (AgV1 e AgV2) (BRASIL, 2018; FAVORETTO et al., 2013).

Os morcegos hematófagos são os principais reservatórios e transmissores do ciclo aéreo da raiva no Brasil (CASTILHO et al., 2010). Outras espécies de animais silvestres também fazem parte da epidemiologia da doença, sendo responsáveis pela disseminação a seres humanos e outras espécies animais, em especial, na região Nordeste do Brasil (FAVORETTO et al., 2001; 2006, CARNIELI et al., 2008).

A raiva mantida em populações silvestres torna-se um importante problema de saúde pública no Brasil em virtude do risco de transmissão para seres humanos e espécies domésticas. Entre 2015 e 2017, foram registrados 391 casos de raiva em morcegos não hematófagos, 44 em morcegos hematófagos, 68 em canídeos silvestres e 11 em primatas não humanos (BRASIL, 2018).

Nos anos de 1980, com o advento das técnicas de biologia molecular, uma variante viral transmitida de forma direta a seres humanos, foi identificada em saguis da espécie *Callithrix jacchus* que, entre os anos de 1991 e 1998, acometeram humanos após exposição a saguis no Estado do Ceará. Até o momento não se tem relatos de similaridade antigênicas ou genéticas com nenhuma outra variante do vírus da raiva (quiróptera ou carnívora) (FAVORETTO et al., 2001) e, encontra-se restrita a região Nordeste do país (BRASIL, 2018). Da mesma forma, outra linhagem do vírus da raiva, mantida por canídeos silvestres, foi identificada neste período. Estes dados mostram a situação epidemiológica da região Nordeste quando comparada a outras regiões do Brasil, o que a torna única.

Os canídeos silvestres desempenham importante papel na manutenção do vírus e transmissão da doença. O cachorro do mato (*Cerdocyon thous)* foi classificado como o principal reservatório e transmissor da raiva (CARNIELI et al., 2006), sendo responsável por manter uma variante genética independente, oriunda da que se mantém em cães, também isolada de guaxinim (*Procyon cancrivorous*) e um caso em humano (FAVORETTO et al., 2006).

Apesar de se acreditar que os animais da espécie *C. thous* possam ser os principais responsáveis pela manutenção do vírus da raiva em canídeos silvestres, nesta região, outras espécies podem estar envolvidas. No estudo realizado por Carnieli et al. em 2008, com amostras positivas para a raiva provenientes de canídeos da região Nordeste do Brasil (o qual não incluiu o Estado do Ceará), os *C. thous* foram a maioria, porém o vírus também pôde ser isolado de mais duas outras espécies como *Lycalopex gymnocercus* e *Lycalopex vetulus*.

É importante frisar que, embora estas variantes virais estejam restritas a região Nordeste até o momento, as espécies acometidas possuem ocorrência em todo o país, apresentando fácil socialização e adaptação.

A rápida tomada de decisões é crucial para evitar o acometimento de seres humanos. O uso de técnicas diagnósticas aplicadas à epidemiologia também é de muita importância para o conhecimento das formas de transmissão da doença em animais domésticos e silvestres, possibilitando a aplicação de medidas mais eficientes para prevenção e controle da doença em animais e humanos (TRIMARCHI & NADIN-DAVIS, 2007).

O estudo acerca da presença do vírus da raiva em diferentes espécies domésticas e silvestres e, sobre a forma como os seres humanos foram expostos é

importante para se esclarecer os reservatórios causadores da manutenção do vírus na natureza (RUPPRECHT, 1991). Esse conhecimento é necessário para a adoção de medidas eficientes para a prevenção e controle da doença. No Brasil, não há vacinação de animais silvestres, mas há a realização de uma vigilância passiva por meio da identificação viral em animais que são encontrados mortos em estradas e rodovias, bem como treinamento em vigilância e manejo de animais silvestres (BRASIL, 2018).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Breve histórico da raiva

A raiva é uma das doenças mais antigas que se tem relatos, sendo descrita pela primeira vez na Mesopotâmia, após vários casos de mortes humanas serem atribuídas a mordeduras de cães, relatadas no código de *Eshunna*, aproximadamente 1.930 anos a. C.. É considerada uma das zoonoses mais importantes, pois, com o aparecimento dos sintomas, torna-se absolutamente fatal (STEELE, FERNANDEZ, 1991; WUNNER, 2002).

A literatura registra desde a antiguidade citações de escritores gregos e romanos acerca da doença, o que sugere que a raiva era uma doença bem conhecida para a época. Chamada de *lyssa* ou *litta* pelos gregos, que quer dizer loucura, quando associada à palavra *rabhas* da língua sânscrita, uma língua ancestral da Índia, sugeria “tornar-se violento”. Além de também ser chamada de hidrofobia, uma vez que a pessoa acometida pela doença é atormentada ao mesmo tempo em que possui sede, mas tem medo da água (STEELE, FERNANDEZ, 1991).

Os estudos acerca da doença surgiram por volta do século 23 a. C., quando muitas vezes era associada a teorias sobrenaturais que tentavam descrever o surgimento da doença como também ações de prevenção e tratamento (STEELE, FERNANDEZ, 1991).

Apesar de todos os avanços tecnológicos e científicos, a raiva ainda é uma das doenças tropicais negligenciadas e está distribuída mundialmente, com algumas exceções, nos países considerados livres da doença. A perpetuação da doença ocorre devido às espécies animais que servem como reservatórios e transmissores, variando de acordo com a distribuição geográfica e temporal. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 59.000 mortes humanas por raiva acontecem no mundo e as agressões por cães raivosos são responsáveis por 99% dessas transmissões, com maior número de casos nos continentes Africano e Asiático e 40% das vítimas são crianças com idade entre 5 e 14 anos. Anualmente, mais de 15 milhões de pessoas recebem o tratamento pós-exposição no mundo, prevenindo milhares de mortes (WHO, 2018).

Nas Américas, a raiva silvestre continua presente, os morcegos são os principais transmissores da doença, seguidos pelas raposas, guaxinins, gambás, chacais, fuinhas e outros carnívoros silvestres (WHO, 2018).

Em 2015, um sistema global para alcançar Zero Mortes Humanas por Raiva até 2030 foi lançado pela OMS e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), em colaboração com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Aliança Global para Controle da Raiva, marcando a primeira vez que ambos os setores, raiva animal e humana, adotem uma estratégia comum contra essa doença negligenciada (WHO, 2018).

2.2 Classificação do vírus

O vírus da raiva é um *Lyssavirus* pertencente à família *Rhabdoviridae*, uma família com grande diversidade viral que acomete vertebrados, invertebrados e plantas. Além dos *Lyssavirus*, mais dois gêneros fazem parte dessa família, *Ephemerovirus*, com seu principal representante o vírus da febre efêmera dos bovinos e *Vesiculovirus*, com seu principal representante o vírus da estomatite vesicular (VSV). Em conjunto com as famílias *Bornaviridae*, *Filoviridae* e *Paramyxoviridae*, formam uma “superfamília” da ordem *Mononegavirales* (do grego *Monos* “único, simples”, *Nega* “RNA de polaridade negativa” e do latim *Virales* “vírus”) a qual compreende os vírus constituídos de uma única molécula de RNA (ssRNA), não segmentado, de polaridade negativa, não infeccioso (FAUQUET et al., 2004).

Até o momento, 16 espécies virais fazem parte do gênero *Lyssavirus* (do grego *Lyssa* “loucura”) de acordo com o Comitê de Taxonomia Viral – ICTV [do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*] (ICTV, 2018):

Rabies lyssavirus (RABV), amostras clássicas do vírus da raiva as amostras selvagens isoladas de animais e as amostras fixas ou vacinais, distribuídas mundialmente (TORDO, 1996; WUNNER, 2007).

Lagos bat lyssavirus (LBV) que foi isolada primeiramente de um morcego frugívoro (*Eidolon helvum*) em 1956 na Nigéria (BOULGER & PORTERFIELD, 1958; KUZMIN et al., 2003) e, posteriormente, de um outro morcego (*Micropterus pusillus*) na África Central em 1974 (KING e TURNER, 1993).

MoKola lyssavirus (MOKV) que foi isolada de roedores e musaranhos (*Crocidura* sp.), além de cães e crianças na Nigéria em 1968 e 1971 (SHOPE et al., 1970; FAMILUSI et al., 1972; KEMP et al., 1972; KUZMIN et al., 2003) e de gatos no Zimbabwe (VON TEICHMAN, 1998; KUZMIN et al., 2003).

Duvenhage lyssavirus (DUVV), originalmente isolada em 1970 na África de um homem que morreu após ser agredido por um morcego (MEREDITH et al., 1971). Posteriormente, em 1981, foi isolada de um morcego *Miniopterus* sp. também na África (KUZMIN et al., 2003).

European bat lyssavirus 1 (EBLV1), identificado primeiramente em 1968 na Alemanha em um morcego da espécie *Eptesicus serotinus* (SCHNEIDER et al., 1985; DIETZSCHOLD et al., 1988; SCHNEIDER e COX, 1994). Posteriormente, em 1985 foi isolado na Polônia (LAFON et al., 1986), na Ucrânia e de um caso humano relacionado a morcego na Rússia (SELIMOV et al., 1989, 1991; KUZMIN et al., 2003), em 1987 na Dinamarca, Espanha e Holanda e, em 1989 na França (BOURHY et al., 1992).

European bat lyssavirus 2 (EBLV2), isolado em 1985 na Finlândia de um humano (BOURHY et al., 1993; TORDO, 1996) e em morcegos na Holanda, Reino Unido e Suíça, sendo mantido por morcegos insetívoros do gênero *Myotis* (KING et al., 1994; KUZMIN et al., 2003).

Australian bat lyssavirus (ABLV), isolado em 1996 em humanos e também de cinco espécies de morcegos raposa-voadora e uma espécie de morcego insetívoro na Austrália (FRASER et al., 1996; GOULD et al., 1998; KUZMIN et al., 2003).

Aravan lyssavirus (ARAV) – identificada primeiramente na espécie de morcego *Myotis blythi* na região do Quirguistão na Ásia Central (ARAI et al., 2003; KUZMIN et al., 2003).

Khujand lyssavirus (KHUV) – identificada em morcegos da espécie *Myotis daubentoni* no Tajiquistão em 2001 (KUZMIN et al., 2003).

Irkut lyssavirus (IRKV) – identificada em morcegos da espécie *Murina leucogaster* na Província de Irkustk – Rússia em 2002 (KUZMIN et al., 2005).

West Caucasian bat lyssavirus (WCBV) – identificada em morcegos da espécie *Miniopterus schreibersii* na região de Krasnodar na Rússia (KUZMIN et al., 2005).

Ikoma lyssavirus (IKOV) – identificada em uma civeta africana da espécie *Civettictis civetta* na região de Ikoma, Nordeste da Tanzânia em 2009 (MARSTON et al., 2012).

Shimoni bat lyssavirus (SHIBV) – identificada em morcegos insetívoros da espécie *Hipposideros commersoni* na região de Shimoni no Kenya em 2009 (KUZMIN et al., 2010).

Bokeloh bat lyssavirus (BBLV) – isolado pela primeira vez de um morcego de franja da espécie *Myotis nattereri* na Alemanha em 2010 e na França em 2012 (FREULING et al., 2011; PICARD-MEYER et al., 2013).

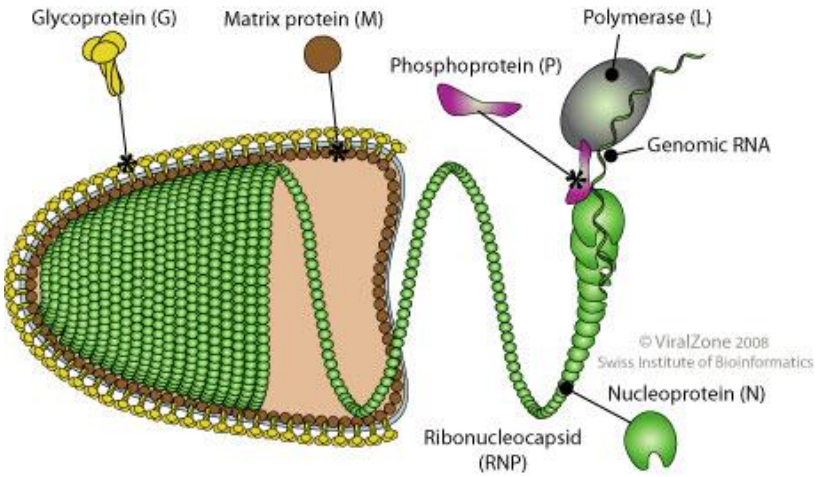
Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV) – isolado de morcegos conhecidos como raposas voadoras indianas, da espécie *Pteropus giganteus* em Sri Lanka entre 2014 e 2015 (GUNAWARDENA et al., 2016).

Lleida bat lyssavirus (LLEBV) – isolado de um morcego da espécie *Miniopterus schreibersii* na cidade de Lleida na Espanha em 2011 (CEBALLOS et al., 2013).

2.3 Morfologia, estrutura e replicação viral

Similar aos outros membros da família *Rhabdoviridae*, o vírus da raiva possui uma forma cilíndrica com uma extremidade arredondada e a outra plana que lembra a forma de um projétil. Apresenta um envelope lipídico com espículas por toda sua extensão, exceto na porção plana, provenientes da célula hospedeira no momento da lise celular, após a replicação. Seu diâmetro é de 75 nm (45 nm a 100 nm) e possui variação em seu comprimento de 100 a 300 nm. A partícula viral é constituída de nucleocapsídeo helicoidal e envelope viral (FAUQUET et al., 2004). Todas as estruturas do vírus estão representadas na figura 01.

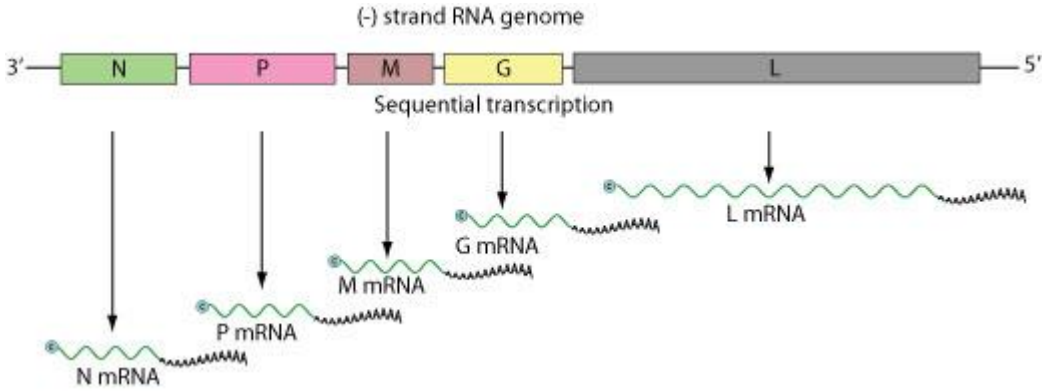
Figura 1. Representação esquemática do vírus da Raiva.



Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/22.html

O genoma do vírus da raiva possui uma molécula única de RNA, não segmentada e polaridade negativa não infecciosa. A cepa Pasteur, cepa clássica, possui 11.932 nucleotídeos (aproximadamente 12 Kb) e, de acordo com Flamand e Delagneu em 1978 e Tordo et al. em 1986a, codifica 5 proteínas na ordem da extremidade 3' para 5' (N, P, M, G e L). As proteínas codificadas pelo vírus da raiva estão esquematizadas na figura 02.

Figura 2. Representação esquemática da organização do genoma do vírus da raiva.



Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/2.html

A ribonucleoproteína (RNP) ou nucleocapsídeo é uma associação do RNA genômico com as proteínas N, P e a L (SOKOL et al., 1969; FAUQUET et al., 2004). A proteína N é a mais conservada entre os diferentes genótipos de *Lyssavirus* e é a proteína mais abundante do capsídeo. Tem como funções proteger o genoma contra endonucleases, regulação da replicação, modular a transcrição e interagir com a proteína P na replicação e tradução (WUNNER, 2002). A proteína P interage com as proteínas N e L e acredita-se que suas funções estejam ligadas a replicação viral, atuando como co-fator da RNA polimerase e interagindo com outros fatores celulares, provavelmente envolvidos na disseminação do vírus (WUNNER, 2007). A proteína L é a maior do genoma viral, ocupando aproximadamente 54% de sua extensão (WUNNER, 2007). Ela age como um complexo enzimático, responsável pela maioria das atividades enzimáticas do vírus tanto na transcrição quanto replicação viral (TORDO et al., 1988).

O envelope viral é uma bicamada lipídica derivada da associação de duas proteínas, a M e a G. A proteína M tem a função de manter a ligação entre o

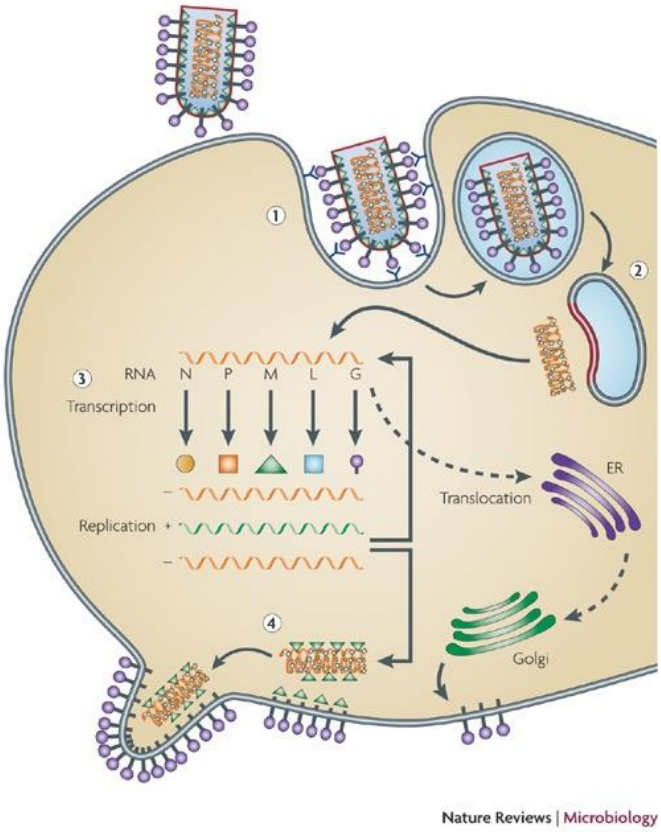
envelope e o nucleocapsídeo e à morfogênese da partícula viral antes do brotamento (SOKOL et al., 1971; DELAGNEAU et al., 1981; TORDO et al., 1986b). A proteína G é a única proteína do vírus que é transmembranária e que se projeta para o exterior com espículas glicosiladas constituídas por trímeros (WUNNER et al., 1985; TORDO et al., 1986b). Além disso, a proteína G é responsável pela fixação da partícula viral nos receptores da célula hospedeira, participando da endocitose e da fusão da membrana do vírus com a vesícula endossomal (PERRIN et al., 1982; GAUDIN et al., 1991; GAUDIN et al., 1993).

Na replicação viral, o primeiro evento é a adsorção do vírus na membrana da célula hospedeira por ação da proteína G com os receptores do hospedeiro. O vírus penetra na célula por endocitose e libera a ribonucleoproteína no citoplasma celular, através da fusão do envelope viral ao vacúolo lisossomal. É iniciada a transcrição do RNA viral nos cinco RNAs mensageiros (mRNA)s no sentido positivo, realizada pela proteína L que tem a função de RNA polimerase – RNA dependente. Após a tradução das cinco proteínas, é iniciada a replicação do genoma viral, também realizada pela proteína L, primeiramente sintetizando o anti-genoma de polaridade positiva, que servirá de molde para a produção de genoma viral de polaridade negativa (TORDO, 1996).

Quando o número de proteínas virais N, P, L, M, G e RNA genômico são suficientes para que haja infecção de novas células ocorre à morfogênese, ou seja, a montagem do vírus. As proteínas M e G deslocam-se em direção à membrana celular ao mesmo tempo em que as ribonucleoproteínas são formadas e em seguida ocorre a gemação do *virion* (WUNNER, 2007). Durantes esses eventos, a célula hospedeira continua metabolicamente competente. A morfogênese do vírus está associada à formação dos corpúsculos de Negri, uma matriz intracitoplasmática que antecede a formação dos novos *virions* (MATSUMOTO, 1962). No estudo de Lahaye et al. (2009), há evidências de que o corpúsculo de Negri seja o local onde ocorrem a replicação e a transcrição do vírus da raiva.

Ao final da morfogênese, ocorre o revestimento do *virion* pela membrana da célula hospedeira, devido à pressão exercida pela RNP nos locais onde há as proteínas G e M, formando assim o envelope viral e ocorrendo a liberação das novas partículas infectantes (GAUDIN et al., 1993). O esquema da replicação do vírus da raiva é apresentado na figura 03.

Figura 3. Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva.



Adaptado e disponível em:
http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n1/fig_tab/nrmicro2260_F3.html

2.4 Fisiopatologia

Por ser um vírus neurotrópico, o vírus da raiva causa uma infecção aguda do sistema nervoso central e sua patogenicidade está associada à difusão do vírus dos nervos periféricos ao sistema nervoso central (THOULOUZE et al., 1998).

Na maioria dos casos, a infecção ocorre após a mordedura ou arranhadura de um animal que esteja eliminando o vírus pela saliva. Outra via de transmissão é a inalação de aerossóis, em cavernas onde haja grande concentração de morcegos infectados com o vírus (JOHNSON; PHILLPOTTS; FOOKS, 2006; WARREL, 1995). Há relatos ainda, sobre a contaminação por meio de transplantes de órgãos de doadores contaminados. Em 2004 foram descritos três casos de pacientes que receberam órgãos de um mesmo doador em comum e desenvolveram a doença, o

que leva a acreditar que havia vírus nas terminações nervosas dos órgãos, já que, não existem relatos de disseminação do vírus por via hematológica (CDC, 2004).

Antigamente acreditava-se que os sinais clínicos variavam de acordo com o hospedeiro do vírus, do local e quantidade de vírus inoculada (RUPPRECHET et al., 2002). A forma clássica da doença apresenta sintoma inicial não específico e pode sugerir sintomas respiratórios, gastrointestinais e/ou comprometimento do sistema nervoso central. Na fase inicial, a disfunção neurológica é inespecífica, levando a raiva a ser confundida com outras doenças. Já na fase aguda, é predominante os sinais de hiperatividade (raiva furiosa) ou paralisia (raiva silenciosa), mas que em ambos os casos causam paralisia progressiva, coma e morte. No ser humano, a forma furiosa da doença resulta em taquicardia, após episódios de agitação, movimentos bruscos, respiração acelerada e febres altas. A hidrofobia é um sintoma muito característico na raiva em seres humanos, levando o paciente a ter contrações musculares, espasmos respiratórios e estado de angústia, coma, sendo a morte decorrente de parada respiratória ou cardíaca (FISHBEIN, 1991). Nos animais não há descrição da hidrofobia. Atualmente, estudos sugerem que os sinais clínicos associados à forma furiosa ou paralítica da doença derivam da variante viral envolvida (HEMACHUDHA et al., 2002;2005;2013). A violência comumente associada à raiva está relacionada com as variantes virais que mantém o ciclo terrestre de transmissão da doença. A raiva silenciosa, onde se observa a paralisia dos músculos, derivada de transmissão do vírus pelo ciclo aéreo (BAER, 1991), (INSTITUTO PASTEUR, 2018).

2.5 Diagnóstico da raiva

A OMS recomenda os métodos de Imunofluorescência direta (IFD) e de isolamento viral em cultivo celular ou por inoculação em camundongos, para detectar o vírus em amostras de sistema nervoso central suspeitas. O isolamento e a IFD devem ser realizados de forma paralela e a imunofluorescência deve ser ainda utilizada como confirmação dos resultados positivos no isolamento. O isolamento em animais deve ser substituído por métodos alternativos sempre que possível (WHO, 2018).

As técnicas que envolvem a utilização de anticorpos monoclonais (MAbs) e biologia molecular concedem um conhecimento aprofundado sobre a epidemiologia

da raiva ao permitir a identificação de focos e de novos ciclos, assim como a determinação da fonte de infecção nos casos com espécies agressoras não conhecidas (DE MATTOS et al., 1999; PAHO/WHO, 2000).

Os estudos epidemiológicos do vírus da raiva avançaram na década de 80, após a disponibilização dos anticorpos monoclonais para análises antigênicas, produzidos através da imunização de camundongos com a vacina inativada e a técnica de imunofluorescência indireta estabelecida por WIKTOR & KOPROWSKI (1978) (FAVORETTO et al., 2002).

As técnicas de biologia molecular tem sido utilizadas na caracterização genética das variantes virais (FAVORETTO et al., 2001; 2006; HEINEMANN et al., 2002; CARNIELI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010; ALBAS et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012). A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) mostrou ser eficiente para diagnosticar o vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central em decomposição, até mesmo nos casos em que as técnicas de IFD e inoculação não possibilitam a obtenção de um resultado diagnóstico (FAVORETTO et al., 2006, ARAUJO et al., 2008).

2.6 A raiva silvestre no Brasil

As espécies silvestres que são normalmente encontradas com raiva no Brasil englobam os morcegos, hematófagos e não hematófagos, os canídeos silvestres (*C. thous* e *P. vetulus*) e os saguis (*Callithrix* spp.). Espécies como os coatis (*Nasua nasua*), gambás (*Didelphis* spp.), guaxinins (*Procyon cancrivorous*) e outros primatas não-humanos eventualmente são diagnosticadas com a doença. Todos os anos, canídeos silvestres são diagnosticados com raiva. Em 2008, Carnieli et al. iniciou a identificação de canídeos silvestres de algumas regiões do Nordeste do Brasil, facilitando assim a organização dos dados de vigilância. Curiosamente, observou-se que todos os casos estão restritos a região Nordeste do Brasil, onde também havia um grande número de casos de raiva em cães.

Com os programas de vigilância e controle da raiva, nas últimas décadas, houve uma diminuição dos casos de raiva transmitida por cães no Brasil. Consequentemente, a observação da ocorrência dos casos de raiva silvestre, especialmente nas regiões Norte e Nordeste aumentou (CARNIELI et al., 2008, 2013; FAVORETTO et al., 2013).

A raiva ocorre em dois ciclos, o aéreo, mantido por populações de morcegos e o terrestre, que tem como seu principal reservatório o cão (BELOTTO et al., 2005). Os animais silvestres representam um risco importante tanto para o ciclo aéreo quanto para o ciclo terrestre de transmissão da raiva em todas as regiões do mundo com dados de ocorrência do vírus. A epidemiologia da doença demonstra claramente a importância da interação entre animais, meio ambiente e seres humanos para a manutenção e reemergência de ciclos epidemiológicos da raiva. A identificação de variantes mantidas por animais silvestres e transmitidas a humanos de forma direta (FAVORETTO et al., 2013) e de uma cepa isolada em macacos-prego (KOBAYASHI et al., 2013) são exemplos da necessidade de estudos e vigilância constantes da doença na fauna silvestre.

Na região Nordeste do Brasil, a raiva silvestre é mantida principalmente pelos morcegos hematófagos e não hematófagos, os primatas não-humanos da espécie *Callithrix jacchus* e os canídeos silvestres, em especial a espécie *Cerdocyon thous*, que após estudos ecológicos e epidemiológicos foi sugerido como o principal reservatório da raiva nessa região, seguido pelo *Lycalopex vetulus* (FAVORETTO et al., 2001; Ito et al., 2001; CARNIELI et al., 2008; FAVORETTO et al., 2013).

Dados do Ministério da Saúde mostram que entre os anos de 2011 e 2016 foram realizadas 45.549 notificações profiláticas para raiva após ataques de animais silvestres no Brasil. Os morcegos somam 22.822 ataques a seres humanos, seguido dos primatas não-humanos com 18.110 ataques, e os canídeos silvestres com 4.617 ataques. Em relação aos cães domésticos, foram realizadas 3.001.857 notificações preventivas para raiva. Dados atualizados até o mês de Maio de 2017. Entre os anos de 2010 e 2017, foram registrados 25 casos de raiva em seres humanos, ressaltando que no ano de 2014 não houve casos de raiva humana registrados no Brasil. Os animais silvestres foram responsáveis por 12 casos de transmissão da raiva a seres humanos, 8 casos transmitidos por morcegos (hematófagos e não hematófagos) e 4 casos por primatas não-humanos. Não há relatos de casos de raiva transmitidos por canídeos silvestres (BRASIL, 2018).

2.7 Os canídeos silvestres e o vírus da raiva

Os membros da família *Canidae* apareceram na América do Sul ao final do Plioceno e começo do Pleistoceno, vindo da América do Norte pelo canal do

Panamá, há aproximadamente 3 milhões de anos atrás e alcançando a diversidade encontrada hoje em dia (BERTA, 1987). Há dez espécies endêmicas de canídeos atualmente na América do Sul, o que mostra a grande diversidade da família no continente, que se dá pelo fato de que os animais possuem grande adaptação à variedade de habitats e por sua alimentação generalista e oportunista, que possuem como presas vertebrados, invertebrados e frutas (BERTA, 1987; GINSBERG & MACDONALD, 1990; WOZENCRAFT, 2005).

De acordo com Wilson e Reeder (1993), no Brasil são encontradas seis espécies de canídeos, sendo elas *Speothos venaticus* (o cachorro vinagre), *Atelocynus microtis* (cachorro do mato de orelhas curtas), *Chrysocyon brachyurus* (lobo guará), *Cerdocyon thous* (cachorro do mato), *Lycalopex vetulus* (raposa do campo) e *Lycalopex gymnocercus* (graxaim do campo). Exceto a *A. microtis* e *L. gymnocercus*, que são encontradas na região Amazônica e Sudeste respectivamente, as demais espécies são encontradas na região Nordeste do Brasil. Já as espécies *C. brachyurus* e *S. venaticus* são encontradas em todo o país com exceção da floresta Amazônica. O *L. vetulus* é encontrado no cerrado, zonas de transição e Pantanal e o *C. thous* não é encontrado na região central da floresta Amazônica (COURTENAY & MAFFEI, 2004).

Devido a similaridades morfológicas das espécies de canídeos silvestres envolvidas na transmissão da raiva na região Nordeste, *C. thous* e *L. vetulus*, e pela distribuição sobreposta dessas duas espécies, que podem confundir pesquisadores inexperientes na identificação dos mesmos, Carnieli et al. (2008), analisaram o ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial de canídeos silvestres positivos para raiva nessa região, com exceção do Estado do Ceará e observaram que a maior parte das amostras pertenciam à espécie *C. thous*.

Por possuir hábitos sinantrópicos, o *C. thous* representa um grande problema de saúde pública, pois pode estar constantemente em contato com cães domésticos, devido ao desmatamento, o que faz com que esses animais se movam para as áreas urbanas (HALPIN et al., 2007; SOUZA et al., 2016).

O cachorro do mato *C. thous* (figura 04) tem porte médio e pesa entre 4 e 7 kg. Possui a cabeça relativamente pequena e estreita, normalmente com a pelagem escura variando do cinza ao preto com as partes inferiores mais claras. Se alimenta de frutas, pequenos mamíferos, ovos, caranguejos e insetos (COURTENAY & MAFFEI, 2004).

Figura 4. Cachorro do mato *Cerdocyon thous*.

Disponível em: http://www.hudsongarcia.com

A espécie está distribuída em praticamente toda a América do Sul, ocorrendo em grande parte do Brasil, exceto na Amazônia, no Paraguai, ao Norte da Argentina, no Uruguai, na Bolívia a Leste dos Andes, ao Norte da Colômbia e na Venezuela, com alguns registros na Guiana e Suriname (COURTENAY & MAFFEI, 2004).

Figura 5. Distribuição geográfica do *Cerdocyon thous* (adaptado).

Mapa original disponível em: www.freepik.com

A raposa do campo *L. vetulus* (figura 06) é um animal magro, relativamente pequeno e pesa entre 2,5 e 4 kg. Possui focinho pontudo e orelhas grandes. A coloração da pelagem varia, tendo as regiões superiores cinza e as partes inferiores do amarelo ao castanho. O pescoço é branco, mas o lado inferior da mandíbula é quase preto assim como a base e a ponta da cauda. Também pode estar presente uma superfície escura no dorso. Se alimenta de pequenos mamíferos, aves, répteis e insetos (DALPONTE & COURTENAY, 2004).

Figura 6. Raposa do campo *Lycalopex vetulus*.

Disponível em: http://www.arkive.ogr

O *L. vetulus* é uma espécie endêmica do Brasil e sua ocorrência é principalmente no cerrado, mas pode ser encontrada em zonas de transição, como habitats abertos no Pantanal (DALPONTE, 2009). De acordo com Lemos et al. (2013), não há registros de ocorrência desse canídeo silvestre em países vizinhos. A região mais comum é a centro-sul do cerrado, mas devido a novos registros, sua distribuição tem sido ampliada para as regiões Norte e Nordeste do país (DALPONTE, 2009). Atualmente, há registros de ocorrência nas regiões Centro-Nordeste e Oeste do Estado de São Paulo, Centro-Oeste de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (em regiões não inundadas), Tocantins, Distrito Federal, Sudeste da Bahia, Sul de Rondônia, médio-Leste do Maranhão e ao Norte do Piauí (DALPONTE, 2003; 2009; COSTA & COURTENAY, 2003; DALPONTE & COURTENAY, 2008).

Mesmo com sua distribuição conhecida, existem lacunas em algumas regiões devido à falta de confirmação ou ausência de registros. Uma das regiões é a Nordeste, onde o cerrado é substituído pela caatinga. Muitos pesquisadores afirmam

ter registros da raposa do campo no Centro e Leste da caatinga, mas não há estudos que confirmem essa informação (LEMOS et al., 2013).

Figura 7. Distribuição geográfica do *Lycalopex vetulus* (adaptado).

Mapa original disponível em: www.freepik.com

Os estudos realizados por Carnieli, et al. (2008, 2009, 2013) concluíram que, mesmo com os programas de vacinação de animais domésticos, a linhagem genética do vírus da raiva associada a cães ainda está em circulação nas regiões Norte e Nordeste, e que uma outra linhagem está em circulação entre os canídeos silvestres. Nesses estudos filogenéticos, identificaram duas sub linhagens circulando em *C. thous* na mesma área geográfica, e devido a esse fato, tentam explicar como essas linhagens genéticas são dispersas tempo e regionalmente.

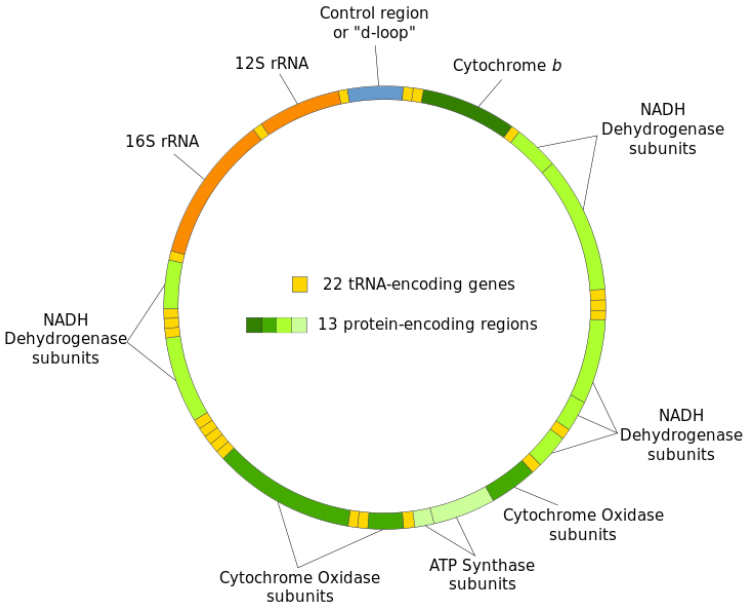
Mesmo que as espécies de *Lycalopex* não sejam relatadas como de ocorrência no Estado do Ceará, a espécie *L. vetulus* ocorre nesta região do Nordeste do país (QUEIROLO et al., 2012; BEISIEGEL et al., 2013; LEMOS et al., 2013) e durante estudos de epidemiologia da raiva neste Estado foram observadas visualmente diferenças morfológicas entre os canídeos, sugerindo que animais da espécie *L. vetulus* ocorram juntamente com os da espécie *C. thous.*

2.8 Identificação de espécies utilizando o DNA mitocondrial

A utilização do DNA mitocondrial (DNAmit) para identificação de diversas espécies animais é muito comum há algumas décadas (WILSON et al., 1985), tendo como foco o gene Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) devido a sua alta conservação genética (BROWN, 1985).

O DNAmit (figura 8) é uma molécula haploide de aproximadamente 16.500 pares de bases (pb), extra cromossomal, com herdabilidade uniparental materna, encontrada em grande número de cópias e 90% de sua totalidade é codificante. Essa região codificante apresenta 37 genes sendo, 13 polipeptídeos, 22 RNA transportadores (tRNA) e 2 subunidades ribossômicas (rRNA). A região que não codifica genes é denominada região controle ou *D-loop* (ANDERSON et al., 1981; ANDREWS et al., 1999; BLUTER. 2010).

Figura 8. Representação esquemática do DNA mitocondrial animal.



Disponível em: http://www.authorstream.com

Atualmente, uma sequência genética do DNAmit vem sendo empregada como um código de barras (*DNA barcode*) na identificação de espécies animais. O fragmento codificador do gene COI foi denominado como um marcador devido sua conservação entre as mais diferentes espécies (HEBERT et al., 2003). Os métodos clássicos de identificação de espécies são baseados em características morfológicas e dependem de um profissional em taxonomia que, em muitos casos, são especialistas em apenas um grupo de espécies (HOPKINS & FRECKLETON, 2002; JINBO et al., 2011). Os métodos moleculares não irão substituir os métodos clássicos, mas são capazes de auxiliar nessas identificações (PADIAL et al., 2010). Sabendo disso, o uso do *DNA barcode* pode ser um poderoso recurso para a identificação de espécies animais através do sequenciamento genético dessa região (MILLER, 2007).

O conhecimento em relação ao comportamento das espécies de animais silvestres envolvidas no ciclo epidemiológico da raiva e os estudos de caracterização de espécies de canídeos silvestres no Ceará bem como o papel desempenhado por estes animais na epidemiologia da região são de extrema importância para um melhor entendimento da doença. Assim sendo, esse estudo contribuirá para a melhoria na eficiência das ações destinadas aos programas de profilaxia da raiva,

facilitando as ações de conservação destas espécies, uma vez que em casos de epizootias de raiva em canídeos se faz comum à caça e o sacrifício destes animais pela população local.

3 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genética de espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado do Ceará e estudar sua correlação com a circulação do vírus da raiva.

3.1 Objetivos específicos

Realizar a caracterização molecular das espécies de canídeos silvestres de ocorrência no Estado do Ceará utilizando DNA mitocondrial.

Realizar a caracterização molecular das amostras positivas de canídeos silvestres para o vírus da raiva.

Analisar todas as sequências obtidas com relação às espécies de canídeos silvestres, linhagens virais circulantes e comparar os resultados por região do Estado do Ceará, das amostras positivas para raiva com os grupos filogenéticos apresentados.

Fornecer resultados que sirvam de suporte para melhor entendimento da epidemiologia da raiva em canídeos silvestres.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

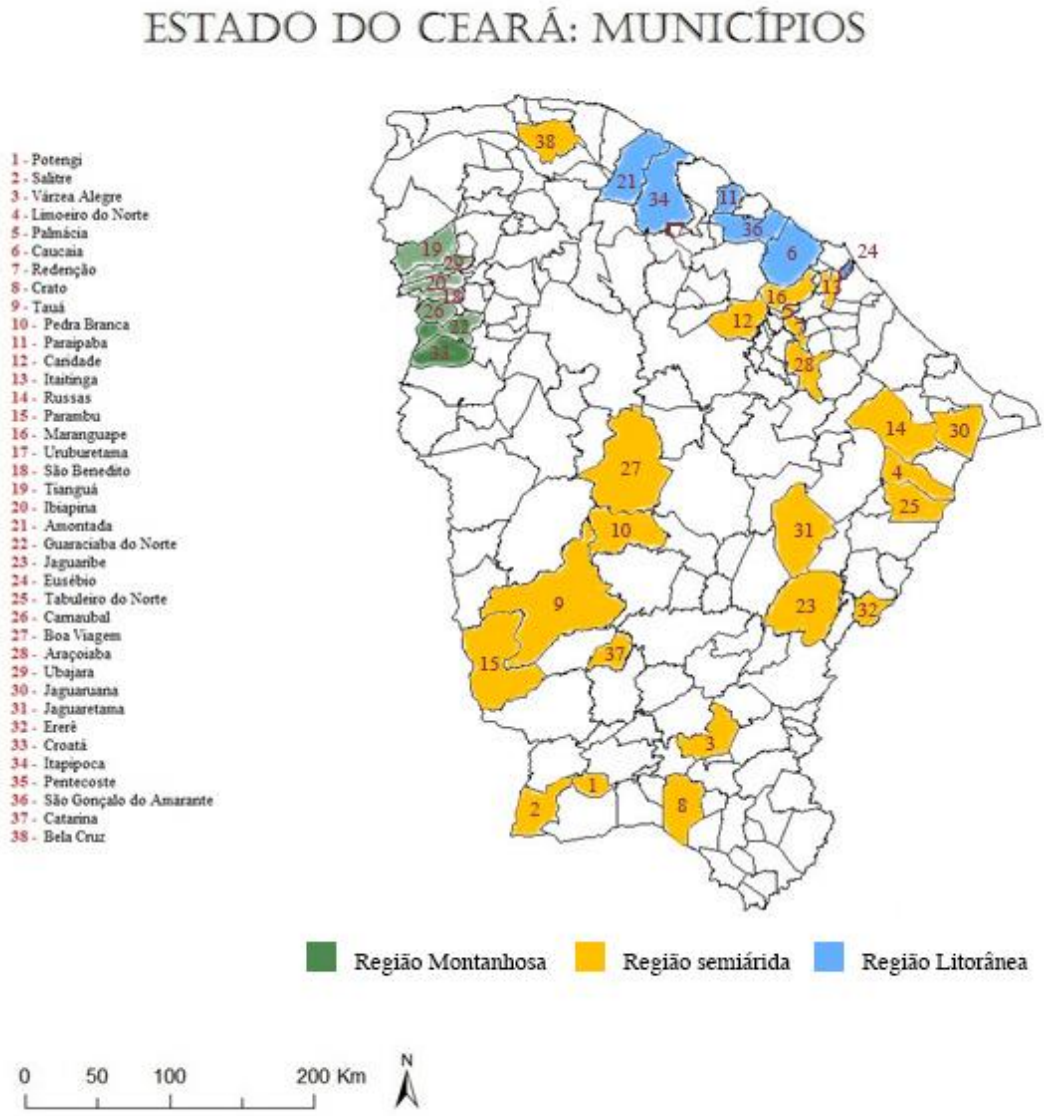
4.1 Área de estudo e amostras

As amostras de sistema nervoso central (SNC) dos canídeos silvestres foram provenientes de 38 municípios do Estado do Ceará (figuras 09 e 10), com registro de animais silvestres positivos para a raiva, coletadas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa FAPESP “Raiva em silvestres terrestres da região Nordeste do Brasil: epidemiologia molecular e detecção da resposta imune” (Processo 2014/16333-1) (69 amostras), e também, amostras de projetos anteriores em parceria com o Estado, mantidas no acervo do Núcleo de Pesquisas em Raiva do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (32 amostras), totalizando 101 amostras.

Figura 9. Mapa do Brasil evidenciando o Estado do Ceará (adaptado).

Mapa original disponível em: www.freepik.com

Figura 10. Mapa do Estado do Ceará evidenciando os municípios pertinentes às amostras (adaptado).



Mapa original disponível em: www.gpublicamunicipal.com.br

Todas as atividades foram realizadas com autorização e parceria do NUVET – Núcleo de Controle de Vetores da Coordenadoria de Promoção e Proteção à Saúde/ Secretaria de Estado de Saúde do Ceará e licença emitida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SisBio (45196-3).

As coletas de material foram realizadas em expedições específicas para o referido projeto e também durante as atividades rotineiramente realizadas pelo NUVET.

Animais encontrados mortos nestas localidades, encaminhados ou encontrados doentes com suspeita da enfermidade, após o período de observação em quarentena e que chegaram ao óbito, foram submetidos a procedimento de necropsia para obtenção de amostras do SNC e realização do diagnóstico da raiva por meio das técnicas de IFD e inoculação pelo LACEN Ceará. Alíquotas destas foram congeladas (-70^{0}C) e remetidas ao Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidas em freezer a temperatura de -70°C.

4.2 Extração do ácido nucleico total

Para a extração do ácido nucleico total, cada amostra de SNC foi submetida ao processo de maceração, utilizando aproximadamente 0,5 g do SNC e 1 mL de H_2O DEPEC em um microtubo de 1,5 mL, com movimentos mecânicos com auxílio de um pistilo e vórtex.

As amostras seguiram para o extrator NucliSESNS® EasyMag bioMerieux, uma plataforma automatizada para extração total de ácido nucleico, que tem capacidade para extrair de uma única vez 24 amostras num período de aproximadamente 40 minutos. Para realização da extração, 300 µL do macerado foram diluídos em 450 µL de tampão de lise (*lysis buffer*) e permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, foram acrescentados 30 µL de sílica magnética, que em elevadas concentrações de sal se liga aos ácidos nucleicos, e em seguida, iniciado o processo no equipamento. A sílica age como uma fase sólida e os componentes que não possuírem ácidos nucleicos serão retirados nas etapas de lavagem do processo. Ao final, todo ácido nucleico contido na amostra é eluído em um tampão denominado NucliSESNS® *Elution Buffer* bioMerieux.

Após o procedimento de extração, uma alíquota de cada amostra foi levada ao processo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação dos canídeos silvestres e, outra alíquota, encaminhada ao processo de Transcriptase Reversa (RT), seguido de PCR para diagnóstico da raiva e identificação da linhagem genética do vírus. As amostras foram armazenadas em freezer a temperatura de -70°C.

4.3 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Para a identificação dos canídeos silvestres foram utilizados os *primers* universais LCO 1490 e HCO 2198 (FOLMER et al., 1994), que são direcionados ao gene COI presente no DNAmit, e que amplificam um fragmento de aproximadamente 710 pb.

Os *primers* Seq Nucleopr F750 (CAMPOS et al., 2011), e P304 (SMITH et al., 1992), direcionados ao gene responsável pela decodificação da proteína N do vírus da raiva, amplificam um fragmento de 765 pb foram utilizados para a detecção do vírus.

Tabela 1. *Primer*, polaridade, sequência dos *primers* e localização no gene, utilizados para amplificação do DNA mitocondrial de canídeos silvestres e detecção do RNA do vírus da raiva.

Primer	**Polaridade**	**Sequência**	**Localização no Gene**
LCO 1490 COI (canídeos silvestes)	Positiva	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	1490 – 1515
HCO 2198 COI (canídeos silvestres)	Negativa	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	2198 – 2172
SeqNucleoPr F750 N (vírus da raiva)	Positiva	GGCACAGTWGTCACTGCT	749 – 766
P304 N (vírus da raiva)	Negativa	TTGACGAAGTCTTGTTCAT	1533 – 1514

Fonte: Crus, 2018.

4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Modificado de Carnieli et al., 2016, as reações foram realizadas utilizando-se 3,0 µL do DNA extraído adicionado a um “mix” contendo tampão de reação 10 mM tris-HCI, 50mM de KCI (PCR *buffer* 10X-Invitrogen®), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 µM de

cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP/Invitrogen®), 0,2 µM de cada *primer* (LCO 1490 e HCO 2198), 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e H_2O DEPEC® (Invitrogen®) para completar um volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador Genamp® PCR System 9700, Applied Biosystems com pré-aquecimento a 94°C por cinco minutos para desnaturação seguida de 35 ciclos com 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 55°C e 90 segundos de extensão a 72 °C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 1,5% em tampão TAE 0,5x (40mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,3 Invitrogen®) e 2 µL de brometo de etídio (Edt Br-Sigma). Um "mix" de 10 µL do produto de PCR e 3 µL de azul de bromofenol (*loading buffer*) para cada amostra, foi aplicada no gel de agarose e submetida a eletroforese em cuba horizontal, contendo tampão TAE 0,5x (Invitrogen®) durante 1 hora a 100 volts. A visualização do gel ocorreu em transiluminador de luz ultravioleta (UV) High Performance UV Transilluminator TFM-20V UPV. Os resultados foram comparados aos marcadores de peso molecular (100 pb Invitrogen®) e controles negativos e fotodocumentados no Benchtop UV Transilluminator M-20 V UPV. São consideradas positivas as amostras que apresentarem bandas na altura de pb esperada, identificadas pelo marcador de peso molecular quando observadas em luz UV.

Os produtos de PCR foram mantidos em freezer a temperatura de -20°C.

4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase e Transcriptase Reversa (RT-PCR)

A obtenção do DNA complementar (cDNA) do RNA extraído foi realizada com 8,0 µL do RNA extraído adicionados à um "mix" contendo 200 U de Transcriptase Reversa (RT) (MMLV – *Moloney-murine leukemia virus*/Super ScriptTM -Invitrogen®) diluídas em 8,0 µL de tampão da enzima (5X *first strand buffer* 50 mM de tris-HCl (pH-8,3), 4 mM de DTT, 1,2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP/Invitrogen®), 50 pmols de *primer* randômico, 10 U de Inibidor de Ribonuclease (RNAse Inhibitor – Invitrogen®), e H_2O DEPC® (Invitrogen®), em um volume final de 50 µL. A transcrição ocorreu em termobloco aquecido a 42 °C por 60 minutos.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 2,0 µL do cDNA extraído adicionado a um "mix" contendo tampão de reação 10mM tris-HCl, 50mM de KCl (PCR *buffer* 10X-Invitrogen®), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 µM de cada dNTP (dATP,

dGTP, dTTP, dCTP/Invitrogen®), 0,2 µM de cada *primer* (Seq NucleoPr F750 e P304), 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e H_2O DEPC® (Invitrogen®) para completar um volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador Genamp® PCR System 9700, Applied Biosystems com pré-aquecimento a 95°C por cinco minutos para desnaturação seguida de 35 ciclos com 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C e 90 segundos a 72 °C e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos (CAMPOS et al., 2011).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 1,5% em tampão TAE 0,5x (40mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,3 Invitrogen®) e 2 µL de brometo de etídio (Edt Br-Sigma). Uma mistura de 10 µL do produto de PCR e 3 µL de azul de bromofenol (*loading buffer*) para cada amostra, foi aplicada no gel de agarose e submetida a eletroforese em cuba horizontal, contendo tampão TAE 0,5x (Invitrogen®) durante 1 hora a 100 volts. A visualização do gel ocorreu em transiluminador de luz ultravioleta (UV) High Performance UV Transilluminator TFM-20V UPV. Os resultados foram comparados aos marcadores de peso molecular (100 pb Invitrogen®), o controle positivo, amostra brbovCE416_15 (sob laudo brusp035/16), o controle negativo e fotodocumentados no Benchtop UV Transilluminator M-20 V UPV. São consideradas positivas as amostras que apresentarem bandas na altura de pb esperada conforme o controle positivo, identificadas pelo marcador de peso molecular quando observadas em luz UV.

Os cDNAs e os produtos de PCR foram mantidos em freezer a temperatura de -20°C.

4.6 Sequenciamento genético

Após as amplificações, as amostras foram submetidas ao processo de purificação utilizando o sistema *ExoSAP-IT* (*GE Healthcare Bio-Sciences Ltd - USB Corporation*) segundo instruções do fabricante, e submetidas ao termociclador Genamp® PCR System 9700, Applied Biosystems a 37° C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram diluídas com H_2O DEPC® (Invitrogen®).

Em seguida, foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando o kit comercial *BigDye™ terminator – cycle sequencing read reaction - Applied*

Biosystems®, seguindo as instruções do fabricante utilizando os *primers* descritos na tabela 1.

Em um microtubo contendo 3,5 μL de produto de PCR purificado, foram adicionados 1,3 μL de Tampão *Save Money* 5X (Tris HCl 200 mM pH 9,0 e 5mM $MgCl_2$), 0,03 mM do *primer* (1 pmol) e 2 μL do kit *ABI PRISM Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (*Big Dye* v3.1 *Applied biosystems*®) completando um volume final de 10μL. O procedimento foi efetuado separadamente para cada um dos 4 *primers*.

A reação foi levada ao termociclador Genamp® PCR System 9700, Applied Biosystems pré-aquecido a 96°C por 5 minutos para desnaturação da fita de DNA, seguido de 35 ciclos, cada um deles composto de 10 segundos a 96°C para desnaturação do DNA molde, 45 segundos a 50°C para emparelhamento dos *primers* e 2 minutos a 60°C para extensão da nova fita de DNA.

Os produtos obtidos foram purificados por meio do sistema *Applied Biosystems Big Dye® X-Terminator™ Purification Kit* (*Applied Biosystems®*) visando a remoção de excesso de dideoxinucleotídeos "terminadores" presentes na reação. Uma mistura de 35µL do produto foram adicionados ao produto da reação de sequenciamento e agitados em "vórtex" por 30 minutos e em seguida centrifugados a 1000 rotações por minuto (rpm) por 02 minutos em centrífuga Sorvall RT7 Benchtop Centrifuge. Foram retirados 20µL do sobrenadante e adicionados a microplacas para a realização da eletroforese em polímero POP7 (*Applied Biosystems®*), utilizando sequenciador automático ABI-PRISM modelo 3130 (*Applied Biosystems®*). As amostras foram traqueadas automaticamente utilizando *software* do analisador automático de DNA *ABI Prism* modelo 3130XL.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas com o programa BioEdit v7.2.5 (1997-2013, *Tom Hall – Nucl. Acids Symp.*).

4.7 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas juntamente com sequências adquiridas do *GenBank*, pelo método ClustalW utilizando o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR et al., 2016). Os arquivos foram analisados, com o referido programa,

tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as sequências, calculadas par a par.

O *dataset* gerou a árvore de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) com o algoritmo "*Neighborn joining*" para verificar a sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas e foram realizadas análises de "*bootstrap"* com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985).

5 RESULTADOS

5.1 Área de estudos e amostras

Para realização deste estudo, foram analisadas um total de 101 amostras provenientes de canídeos silvestres de 38 municípios do Estado do Ceará, recebidas no Núcleo de Pesquisas em Raiva entre os anos de 2004 e 2016. Do total de amostras, 48,5% das amostras provinham da região montanhosa, 39,6% da região semiárida, 9,9% da região litorânea e 1,9% não tinham a procedência identificada. A identificação das amostras e os locais de procedências estão listados na tabela 2.

Tabela 2. Identificação e procedência das amostras de sistema nervoso central de canídeos silvestres do Estado do Ceará, Brasil, encaminhadas para diagnóstico do vírus da raiva e caracterização genética das espécies. São Paulo, Julho de 2018.

N.	Identificação	Procedência
1	CanSilvCE22_04	Potengi
2	CanSilvCE25_04	Salitre
3	CanSilvCE28_04	Várzea Alegre
4	CanSilvCE983_04	Limoeiro do Norte
5	CanSilvCE91_16	Limoeiro do Norte
6	CanSilvCE112_16	Limoeiro do Norte
7	CanSilvCE1091_04	Palmácia
8	CanSilvCE1092_04	Palmácia
9	CanSilvCE484_05	Palmácia
10	CanSilvCE145_05	Redenção
11	CanSilvCE187_05	Crato
12	CanSilvCE744_05	Tauá
13	CanSilvCE1104_05	Pedra Branca
14	CanSilvCE1155_05	Caridade
15	CanSilvCE72_06	Itaitinga
16	CanSilvCE685_06	Itaitinga

N.	Identificação	Procedência
17	CanSilvCE986_06	Itaitinga
18	CanSilvCE297_15	Itaitinga
19	CanSilvCE158_06	Russas
20	CanSilvCE496_06	Russas
21	CanSilvCE494_06	Parambu
22	CanSilvCE92_12	Maranguape
23	CanSilvCE112_12	Uruburetama
24	CaniSilvCE14_15	Jaguaribe
25	CanSilvCE270_15	Jaguaribe
26	CanSilvCE489_15	Jaguaribe
27	CanSilvCE302_15	Tabuleiro do Norte
28	CanSilvCE135_16	Tabuleiro do Norte
29	CanSilvCE377_16	Tabuleiro do Norte
30	CanSilvCE317_15	Boa Viagem
31	CanSilvCE138_16	Boa Viagem
32	CanSilvCE166_16	Boa Viagem
33	CanSilvCE347_15	Araçoiaba
34	CanSilvCE363_15	Jaguaruana
35	CanSilvCE240_16	Jaguaruana
36	CanSilvCE375_15	Jaguaretama
37	CanSilvCE277_16	Ererê
38	CanSilvCE317_16	Pentecoste
39	CanSilvCE388_16	Catarina
40	CanSilvCE276_13	Bela Cruz
41	CanSilvCE58_05	Caucaia
42	CanSilvCE394_15	Caucaia
43	CanSilvCE1106_05	Paraipaba
44	CanSilvCE329_13	Amontada
45	CanSilvCE302_16	Amontada
46	CanSilvCE303_16	Amontada
47	CanSilvCE285_15	Eusébio
48	CanSilvCE294_16	Itapipoca

N.	Identificação	Procedência
49	CanSilvCE397_16	Itapipoca
50	CanSilvCE374_16	S. G. do Amarante
51	CanSilvCE362_12	São Benedito
52	CanSilvCE56_13	São Benedito
53	CanSilvCE02_14	São Benedito
54	CanSilvCE356_15	São Benedito
55	CanSilvCE03_16	São Benedito
56	CanSilvCE47_16	São Benedito
57	CanSilvCE50_16	São Benedito
58	CanSilvCE79_16	São Benedito
59	CanSilvCE355_16	São Benedito
60	CanSilvCE23_13	Tianguá
61	CanSilvCE433_13	Tianguá
62	CanSilvCE454_15	Tianguá
63	CanSilvCE45_16	Tianguá
64	CanSilvCE124_16	Tianguá
65	CanSilvCE159_16	Tianguá
66	CanSilvCE214_16	Tianguá
67	CanSilvCE216_16	Tianguá
68	CanSilvCE228_16	Tianguá
69	CanSilvCE259_16	Tianguá
70	CanSilvCE286_16	Tianguá
71	CanSilvCE309_16	Tianguá
72	CanSilvCE347_16	Tianguá
73	CanSilvCE358_16	Tianguá
74	CanSilvCE401_16	Tianguá
75	CanSilvCE402_16	Tianguá
76	CanSilvCE403_16	Tianguá
77	CanSilvCE296_13	Ibiapina
78	CanSilvCE308_16	Ibiapina
79	CanSilvCE348_16	Ibiapina
80	CanSilvCE352_16	Ibiapina

N.	Identificação	Procedência
81	CanSilvCE400_16	Ibiapina
82	CanSilvCE478_13	Guaraciaba do Norte
83	CanSilvCE277_15	Guaraciaba do Norte
84	CanSilvCE314_15	Guaraciaba do Norte
85	CanSilvCE46_16	Guaraciaba do Norte
86	CanSilvCE118_16	Guaraciaba do Norte
87	CanSilvCE284_16	Guaraciaba do Norte
88	CanSilvCE285_16	Guaraciaba do Norte
89	CanSilvCE310_15	Carnaubal
90	CanSilvCE377_15	Carnaubal
91	CanSilvCE215_16	Carnaubal
92	CanSilvCE287_16	Carnaubal
93	CanSilvCE288_16	Carnaubal
94	CanSilvCE311_16	Carnaubal
95	CanSilvCE346_16	Carnaubal
96	CanSilvCE353_15	Ubajara
97	CanSilvCE413_16	Ubajara
98	CanSilvCE283_16	Croatá
99	CanSilvCE405_16	Croatá
100	CanSilvCE38_06	Não Identificado
101	CanSilvCE981_06	Não Identificado

Amostras em vermelho representam as amostras positivas para o vírus da raiva. Amostras em preto representam as amostras negativas para o vírus da raiva.

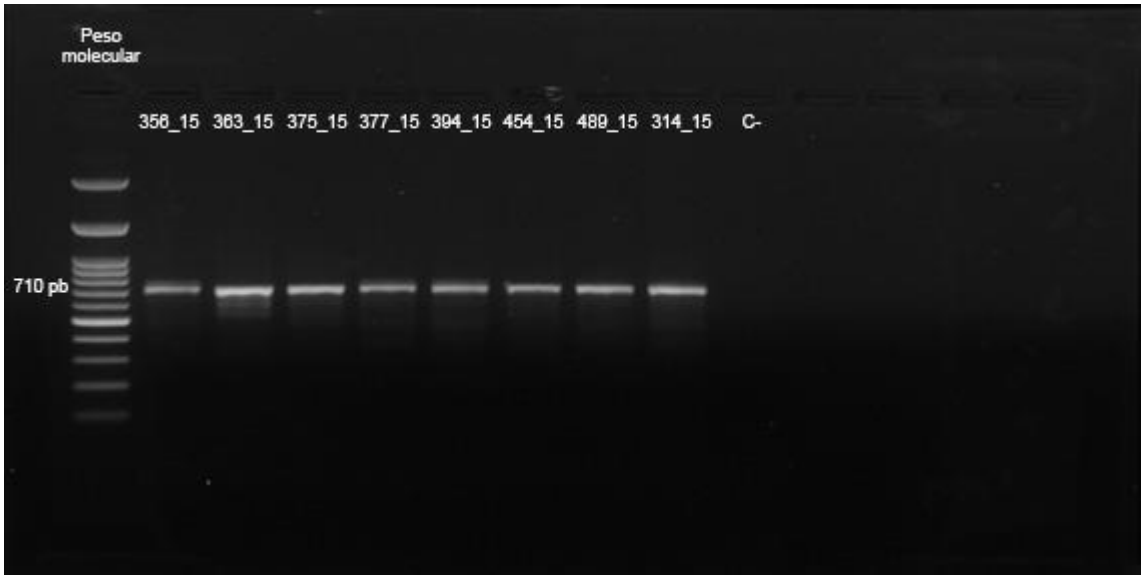
Procedências em laranja representam municípios da região semiárida. Procedências em azul representam municípios da região litorânea. Procedências em verde representam municípios da região montanhosa.

Fonte: Crus, 2018.

5.2 Análises filogenéticas dos canídeos silvestres

As 101 amostras provenientes de canídeos silvestres do Estado do Ceará foram analisadas e apresentaram, após amplificação por PCR e análise em eletroforese em gel de agarose, banda representativa do fragmento de 710 pb referentes ao COI (*primers* LCO 1490+HCO 2198), como ilustrado na figura 11.

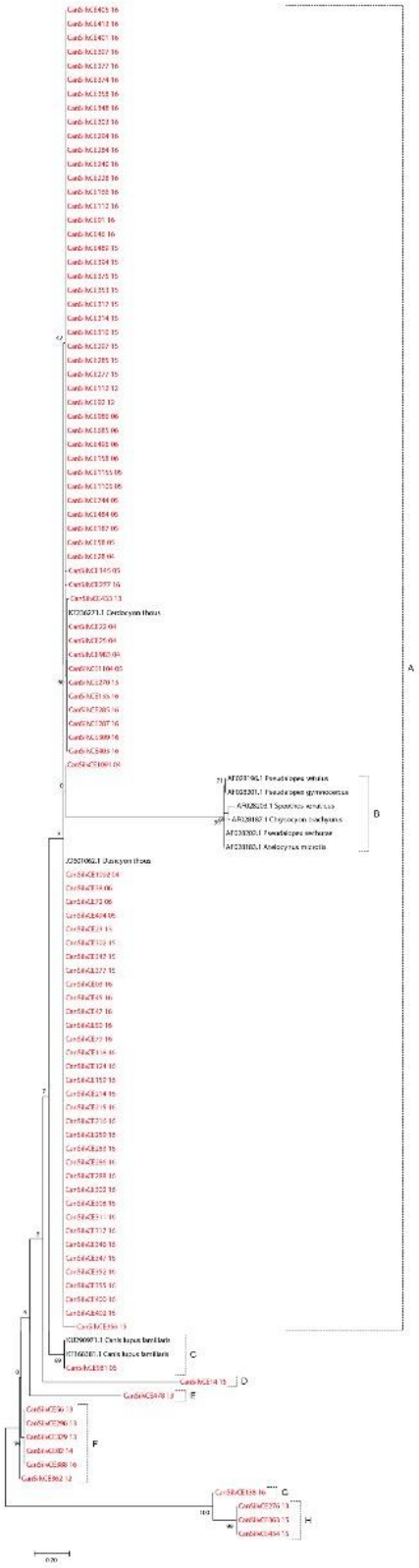
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para o Citocromo C Oxidase I (COI).



O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1. Nas demais canaletas, seguindo a ordem da esquerda para a direita, estão as amostras CanSilvCE356_15, CanSilv363_15, CanSilv375_15, CanSilv377_15, CanSilv394_15, CanSilvCE454_15, CanSilvCE489_15 e CanSilvCE314_15 apresentando banda representativa do fragmento de aproximadamente 710 pb e, controle negativo, ilustrando a amplificação do fragmento na etapa de PCR.

Todas as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento para formar a reconstrução filogenética (figura 12). As sequências obtidas foram alinhadas com outras sequências de COI disponíveis no *GenBank* e foram analisados 389 pb.

Figura 12. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) construída pelo programa MEGA 7.0, para o Citocromo C Oxidase I (COI).



Em vermelho estão representadas as amostras de canídeos silvestres do estado do Ceará, Brasil. Grupo A, representado pelas amostras de *Cerdocyon thous*. Grupo B, representado pelas amostras do gênero *Lycalopex*. Grupo C, representado pelas amostras de cães domésticos *Canis lupus familiaris*. Grupos D, E, F, G e H representados por amostras deste trabalho que ficaram isoladas.

Na árvore filogenética obtida (figura 12), observam-se as amostras distribuídas em sete grupos:

Grupo A: amostras relacionadas à espécie *Cerdocyon thous*, principal espécie de canídeo silvestre circulante no Estado do Ceará, antigamente denominada como *Dusicyon thous*.

Grupo B: amostras relacionadas às espécies do gênero *Lycalopex*, antigamente denominado *Pseudalopex* e *Dusicyon*, *Speothos*, *Chrysocyon* e *Atelocynus*, demais canídeos do Brasil.

Grupo C: amostras relacionadas às espécies de cães domésticos *Canis lupus familiaris*.

Grupo D: Amostra pertencente a esse trabalho que ficou isolada.

Grupo E: Amostra pertencente a esse trabalho que ficou isolada.

Grupo F: Amostras pertencentes a esse trabalho que se agruparam isoladas das demais.

Grupo G: Amostra pertencente a esse trabalho que ficou isolada.

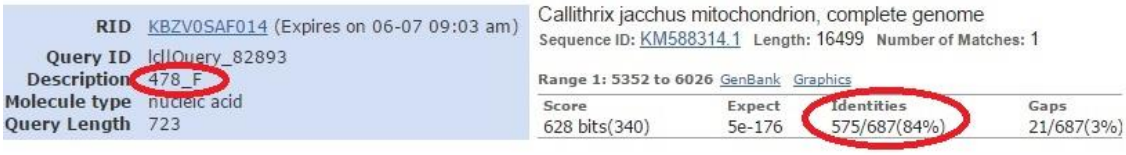
Grupo H: Amostras pertencentes a esse trabalho que se agruparam isoladas das demais.

Observamos que a amostra CanSilvCE981_06 segregou com as amostras de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e, 88 amostras de canídeos silvestres segregaram com as amostras de *Cerdocyon thous*.

Doze amostras não segregaram com canídeos silvestres, são elas CanSilvCE14_15 (grupo D), CanSilvCE478_13 (grupo E), CanSilvCE56_13, CanSilvCE296_13, CanSilvCE329_13, CanSilvCE02_14, CanSilvCE388_16, CanSilvCE362_12 (grupo F), CanSilvCE138_16 (grupo G) e CanSilvCE276_13, CanSilvCE363_15, CanSilvCE454_15 (grupo H), que ficaram isoladas das demais amostras desse trabalho.

Devido a esse resultado, analisamos as sequências dessas amostras a partir do BLAST junto ao banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Foi obtido 84% de similaridade com a espécie sagui do tufo branco *Callithrix jacchus*, para a amostra CanSilvCE478_13 (figura 13). Para a amostra CanSilvCE138_16 (figura 14), foi obtido 97% de similaridade com a espécie de mosca *Lucilia eximia*. Para as demais amostras (figura 15), foram obtidos entre 89 e 99% de similaridade com a espécie de camundongo *Mus musculus*.

Figura 13. Resultado da análise no sistema BLAST da amostra CanSilvCE478_13 com o banco de dados do NCBI.



A amostra apresentou similaridade superior a 80% com as amostras de saguis da espécie *Callithrix jacchus*. Em evidência está o número da amostra e a porcentagem de similaridade.

Figura 14. Resultado da análise no sistema BLAST da amostra CanSilvCE138_16 com o banco de dados do NCBI.

A amostra apresentou similaridade superior a 80% com as amostras de saguis da espécie *Lucilia eximia*. Em evidência está o número da amostra e a porcentagem de similaridade.

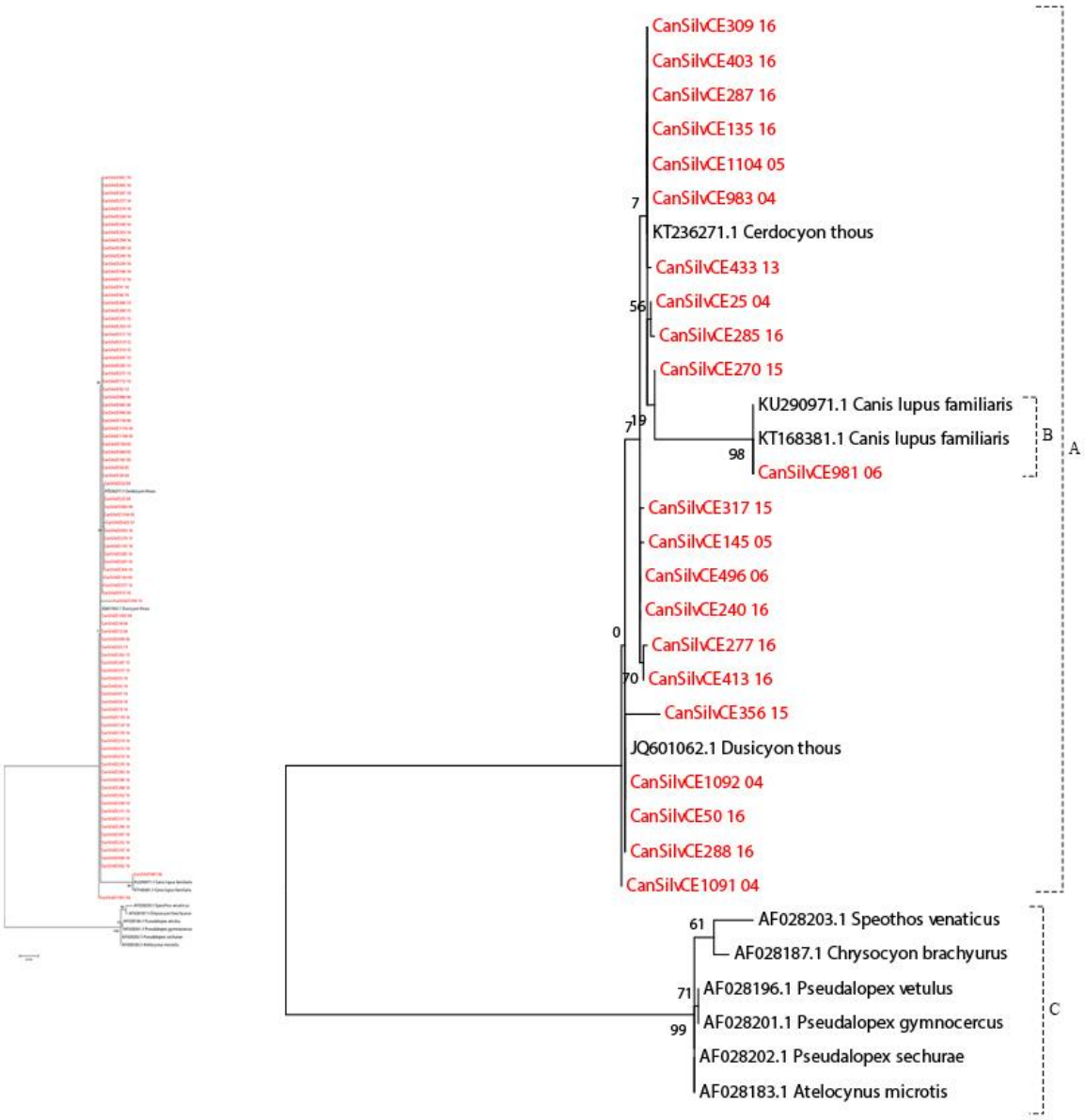
Figura 15. Resultado das análises no sistema BLAST das amostras CanSilvCE362_12, CanSilvCE56_13, CanSilvCE276_13, CanSilvCE296_13, CanSilvCE329_13, CanSilvCE02_14, CanSilvCE14_15, CanSilvCE363_15, CanSilvCE454_15 e CanSilvCE388_16 com o banco de dados do NCBI.

Todas as amostras apresentaram similaridade superior a 95% com as amostras de camundongos da espécie *Mus musculus*. Em evidência estão os números das amostras e a porcentagem de similaridade.

Imagens originais disponíveis em: www.blast.ncbi.nlm.nih.gov

Quando excluídas as amostras de sagui, mosca e camundongos, a árvore filogenética para caracterização dos canídeos silvestres com as demais 89 amostras apresentou algumas mudanças, conforme a figura 16.

Figura 16. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (maximum likelihood) contruída pelo programa MEGA 7.0, para o Citocromo C Oxidase I (COI).



Em vermelho estão representadas as amostras de canídeos silvestres do estado do Ceará, Brasil. Grupo A, representado pelas amostras de *Cerdocyon thous*. Grupo B, representado pelas amostras de cães domésticos *Canis lupus familiaris*. Grupo C, representado pelas amostras do gênero *Lycalopex*. As 21 amostras contidas na reconstrução filogenética em evidência, que segregaram com as amostras de canídeos silvestres da espécie *Cerdocyon thous* representam as 88 amostras utilizadas nesse estudo e que, também segregaram no mesmo grupo conforme a imagem minimizada ao lado esquerdo.

A árvore filogenética obtida (figura 16) apresentou três grupos:

Grupo A: amostras relacionadas à espécie *Cerdocyon thous*, principal espécie de canídeo silvestre circulante no Estado do Ceará, antigamente denominada como *Dusicyon thous*.

Grupo B: amostras relacionadas às espécies de cães domésticos *Canis lupus familiaris*.

Grupo C: amostras relacionadas às espécies do gênero *Lycalopex*, antigamente denominado *Pseudalopex* e *Dusicyon*, *Speothos*, *Chrysocyon* e *Atelocynus*, demais gêneros de canídeos do Brasil.

Com exceção da amostra CanSilvCE981_06, que segregou com as amostras de cães domésticos, as demais amostras de canídeos silvestres do Estado do Ceará segregaram com as amostras de *Cerdocyon thous*.

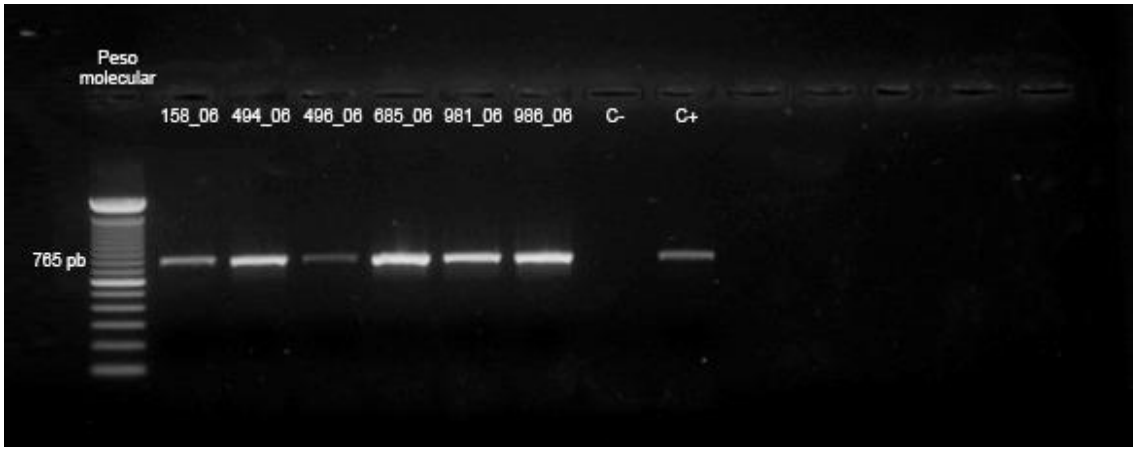
A distância genética intragrupo dos canídeos silvestres é de 0,9%, sugerindo que são a mesma espécie.

Observando a distribuição das amostras de canídeos deste estudo no mapa do Estado do Ceará, é claramente visível uma maior concentração de exemplares na região montanhosa do Estado, seguida da região semiárida, e uma menor concentração região litorânea.

5.3 Análises filogenéticas do vírus da raiva

Nas análises das 101 amostras provenientes de canídeos silvestres do Estado do Ceará para o vírus da raiva, 50 apresentaram, após amplificação por PCR e análise em eletroforese em gel de agarose, banda representativa do fragmento de 765 pb referentes a proteína N do vírus (*primers* Seq NucleoPr F750+P304), como ilustrado na figura 17.

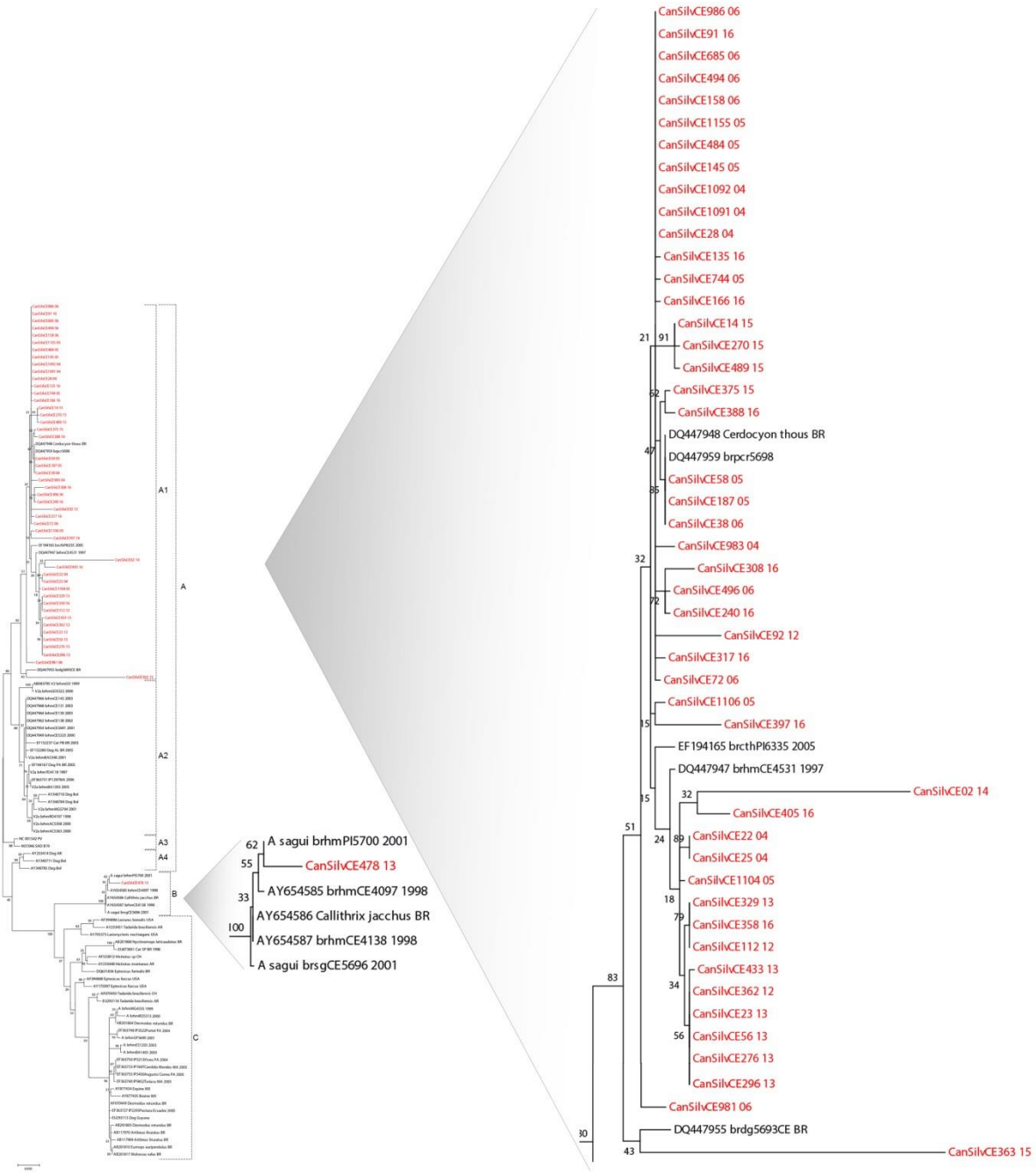
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para a nucleoproteína do vírus da raiva.



O marcador de peso molecular aparece na canaleta 1. Nas demais canaletas, seguindo a ordem da esquerda para a direita, estão as amostras CanSilvCE158_06, CanSilv494_06, CanSilv496_06, CanSilv685_06, CanSilvCE981_06, CanSilvCE986_06, controle negativo e controle positivo (amostra brbovCE416_15 previamente caracterizado) apresentando banda representativa do fragmento de aproximadamente 765 pb, ilustrando a amplificação do fragmento na etapa de PCR.

Todas as amostras positivas foram submetidas à reação de sequenciamento e 48 amostras foram utilizadas para a reconstrução filogenética. As sequências obtidas foram alinhadas com outras sequências da proteína N do vírus da raiva disponíveis no *GenBank* e foram analisados 385 pb. A reconstrução filogenética está ilustrada na figura 18.

Figura 18. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) construída pelo programa MEGA 7.0, para a nucleoproteína do vírus da raiva.



Em vermelho estão representadas as amostras de canídeos silvestres do estado do Ceará, Brasil. Grupo A, representado pelas linhagens genéticas virais mantidas por canídeos domésticos e silvestres.

Grupo A1, representado pelas amostras da linhagem genética do vírus da raiva mantida por canídeos silvestres. Grupo A2, representado pelas amostras da linhagem genética do vírus da raiva mantidos por cães domésticos. Grupo A3, representado pelas amostras de vírus da raiva padrão (AgV1). Grupo A4, representado pelas amostras da linhagem genética mantida por cães de outros países da América Latina (AgV1). Grupo B, representado pela linhagem genética do vírus da raiva mantido por saguis. Grupo C, representado pelas linhagens genéticas do vírus da raiva mantidas por morcegos.

A árvore filogenética obtida (figura 18) apresentou três grupos:

Grupo A: amostras relacionadas à linhagem genética mantida por canídeos domésticos e silvestres. Este grupo é formado por quatro subgrupos:

A1: linhagem genética mantida por canídeos silvestres (principalmente da espécie *Cerdocyon thous*), identificada inicialmente no Estado do Ceará e até o momento restrita a região Nordeste do Brasil.

A2: linhagem genética mantida por cães domésticos (AgV2), amplamente distribuída pela América Latina.

A3: amostras do vírus da raiva padrão (AgV1).

A4: linhagem genética mantida por cães domésticos isolada no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (AgV1).

Grupo B: amostras relacionadas à linhagem genética mantida por saguis-de-tufo branco isolada inicialmente no Estado do Ceará e até o momento restrita a região Nordeste do Brasil.

Grupo C: amostras relacionadas a linhagens genéticas mantidas por morcegos (hematófagos e não hematófagos) isoladas nas Américas.

Observa-se que todas as amostras de canídeos silvestres e a amostra CanSilvCE981_06, que segregou com cão doméstico na identificação das espécies utilizando o DNAmit, positivas para o vírus da raiva, segregaram no subgrupo A1, com a linhagem genética do vírus da raiva que acomete os canídeos silvestres do Estado do Ceará. As amostras previamente identificadas como camundongos também segregaram com as amostras do subgrupo A1.

A amostra CanSilvCE478_13 segregou no grupo B juntamente com as demais amostras correspondentes à linhagem genética do vírus da raiva mantida em saguis da espécie *Callithrix jacchus*, linhagem que está, até o momento, restrita ao Nordeste do Brasil.

A distância genética do vírus entre as amostras de canídeos silvestres e de cães domésticos é de 10,9 %. A distância genética do vírus intragrupo dos canídeos silvestres é de 4,6%.

Dos 38 municípios do Estado do Ceará que fizeram parte desse estudo, apenas 6 municípios não apresentaram positividade para o vírus da raiva.

6 DISCUSSÃO

Diferentemente das regiões da Ásia e África, houve uma considerada diminuição nos casos de raiva humana e animal nos países da América Latina devido à implementação dos programas governamentais de vigilância e controle da raiva, bem como a vacinação em massa dos animais domésticos (WHO, 2018). No Brasil, houve uma queda nos casos de raiva canina e dessa forma foi possível observar de forma mais evidente a ocorrência dos casos de raiva em animais silvestres, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (CARNIELI et al., 2008, 2013; FAVORETTO et al., 2013). De acordo com Favoretto et al. (2006), a distribuição sobreposta de cães e canídeos silvestres complicou a situação epidemiológica da raiva no Estado do Ceará. Com o desmatamento cada vez mais comum e o aumento das áreas urbanas, espécies como *C. thous*, que possuem hábitos sinantrópicos, são facilmente vistas interagindo com animais domésticos e seres humanos, o que aumenta consideravelmente os riscos de transmissão da raiva (HALPIN et al., 2007; SOUZA et al., 2016). Os canídeos silvestres são um dos principais hospedeiros e reservatórios do vírus da raiva e responsáveis pela manutenção dos ciclos de transmissão da doença. Carnieli et al. (2006), a partir de seus estudos sobre a epidemiologia da raiva em canídeos no Nordeste do Brasil, identificou duas linhagens genéticas virais nesses animais, uma linhagem mantida e transmitida por canídeos domésticos e a outra por canídeos silvestres. Estudos filogenéticos sugerem que a linhagem viral mantida pelos cães foi introduzida nos canídeos silvestres devido à interação dessas espécies, o que consequentemente levou a um ciclo emergente e independente da doença (FAVORETTO et al., 2006).

Wilson e Reeder (1993) estudaram a ecologia e zoologia de algumas espécies de canídeos silvestres e sugeriram que, das seis espécies de canídeos silvestres circulantes no Brasil, o *C. thous* é a principal espécie de canídeo silvestre hospedeira do vírus da raiva no Nordeste brasileiro seguida da espécie *L. vetulus*. Por serem morfologicamente similares e por possuírem uma distribuição geográfica sobreposta, podem ocorrer erros de identificação dessas duas espécies de canídeos silvestres. Dessa forma, a identificação genética por meio de análises do DNAmit pode ser capaz de auxiliar os estudos da distribuição populacional dessas espécies assim como, auxiliar no conhecimento da epidemiologia da raiva. Bubadué et al. (2016), viram em seus estudos que, teoricamente, o Cerrado pode comportar a

sobrevivência dessas duas espécies de canídeos silvestres (*Cerdocyon* e *Lycalopex*) no mesmo nicho ecológico.

Carnieli et al. (2008), estudaram a epidemiologia da raiva e identificaram os principais canídeos silvestres hospedeiros e transmissores da raiva no Nordeste do Brasil, com exceção do estado do Ceará, através de análises do DNAmit desses animais. Concluíram que, 93% das amostras pertenciam à espécie *C. thous* e, os outros 7% pertenciam à espécie *L. vetulus.*

O objetivo do presente estudo foi identificar a principal espécie de canídeo silvestre circulante no Estado do Ceará, analisando 389 nucleotídeos do DNAmit extraído das amostras recebidas e, a positividade quanto ao vírus da raiva, para contribuir com dados que possam auxiliar em estudos epidemiológicos da enfermidade nessa região do Nordeste brasileiro.

Foi realizada uma adaptação do protocolo de caracterização genética a partir do DNAmit de Carnieli et al. (2016), e o mesmo mostrou-se eficiente para amplificação do fragmento do gene e para a obtenção da sequência genética.

Todas as amostras de canídeos silvestres provenientes do estado do Ceará utilizadas nesse estudo, positivas ou negativas para o vírus da raiva, foram submetidas à identificação da espécie animal e, após sequenciamento e análises das sequências geradas para as 89 amostras, todas segregaram com as amostras de *C. thous* publicadas no *GenBank* e, não houve identificação de amostras como sendo da espécie *L. vetulus*. Esses resultados concordam com trabalhos já publicados por especialistas da área (TCHAICKA et al., 2007), onde é comumente encontrada apenas a espécie *C. thous* nesse Estado do Brasil, mesmo que haja relatos da circulação de *L. vetulus* nas zonas de transição, não há dados que confirmem essa hipótese.

Estes resultados corroboram com o fato de *C. thous*, espécie nativa do Nordeste brasileiro, ser a principal espécie de canídeo silvestre transmissora da enfermidade na região e que está amplamente presente no Estado (CARNIELI et al., 2006). De acordo com dados oficiais da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, mais de 170 casos de raiva foram relatados em *C. thous* no Ceará entre os anos de 1990 e 2003 (NUEND, 2004).

A partir da árvore filogenética gerada, observamos alguns grupos filogenéticos e analisamos a distribuição desses animais pelo Estado para verificar se há alguma relação com os grupamentos gerados. Observamos que a maior concentração

desses canídeos se dá na região montanhosa do Estado e que não há relação entre a distribuição e os grupos apresentados na árvore filogenética. A maior parte das amostras de canídeos silvestres provém da região Noroeste do Estado, embora haja uma ampla distribuição pelo Estado do Ceará.

Em relação às amostras identificadas como não pertencentes às espécies de canídeos silvestres, após as análises, os resultados sugerem que houve a troca de uma amostra identificada como sendo de sagui ao invés de canídeo silvestre. Desta amostra foi isolada a variante genética do vírus da raiva mantida por populações de saguis. Houve ainda a amplificação do material genético de uma mosca, que provavelmente estava na amostra de canídeo. Embora tenham sido solicitadas amostras originais de canídeos silvestres para a caracterização genética, algumas amostras eram de exemplares da primeira passagem em camundongos após o diagnóstico da raiva através da técnica de inoculação em camundongos. Consequentemente, essas amostras foram excluídas deste estudo de identificação da espécie animal.

Uma importante ferramenta que pode auxiliar na vigilância de animais envolvidos em ciclos de transmissão de doenças, inclusive animais envolvidos nos ciclos de transmissão da raiva é a caracterização genética a partir do DNAmit. Com a escassez de profissionais no segmento da taxonomia cada vez maior, a utilização do DNAmit para identificar espécies representa uma importante ferramenta para responder a questões relacionadas à taxonomia. Klippel et al. (2015) utilizou essa ferramenta para identificar animais mortos em uma rodovia no Estado do Espírito Santo. Muitas vezes, os animais são encontrados desfigurados e as análises das sequências de DNAmit obtidas tiveram sucesso na identificação destes. Ainda é considerado um método complementar, mas muitos pesquisadores, que estudam os principais hospedeiros do vírus da raiva, tem utilizado essa técnica para concluírem suas análises (KLIPPEL et al., 2015).

Quanto à positividade ao vírus da raiva, das 101 amostras recebidas e analisadas para esse estudo, 50 (cerca de 49,5%) foram positivas. Esses dados mostram a importância desses animais na manutenção do vírus da raiva. Favoretto et al. (2013) consideram os canídeos silvestres um importante responsável pela manutenção do ciclo silvestre da raiva no Brasil. A maior parte das amostras recebidas e positivas para o vírus da raiva são provenientes da região montanhosa do Estado, o que concorda com os dados observados por Cordeiro et al. (2016) em

seu trabalho, onde a maior parte das amostras positivas para a raiva eram de municípios de alta altitude.

Observando a distribuição das amostras positivas no mapa do Estado do Ceará, é possível ver uma distribuição relativamente homogênea entre as regiões. Levando em consideração que a região semiárida apresentava menos exemplares de amostras em relações a região montanhosa e que a positividade está amplamente distribuída na região semiárida, podemos considerar que essa a região com maior número de canídeos silvestres com raiva no Estado do Ceará, levando em consideração que é o bioma predominante do Estado. Dos 38 municípios que fizeram parte da área de estudo deste trabalho, apenas 6 não apresentaram amostras positivas para a raiva. Esses dados sugerem uma grande distribuição da raiva no Estado, o que é um grave problema de saúde pública, pois devido aos hábitos dos animais envolvidos nos ciclos da doença, a interação com os seres humanos contribui para o aumento dos casos de tratamentos pós-exposição dos humanos a esses animais, como também, contribuindo para um possível aumento dos casos de raiva humana. No trabalho de Cordeiro et al. (2016), foram apresentados dados sobre a raiva em animais silvestres entre os anos de 2003 e 2013 no Estado do Ceará. Em relação aos canídeos silvestres, de um total de 317 amostras, 105 apresentaram positividade para o vírus da raiva. Em relação aos demais animais silvestres, em um total de 332 amostras, 66 amostras foram positivas.

Na árvore filogenética gerada para o vírus da raiva, podemos observar dois subgrupos para os canídeos do Brasil, um para os canídeos silvestres e outro para os canídeos domésticos. Com exceção da amostra de sagui, indevidamente encaminhada para o estudo, que segregou com as demais amostras da variante do vírus da raiva que acomete populações de saguis da região Nordeste do Brasil, todas as amostras pertencentes a esse estudo segregaram com as demais amostras da linhagem genética do vírus mantida por canídeos silvestres e que, até o momento, está restrita a essa região do Brasil. A amostra identificada como pertencente à espécie de canídeo doméstico (*Canis lupus familiaris*), coletada no ano de 2006, também indevidamente encaminhada para este estudo, apresentou positividade para o vírus da raiva e segregou com as demais amostras pertencentes à linhagem genética mantida pelos canídeos silvestres, demonstrando transmissão interespécie. Esses dados sugerem que, devido à interação entre os animais

domésticos e silvestres, a transmissão do vírus entre essas diferentes espécies pode acontecer, bem como a transmissão da linhagem genética mantida por canídeos silvestres para canídeos domésticos, mostrando a relação entre essas duas espécies.

Ao contrário do observado por Carnieli et al. (2008), em relação às duas sub linhagens virais circulantes entre os canídeos silvestres na região Nordeste do Brasil, no presente estudo verificou-se apenas uma linhagem viral circulando entre os canídeos silvestres do Estado do Ceará e a manutenção da transmissão da variante viral mantida por canídeos silvestres já descritas na região (CARNIELI et al., 2008; FAVORETTO et al. 2001; 2006). Os resultados obtidos, assim como os de Carnieli et al. (2009), não permitem estabelecer uma única espécie de canídeo responsável pela manutenção da raiva na região estudada.

A identificação das espécies animais envolvidas nos ciclos de transmissão da doença e as linhagens genéticas virais mantidas por estas, contribuem para um melhor desenvolvimento dos programas de vigilância e saúde no Brasil. Os dados do presente estudo buscam auxiliar no entendimento do ciclo da raiva nos canídeos silvestres, em relação à principal espécie animal envolvida e a linhagem genética viral que está em circulação no Estado.

Assim, são necessários estudos mais aprofundados acerca das linhagens virais circulantes para um melhor entendimento desse ciclo e o papel destes canídeos como reservatórios e transmissores. Desta maneira, os programas de vigilância da raiva podem se servir de dados mais robustos tornando-se efetivamente eficazes para o controle da raiva silvestre, que atualmente é o principal problema da doença no Brasil. Estudos dessa natureza buscam o conhecimento para uma melhor conservação das espécies envolvidas e o possível desenvolvimento de vacinas destinadas à imunização de populações de animais silvestres, visando à qualidade de vida tanto dos seres humanos, que estão em constante contato com esses animais, quanto à saúde dos canídeos silvestres e domésticos.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo buscamos identificar espécies de canídeos silvestres que provavelmente atuam como reservatórios e transmissores da raiva no Estado do Ceará, assim como a sua correlação com o vírus da raiva. Concluímos que:

- Para a caracterização molecular a partir do DNAmit das amostras de canídeos silvestres provenientes de diferentes municípios do Estado do Ceará, a modificação de um protocolo já utilizado em outros trabalhos mostrou-se eficiente. Observamos que, predominantemente, as amostras apresentaram alta similaridade genética com amostras pertencentes à espécie *Cerdocyon thous*, e que uma amostra apresentou alta similaridade genética com amostras de canídeos domésticos da espécie *Canis lupus familiaris*.
- A linhagem genética do vírus que está circulando é a linhagem mantida e transmitida por canídeos silvestres da região Nordeste do Brasil. A alta positividade dessas amostras sugere que a espécie *Cerdocyon thous* é de extrema importância na manutenção desse ciclo. Apenas a linhagem genética mantida por canídeos silvestres foi observada nesse trabalho, sugerindo que apenas esta linhagem esteja em circulação entre os canídeos dessa região do Brasil. A transmissão de linhagens genéticas virais entre diferentes espécies de canídeos pode ocorrer, como observado com a amostra identificada como canídeo doméstico, acometida pela linhagem viral que acomete e é transmitida pelos canídeos silvestres.
- Não observamos correlações entre os grupos filogenéticos gerados na árvore de identificação dos canídeos silvestres e os grupos filogenéticos gerados na árvore de identificação viral com as regiões do Estado a qual essas amostras pertenciam. Podemos apenas concluir que o Estado do Ceará possui um alto índice de animais acometidos por essa linhagem do vírus da raiva.
- Concluímos que, a identificação de espécies de canídeos silvestres no Estado do Ceará e o conhecimento da situação epidemiológica da raiva nesses animais podem auxiliar e servir de suporte para trabalhos futuros, bem como para os programas de vigilância da raiva silvestre no Brasil.

REFERÊNCIAS

ALBAS, A.; CAMPOS, A. C. A.; ARAUJO, D. B.; RODRIGUES, C. S.; SODRE, M. M.; DURIGON, E. L.; FAVORETTO, S. R. Molecular characterization of rabies virus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 44, n. 6, p. 678-683, 2011.

ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; de BRUIJN, M. H. L.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, 290: 457-465, 1981.

ANDREWS, R. M.; KUBACKA, I.; CHINNERY, P. F.; LIGHTOWLERS, R. N.; TURNBULL, D. M; HOWELL, N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, 1999.

ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A. D. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrghyzstan. **Emerg Infect Dis**, 9(3):333-7, 2003

ARAUJO, D. B.; LANGONI H.; ALMEIDA, M. F.; MEGID, J. Heminested reverse-trancriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored an decomposed samples. **BMC Res. Notes**, v. 1, p. 17, 2008.

BAER, G. M. **The natural history of Rabies.** 2ed. Boca Raton: CRC Press. Florida, 1991. 389p.

BEISIEGEL, B.M.; LEMOS, F.G.; AZEVEDO, F.C.; QUEIROLO, D.; JORGE, R. S. P. Avaliação do risco de extinção do cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. **Avaliação do estado de conservação de carnívoros.** 2013. Disponível em: <www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/.../287> Acesso em 16 Nov. 2015

BERTA, A. Origin, diversification and zoogeography of th South American canids. In: **Fiel Zool**, 39:455-471, 1987.

BELOTTO, A.; LEANES, L. F.; SCHNEIDER, M. C.; TAMAYO, H.; CORREA, E. Overview of rabies in the Americas. **Virus Res**, 111: 5-12, 2005.

BLUTER, J. M. Mitichrondrial DNA analysis. In: **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. 2 ed. Elsevier, 10: 376-389, 2010.

BOULGER, L. R.; PORTERFIELD, J. S. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 52(5): 421-4, 1958.

BOURHY, H.; KISSI, B.; LAFON, M.; SACRAMENTO, D.; TORDO, N. Antigenetic and molecular characterization of bats rabies virus in Europe. **J Clin. Microbiol**, 30(9): 2419-2426, 1992.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. **Virology**, 194: 70-81, 1993.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Programa de controle, vigilância e profilaxia da raiva.** 2017. 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 31 janeiro 2018.

BROWN, W. M. The mitochondrial genome of animals. In: MacINTYRE, R. J. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Plenum Press, 1985. p. 95-130.

BUBADUÉ, J. M.; CÁCERES, N.; CARVALHO, R. S.; MELORO, C. Ecogeographical variation in skull shape of South-american canids: abiotic or biotic processes? **Evol Biol**, 43: 145-159. 2016.

CAMPOS, A. C.; MELO, F. L.; ROMANO, C. M.; ARAUJO, D. B.; CUNHA, E. M.; SACRAMENTO, D. R.; ZANOTTO, P. M.; DURIGON, E. L.; FAVORETTO, S. R. One-step protocol for amplification of near full-length cDNA of the rabies virus genome. **J Virol**. **Methods**, 174:1-6, 2011.

CARNIELI, P.J.; BATISTA, H. B. C. R.; OLIVEIRA, R. N.; CASTILHO, J.G. Phylogeographic dispersion and diversification of rabies virus lineages associated with dogs and crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Brazil. **Arch Virol**, 158: 2307-2313, 2013.

CARNIELI, P.J.; BRANDÃO, P.E.; CASTILHO J.G.; MACEDO C. L.; MACHADO C.L.; MACHADO L.M.; RANGEL N.; DE CARVALHO V. A.; MONTEBELLO L.; KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in northeastern Brazil. **Virus Res**, 120: 113-120, 2006.

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

CARNIELI, P.J.; FAHL, W. O.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. L.; DURYMANOVA, E.; SPÍNDOLA, R.O.; MACHADO, L.M.; Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in northeastern Brazil. **Virus Res**, 131(1): 33-46, 2008.

CARNIELI, P. J.; SCHEFFER, K. C.; FAHL, W. O.; LIMA, J. Y. O.; OLIVEIRA, R. N.; CASTILHO, J. G.; IAMAMOTO, K.; MACEDO, C. I.; BRANDÃO, P. E.; BATISTA, H. B. C. R. Genetic identification of species of bats that act as reservoirs or hosts for viral diseases. **Annual Research & Review in Biology**, 9(2): 1-9, 2016.

CASTILHO, J. G.; CARNIELI, P.; OLIVEIRA, R. N.; RAHL, W. O.; CAVALCANTE, R.; SANTANA, A. A.; ROSA, W. L. G. A.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. A Comparative study of rabies virus isolates from hematophagous bats in Brazil. **J. Wild. Dis**, 46(4): 1335-1339, 2010.

CEBALLOS, N. A.; MORÓN, S. V.; BERCIANO, J. M.; NICOLÁS, O.; LÓPEZ, C. A.; JUSTE, J.; NEVADO, C. R.; SETIÉN, A. A.; ECHEVARRIA, J. E. Novel lyssavirus in bat, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, 19 (5): 793-795, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Update: Investigation of rabies infection in organ donor and transplant recipients – Alabama, Arkansas, Oklahoma and Texas, 2004. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 53(24): 615-6, 2004.

CORDEIRO, R. A.; DUARTE, N. F. H.; ROLIM, B. N.; SOARES JÚNIOR, F. A.; FRANCO, I. C. F.; FERRER, L. L.; ALMEIDA, C. P.; DUARTE, B. H.; ARAÚJO, D. B.; ROCHA, M. F. G.; BRILHANTE, R. S. N.; FAVORETTO, S. R.; SIDRIM, J. J. C. The importance of wild canids in the epidemiology of rabies in Northeast Brazil: a retrospective study. **Zoonoses Public Health**, 63(6): 486-493, 2016.

COSTA, C. H. N.; COURTENAY, O. A new record of the hoary fox *Pseudalopex vetulus* in north Brazil. In: **Mammalia**, 67:593-594, 2003.

COURTNENAY, O.; MAFFEI, L. Crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linneaus, 1766). In: SILLERO-ZUBIRI, C.; HOFFMANN, M.; MacDONALD, D. W. (Eds.), **Canids, foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan**. IUCN/SSC Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 2004. p. 430.

DALPONTE, J. C. *Lycalopex vetulus* (Carnivora: *Canidae*). In: **Mammalian Species**, 847:1-7, 2009.

DALPONTE, J. C**. História natural, comportamento e conservação da raposa-do-campo,** *Pseudalopex vetulus* (*Canidae*). 2003. 179. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

DALPONTE, J. C.; COURTNENAY, O. Hoary fox *Pseudalopex vetulus*, (Lund, 1842). In: SILLERO-ZUBIRI, C.; HOFFMANN, M.; MacDONALD, D. W. (Eds.), **Canids, foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan**. IUCN/SSC Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 2004. p. 430.

DALPONTE, J. C.; COURTNENAY, O. *Pseudalopex vetulus.* In: **International Union for Conservation of Nature and Natural Resources/ Red list of threatened species**. 2008. Disponível em: <http://iucnredlist.org> . Acesso em 11 de maio de 2017.

DE MATTOS, C. C.; DE MATTOS, C. A.; LOZA-RUBIO, E.; AGUILAR-SETIEM, A.; ORCIARI, L. A.; SMITH, J. S. Molecular characterization of rabies virus isolates from México: implications for transmission dynamics and human risk. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 61(4): 587-597, 1999.

DELAGNEAU, J. F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Structure of the rabies virus: spatial relationships of the proteins G, M1, M2 and N. **Ann Virol** (Instit Pasteur), 132-473, 1981.

DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C. E.; TOLLIS, M.; LAFON, M.; MATTEI, J.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Antigenic Diversity of the Glycoprotein and Nucleocapsid Proteins of Rabies and Rabies-Related Viruses: Implications for Epidemiology and Control of Rabies. **Reviews of Infectious Diseases**, 10(4): 785-798, 1988.

FAMILUSI, J. B.; OSUNKOYA, B. O.; MOORE, D. L.; KEMP, G. E., FABIYI, A. A fatal human infection with *Mokola virus*. **Am J Trop Med Hyg,** 21(6): 959-63, 1972.

FAVORETTO, SR. R.; CARRIERI, M. L.; CUNHA, E. M.; AGUIAR, E. A.; SILVA, L. H.; SODRÉ, M. M.; SOUZA, M. C.; KKOTAIT, I. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-200. **Rev Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 91-95, 2002.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ARAUJO, A. A.; DE MATTOS, C. A. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerg. Infect. Dis**, 7(6): 1062-1065, 2001.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; CARRIERI, M. L.; ROLIM, B. N.; SILVA, L. M.; RUPRPECHT, C. E.; DURIGON, E. L.; DE MATTOS, C. A. Rabies virus maintened by dogs in humans and terrestrial wildlife in Ceará state, Brazil. **Emerg. Infect. Dis**, 12(12): 1978-1981, 2006.

FAVORETTO, S.R.; DE MATTOS, C. C.; DE MATTOS, C. A.; CAMPOS, A.C.; SACRAMENTO, D.V.; DURIGON, E.L. The emergence of wildlife species as a source of human rabies infection in Brazil. **Epidemiol. Infect**, 141(7): 1552-1561, 2013.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Academic Press**. 2004. p. 1273.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**, 125(1): 1-15, 1985.

FISHBEIN, D. B.; MIRANDA, N. J.; MERRILL, P.; CAMBA, R. A.; MELTZER, M.; CARLOS, E. T.; BAUTISTA, C. F.; SOPUNGCO, P. V.; MANGAHAS, L. C.; HERNANDEZ, L. M.; LEONCIO, M. M.; MERCADO, D.; GREGORIO, S.; SALVA, E.; DOBBINS, J. G.; WINKLER, W. G. Rabies control in the Republic of the Philippines: benefits and costs of elimination. **Vaccine**, 9(8): 581-87, 1991.

FLAMAND, A.; DELAGNEAU, J. F. Transcriptional mapping of rabies virus in vivo. **J. Virol**, 28(2): 518-23, 1978.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 3(5): 294-299, 1994.

FRASER, J.; FANG, S.; BARFOOT, R.; CLAYTON, P. T. Idiopathic rhabdomyolysis. **J R Soc Med**, 89(12): 706-7, 1996.

FREULING, C. M.; BEER, M.; CONRATHS, F. J.; FINKE, S.; HOFFMANN, B.; KELLER, B.; KLIEMT, J.; METTENLEITER, T. C.; MÜHLBACH, E.; TEIFKE, J. P.; WOHLSEIN, P.; MÜLLER, T. Novel lyssavirus in natterer's bat, Germany. **Emer Infec Dis**, 17(8): 1519-1522, 2011.
GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. **J Virol**, 67:1365-72, 1993.

GAUDIN, Y.; TUFFEREAU, C.; SEGRETAIN, D.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. **J Virol**, 65(9): 4853-9, 1991.

GINSBERG, J. R.; MacDONALD, D. W. Foxes, Wolves, Jackals, and Dogs: An action plan for the conservation of Canids. **IUCN Publications**. Gland, 1990. p. 91.

GOULD, A. R.; HYATT, A. D.; LUNT, R.; KATTENBELT, J. A.; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S. D. Characterization of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. **Virus Res**, 54(2): 165-87, 1998.

GUNAWARDENA, P. S.; MARSTON, D. A.; ELLIS, R. J.; WISE E. L.; KARAWITA, A. C.; BREED, A. C.; McELHINNEY, L. M.; JOHNSON, N.; BANYARD, A. C.; FOOKS, A. R. Lyssavirus in Indian Flying Foxes, Sri Lanka. **Emerging Infectious Diseases**, 22 (8): 1456-1459, 2016.

HALPIN, K.; HYATT, A. D.; PLOWRIGHT, R. K.; EPSTEIN, J. H.; DASZAK, P.; FIELD, H. E.; WANG, L.; DANIELS, P. W. Emerging viruses: coming in on a wrinkled wing and a prayer. **Clin Infect Dis**, 44: 711-717, 2007.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. London B**., 270: 313-321, 2003.

HEINEMANN, M. B.; FERNADES-MATIOLI, F. M.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H.; MADEIRA, A. M.; RICHTZENHAIN, L. J. Genealogical analysis of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiol. Infect**, 128(3): 503-511, 2002.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C. E. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **Lancet Neurol,** 1: 101–09, 2002.

HEMACHUDHA, T.; UGOLINI, G.; WACHARAPLUESADEE, S.; SUNGKARAT, W.; SHUANGSHOTI, S.; LAOTHAMATAS, J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. **Lancet Neurol**, 12: 498-513, 2013.

HEMACHUDHA, T.; WACHARAPLUESADEE, S.; MITRABHAKDI, E.; WILDE, H.; MORIMOTO, K.; LEWIS, R. A. Pathophysiology of human paralytic rabies. **J Neurovirol**, 11: 93–100, 2005.

HOPKINS, G. W; FRECKLETON, R. P. Declines in the numbers of amateurs and professional taxonomists: implications for conservation. **Anim Conserv**, 5: 245-249, 2002.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em 23 julho 2018.

INSTITUTO PASTEUR, Secretaria da Saúde. **Quadro clínico da raiva em animais**, 2018, Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/instituto-pasteur/paginas-internas/o-que-e-raiva/quadro-clinico-da-raiva-em-animais. Acesso em 23 de julho de 2018.

ITO, M.; ARAI, Y. T.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Genetic characterization and geographic distribuition of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, 284: 214-222, 2001.

JINBO, U.; KATO, T.; ITO, M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. **Entomol Sci**, 14: 107-124, 2011.

JOBS, STEVE. **Wall Street Journal**, 2007.

JOHNSON, N.; PHILLPOTTS, R.; FOOKS, A. R. Airborne transmission of lyssaviruses. **J. Med. Microbiol.**, v. 55. p. 785-790, 2006.

KEMP, G. E.; CAUSEY, O. R.; MOORE, D. L.; ODELOLA, A.; FABIYI, A. *Mokola virus*. Further studies on IbAn 27377, a new rabies-related etiologic agent of zoonosis in Nigeria. **Am J Trop Med Hyg**, 21(3): 356-9, 1972.

KING, A. A.; MEREDITH, C. D.; THOMSON, G. R. The biology of southern African lyssavirus variants. **Curr Top Microbiol Immunol**, 187: 267-95, 1994.

KING, A. A.; TURNER, G. S. Rabies: a review. **J. Comp. Pathol.**, 108(1): 1-39, 1993.

KLIPPEL, A. H.; OLIVEIRA, P. V.; BRITTO, K. B.; FREIRE, B. F.; MORENO, M. R.; SANTOS, A. R.; BANHOS, A.; PANETO, G. G. Using DNA barcodes to indentify road-killed animals in two atlantic forest nature reserves, Brazil. **Plos One**, 10 (8), 2015.

KOBAYASHI, Y.; MOCHIZUKI, N.; SIGAWA, T.; ITOU, T.; CARVALHO, A.A.B.; NOUTI, D. P.; MELLO, R. M.; SANTOS, A. K. R. A.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Isolation of a phylogenetically distinct rabies virus from a tuffed capuchin monkey (*Cebus apella*) in Brazil. **Virus Res**, 178: 535-538, 2013.

KOPROWSKI, H. Visit to an ancient curse. **Sci. Am. Sci. Med**, 2: 48-55, 1995.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Mega7: Molecular evolucionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol Biol Evol**, 33(7): 1870-1874, 2016.

KUZMIN, I. V.; HUGHES, G. J.; BOTVINKIN, A. D.; ORCIAI, L. A.; RUPPRECHT, C. E. Phylogenetic relationships of Irkut an West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. **Virus Res**, 111(1): 28-43, 2005.
KUZMIN, I. V.; MAYER, A. E.; NIEZGODA, M.; MARKOTTER, W.; AGWANDA, B.; BREIMAN, R. F.; RUPPRECHT, C. E. Shimoni bat virus, a new representative of the *Lyssavirus* genus. **Virus Res**, 149: 197-210, 2010.

KUZMIN I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T., SMITH, J. S.; HANLON, C. A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C. E. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G genes sequences. **Virus Research**, 97: 65-79, 2003.

LAFON, M.; HERZOG, M.; SUREAU, P. Human rabies vaccines induce neutralizing antibodies against the European bat rabies virus (Duvenhage). **Lancet**, 30:2(8505):515, 1986.

LAHAYE, X.; VIDY, A.; POMIER, C.; OBIANG, L.; HARPER, F.; GAUDIN, Y.; BLONDEL, D. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus infected cells: evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. **J Virol**, 83(16): 7948-58, 2009.

LEMOS, F.G.; AZEVEDO, F.C.; BEISIEGEL, B.M.; JORGE, R.P.S.; PAULA, R.G.; RODRIGUES, F.H.G.; RODRIGUES, L.A. Avaliação do risco de extinção da raposa-do-campo *Lycalopex vetulus* (Lund, 1842) no Brasil. **Avaliação do estado de conservação dos carnívoros.** 2013**.** Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/viewFile/382/289>. Acesso em 16/11/2015.

MARSTON, D. A.; HORTON, D. L.; NGELEJA, C.; HAMPSON, K.; McELHINNEY, L. M.; BANYARD, A. C.; HAYDON, D.; CLEAVELAND, S.; RUPPRECHT, C. E.; BIGAMBO, M.; FOOKS, A. R.; LEMBO, T. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. **Emerg Infect Dis**, 18: 664–667, 2012.

MATSUMOTO, S. Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. **Virology**, 17: 198-202, 1962.

MEREDITH, C. D.; PROSSOUW, A. P.; KOCH, H. P. An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. **S Afr Med J**, 45(28): 767-9, 1971.

MILLER, S. E. DNA barcoding and the Renaissance of taxonomy. **Proc Natl Acad Sci USA**, 104: 4775-4776, 2007.

NÚCLEO DE CONTROLE DAS ENDEMIAS TRANSMISSÍVEIS POR VETORES – NUEND, Coordenadoria de Apoio ao Desenvolvimento da Atenção à Saúde – CODAS, 1998-2003. **Boletim da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, Brasil**, 2004.

OLIVEIRA, R. N.; SOUZA, S. P.; LOBO, R. S.; CASTILHO. J. G.; MACEDO, C. I.; CARNIELI, P. J.; 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. **Viroloy**, 405(2): 352-360, 2010.

PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE la RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Front Zool**, 7: 1-14, 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION The monoclonal antibodies in the characterization and surveillance of rabies vírus in Latin America and the Caribbean. **Pan-American J. Public Health**, 8: 214-217, 2000.

PERRIN, P.; PORTONOÏ, D.; SUREAU, P. Étude de l'adsorption et de la pénétration du virus rabique: interactions avec les cellules BHK-21 et les membranes artificielles. **Ann Virol**. (Inst. Pasteur), 133^{E}:403-22, 1982.

PICARD-MEYER, E.; SERVAT, A.; ROBARDET, E., MOINET, M.; BOREL, C.; CLIQUET, F. Isolation of bokeloh bat lyssavirus in *Myotis nattereri* in France. **Arch Virol**, 2013.

QUEIROLO, D.; KASPER, C.B.; MEISIEGEL, B.M. Avaliação do risco de extinção do graxaim-do-campo *Lycalopex gymnocercus* (G. Fischer, 1814) no Brasil. **Avaliação de conservação dos carnívoros.** Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/view/383>. Acesso em 16 Nov. 2015.

QUEIROZ, L. H.; FAVORETTO, S. R.; CUNHA, E. M. S.; CAMPOS, A. C. A.; LOPES, M. C.; CARVALHO, C.; IAMAMOTO, K.; ARAUJO, D. B.; VRNDITTI, L. L.; RIBEIRO, E. S.; PEDRO, A. W.; DURIGON, E. L. Rabies in southeast Brazil: a change in the epidemiological pattern. **Arch. Virol**, 157: 93-105, 2012.

RUPPRECHT, C. E. Comments on latent rabies in a cat. **J Am Vet Med Assoc**, 199: 1686-1688, 1991.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Reviews-Rabies re-examined. **The Lancet Inf Dis**, 2: 327-343, 2002.

SCHNEIDER, L. G.; BARNARD, B. J. H.; SCHNEIDER H. R. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigations and oral vaccination studies: I. African virus. In: KUWERT. E.; MEURIEUX, C.; KOPROWSKI, H.; BOGEL, K. editors. **Rabies in the tropics**. Berlin: Springer-Verlag; 1985. p.47-59.

SCHNEIDER, L. G.; COX, J. H. Bat lyssaviruses in Europe. Review. **Curr Top Microbiol Immunol**, 187:207-18, 1994.

SELIMOV, M. A.; TATAROV, A. G., BOTVINKIN, A. D.; KLUEVA, E. V.; KULIKOVA, L. G. KHISMATULLINA, N. A. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. **Acta Virol**, 33(6): 542-6, 1989.

SELIMOV, M. A.; SMEKHOV, A. M., ANTONOVA, L. A.; SHABLOVSKAYA, E. A.; KING, A. A.; KULIKOVA, L. G. New strains of rabies-related viruses isolated from bats in the Ukraine. **Acta Virol**, 35(3): 226-31, 1991.

SHOPE, R. E.; MURPHY F. A.; HARRISON, A. K.; CAUSEY, O. R.; KEMP, G. E.; SIMPSON, D. I. H.; MOORE, D. L. Two African viruses serologically and morphologically related to Rabies Virus. **J Virol**, 6(5): 690-692, 1970.

SMITH, J. S.; ORCIARI, L. A.; YAGER, P. A.; SEIDEL, H. D.; WARNER, C. K. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. **J. Infec. Dis**, 166(2): 296-307, 1992.

SOKOL, F.; SCHLUMBERGER, H. D.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. **Virology**, 38(4): 651-65, 1969.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural proteins of rabies virus. **J Virol**, 7: 241-49, 1971.

SOUZA, D. N.; CARNIELI, P.; MACEDO, C. I.; OLIVEIRA, R. N.; BATISTA, H. B. C. R.; RODRIGUES, A . C.; PEREIRA, P. M. C.; ACHKAR, S. M.; VIEIRA, L. F. P.; KAWAI, J. G. C. Phylogenetic analysis of rabies virus isolated from canids in North and Northeast Brazil. **Arch Virol**, 162(1): 71-77, 2016.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies**. 2Ed. Boca Raton: CRC Press. Florida, 1991.p. 640.

TCHAICKA, L.; EIZIRIK, E.; OLIVEIRA, T. G.; CÂNDIDO JR., J. F.; FREITAS, T. R. O. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). **Molecular Ecology**, 16: 819-838, 2007.

THOULOUZE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **J Virol**, 72(9): 7181-90, 1998.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. **Nucleic Acids Res**, 14: 2671-83, 1986(a).

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

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proc Natl Acad Sci USA**, 83(11): 3914-8. 1986(b).

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of rabies virus. *In* MESLIN, FX, KAPLAN, MM, KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Genebra: World Health Organization, 1996. p.28-51.

TRIMARCHI, C. V.; NADIN-DAVIS, S. A. Diagnostic evaluation. *In* JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, 2Ed. Londres: Elsevier, 2007. p.411-469.

VON TEICHMAN, B. F.; DE KOKER, W. C.; BOSH, S.J.; BISHOP, G. C.; MEREDITH, C. D.; BINGHAM, J. Mokola virus infection: description of recent South Africa cases and review of the virus epidemiology. **Journal of South African Veterinary Association**, 69: 196-171, 1998.

WARREL, M. J. Human deaths from cryptic bats in the USA. **Lancet**, v. 364, p. 65-66, 1995.

WIKTOR, T. J. & KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigen variants. **Proc. Nat. Acad. Sci (Wash)**, 75: 3938-3942, 1978.

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M.; HIGUSHI, R. G.; PALUMBI, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of Linnean Society**, 26: 375-400, 1985.

WILSON, D. E.; REEDER, D. A. M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 2Ed. Smithsonian Institution Press, Washington. 1993. p. 1206.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Expert Commitee on Rabies. Fact Files: **Rabies.** WHO, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en>. Acesso em: 31 janeiro 2018.

WOZENCRAFT, W. C. Order carnivore. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammals species of the world**. London Smithsonian Instituiton Press, London, 2005. p. 1100.

WUNNER, W. H.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C. L.; LAFON, M.; GOLUB, E. Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. **Virology**, 140: 1-12, 1985.

WUNNER, W.H. Rabies virus. In JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 23-71.

WUNNER, W.H. Rabies virus. In JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. 2Ed. Londres: Elsevier, 2007. p. 23-68.