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

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) technique for amplification of Cytochrome 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 and 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.

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 cancrivorus*) 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).

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 DNAmít 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*), Kyrgyzstan. **Emerg Infect Dis**, 9(3):333-7, 2003
- ARAUJO, D. B.; LANGONI H.; ALMEIDA, M. F.; MEGID, J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and 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/revistaelectronica/index.php/BioBR/article/.../287> Acesso em 16 Nov. 2015
- BERTA, A. Origin, diversification and zoogeography of the 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. Mitochondrial 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* (Linnaeus, 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.; COURTENAY, 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.; COURTENAY, 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** (Institut 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, 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.; RUPPRECHT, C. E.; DURIGON, E. L.; DE MATTOS, C. A. Rabies virus maintained 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. **Emerg Infect 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 distribution 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 identify 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 tufted 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 evolutionary 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.](#) **Virology**, 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 virus in Latin America and the Caribbean. **Pan-American J. Public Health**, 8: 214-217, 2000.

PERRIN, P.; PORTONÓÏ, 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/revistaelectronica/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. Infect. 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.

THOULOZE, 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 genome 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**. Geneva: 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.

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 Committee 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 Institution 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.