

MARIA EDUARDA RODRIGUES CHIERATO

**Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a  
detecção do vírus da raiva no Brasil**

São Paulo

2021

MARIA EDUARDA RODRIGUES CHIERATO

**Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a  
detecção do vírus da raiva no Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência.

**Departamento:**

Patologia

**Área de concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. Enio Mori

São Paulo  
2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4068  
FMVZ

Chierato, Maria Eduarda Rodrigues  
Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a detecção do vírus da raiva no Brasil / Maria Eduarda Rodrigues Chierato. – 2021.  
93 f. ; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Enio Mori.

1 Raiva. 2. *Lyssavirus*. 3. RT-qPCR. 4. Diversidade molecular. 5. Diagnóstico. I. Título.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do ensaio LN34 Pan-Lyssavirus de RT-PCR em tempo real para detecção de diferentes variantes ou linhagens genéticas do vírus da raiva (RABV) brasileiras", protocolada sob o CEUA nº 6938280119 (ID 006607), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Enio Mori e equipe; Maria Eduarda Rodrigues Chierato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 29/05/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the LN34 Pan-Lyssavirus real-time RT-PCR assay for the detection of different variants or genetic lineages of Brazilian rabies virus (RABV)", utilizing 300 (males and females), protocol number CEUA 6938280119 (ID 006607), under the responsibility of **Prof. Dr. Enio Mori and team; Maria Eduarda Rodrigues Chierato** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/29/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 03/2019 a 03/2021

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Especie: **A29**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 0 anos**

N: **300**

Linhagem: **não se aplica**

Peso: **0 a 0 kg**

Local do experimento: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e Instituto Pasteur de São Paulo

São Paulo, 10 de abril de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CHIERATO, Maria Eduarda Rodrigues

Título: Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a detecção do vírus da raiva no Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

---

DEDICATÓRIA

Ao meu querido tio, **Henrique David Rodrigues** (*in memoriam*), que tanto faz falta!

---

AGRADECIMENTOS



## AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, **Ana Maria Rodrigues e Marcos Elias Alabe**, por terem me ensinado tanto, e sempre estarem ao meu lado me apoiando e incentivando.

À minha mãe, **Angélica Regina Rodrigues**, por acreditar em mim e me apoiar independente das minhas escolhas.

À **Maiara Gottardi**, por ter sido tão paciente comigo e por ser minha parceira em todos os momentos.

À minha família por todo apoio, mesmo que de forma remota.

Ao meu orientador, **Dr. Enio Mori**, por ter me dado essa oportunidade e ter sido tão participativo durante o desenvolvimento do projeto, além de todos os ensinamentos e conversas que tivemos durante esses anos.

À **Débora Fernanda Pedrozo Pavani**, por ser uma ótima amiga e *lab parter*, que sempre me ajudou e esteve do meu lado quando foi preciso.

A todos os funcionários do Instituto Pasteur de São Paulo que auxiliaram de forma direta e indireta no desenvolvimento deste projeto.

Ao **Instituto Pasteur** e à **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, pela oportunidade e contribuição necessária para a conclusão deste trabalho.

À **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)**, pelo Auxílio Pesquisa (19/02637-2) concedido.

A presente dissertação foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) – Código de Financiamento 001



## Resumo

CHIERATO, M. E. R. Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a detecção do vírus da raiva no Brasil. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A raiva, causada pelo *rabies virus* (RABV), caracteriza-se por ser uma encefalomielite viral aguda. O RABV pertence ao gênero *Lyssavirus*, que contempla outros 17 vírus. Como a raiva é uma doença que apresenta letalidade próxima a 100%, as técnicas de diagnóstico devem se mostrar precisas e fidedignas, para que possa ser realizado o controle da doença. A prova padrão ouro para o diagnóstico é a imunofluorescência direta (IFD), uma vez que apresenta alta sensibilidade e especificidade. Porém, problemas como o estado avançado de autólise das amostras, baixa carga viral, qualidade inapropriada dos insumos e até mesmo a inexperiência de profissionais para a leitura das lâminas, podem diminuir a acurácia dos resultados. O ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* para RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), que combina *primers* degenerados e múltiplos com sonda de hidrólise do tipo *Locked Nucleic Acid* (LNA), é um candidato para ser prova confirmatória da IFD, devido a sua facilidade de manuseio e capacidade de detectar as diferentes espécies de vírus dentro do gênero *Lyssavirus*, e por apresentar alta especificidade e sensibilidade. Esse ensaio detecta e amplifica porção *leader 3'* do genoma e a região inicial do gene codificador da nucleoproteína, considerada a mais conservada entre os *Lyssavirus*. Esse estudo visa a padronização e implementação do ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* de RT-qPCR para detecção das diferentes linhagens genéticas e variantes antigênicas do RABV descritas no Brasil. Para isso, foram coletadas 324 amostras positivas e compatíveis com as diferentes variantes antigênicas e linhagens genéticas do RABV presentes no Brasil, e testadas na RT-qPCR utilizando o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus*. A RT-qPCR *two-steps* com ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* apresentou uma positividade de 87,3%, e 41 amostras obtiveram resultado falso negativo. Estas amostras, que tiveram resultado falso-negativo na RT-qPCR *two-steps*, foram testadas na técnica de RT-qPCR *one-step* com ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus*, e todas tiveram o resultado verdadeiro positivo confirmado. Diante desses resultados, é possível inferir que a utilização do ensaio LN34 com a RT-qPCR em duas etapas apresenta dificuldade de detecção das diferentes linhagens genéticas e variantes antigênicas do RABV,

possivelmente devido ao não anelamento do *primer* senso durante a transcrição reversa. Por outro lado, a RT-qPCR em uma etapa com o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* foi capaz de detectar e amplificar aquelas amostras falso negativas pela reação em duas etapas, se mostrando um teste altamente sensível, e com potencial para ser utilizado como prova confirmatória à IFD para o diagnóstico da raiva no Brasil.

Palavras-chave: Raiva. *Lyssavirus*. RT-qPCR. Diversidade molecular. Diagnóstico.



## ABSTRACT

CHIERATO, M. E. R. Evaluation of LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR assay for detection of rabies virus in Brazil (Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a detecção do vírus da raiva no Brasil). 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Rabies, caused by *rabies virus* (RABV), is characterized by viral acute progressive encephalitis. The RABV belongs to *Lyssavirus* genus, that includes seventeen others virus. Due to the high lethality, almost 100%, diagnosis techniques for rabies must be accurate and reliable for the accomplishment of diseases control. The gold standard for rabies diagnostic is the direct fluorescent antibody test (dFAT), due to its high sensibility and specificity. Although, sample conservation, low viral title, poor quality inputs, and skilled technicians may hamper results accurate. The RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* assay is a combination of degenerated and multiple primers with Locked Nucleic Acid (LNA) probe that can be used as secondary test for dFAT, due to its ease manipulation and capacity for detecting the different virus species within the *Lyssavirus* genus, and due its high sensitivity and specificity. This assay detects and amplifies the leader region 3' and the initial portion of nucleoprotein gene that is considered the most conserved gene within the *Lyssavirus*. This study aims the LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR assay standardization and implementation for detecting the different RABV genetic lineages and antigenic variants described in Brazil. Therefore, 324 positive samples compatible with different RABV genetic lineages or antigenic variants were collected and tested in RT-qPCR, using LN34 Pan-*Lyssavirus* assay. The two steps LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR assay, showed positivity of 87,3%, and 41 samples obtained false negative result. Those false negative samples in the two steps LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR assay were tested in the one step LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR assay, and 100% of those samples confirmed the true positive result. Based in these results, is possible to infer that the two steps RT-qPCR assay may hamper the detection of different RABV genetic lineages and antigenic variants, probably due to mismatches between sense primer and the target region during the reverse transcription technique. On the other hand, the one step RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* assay were able to detect and amplify those false negative samples in two steps RT-qPCR,

showing to be a highly sensitivity test, and showing potential to be used as confirmatory test to dFAT for rabies diagnosis.

Keywords: Rabies. *Lyssavirus*. RT-qPCR. Molecular diversity. Diagnosis.





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
3.1	MATERIAL.....	38
3.1.1	<b>Amostras clínicas.....</b>	<b>38</b>
3.1.2	<b>Amostras isoladas em SNC de camundongos.....</b>	<b>38</b>
3.1.3	<b>Amostra de vírus fixo.....</b>	<b>39</b>
3.1.4	<b>Pesquisa de sequências nucleotídicas provenientes do banco de dados do laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur.....</b>	<b>39</b>
3.2	MÉTODOS.....	39
3.2.1	<b>Extração de material genético.....</b>	<b>39</b>
3.2.1.1	Extração de RNA de amostras clínicas.....	39
3.2.1.2	Extração de RNA do CVS e das amostras isoladas em SNC de camundongos.....	39
3.2.2	<b>Síntese de DNA complementar (cDNA).....</b>	<b>40</b>
3.2.2.1	Transcrição reversa com <i>primers</i> início e 304.....	40
3.2.2.2	Transcrição reversa com <i>primers</i> início e P784.....	40
3.2.3	<b>PCR em tempo real para caracterização genética de amostras compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV.....</b>	<b>41</b>
3.2.4	<b>PCR em tempo real com o ensaio LN34 Pan-Lyssavirus.....</b>	<b>42</b>
3.2.4.1	RT-qPCR <i>two-steps</i> com ensaio LN34 Pan-Lyssavirus.....	42
3.2.4.2	RT-qPCR <i>one-step</i> com ensaio LN34 Pan-Lyssavirus.....	42
3.2.5	<b>Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.....</b>	<b>43</b>
3.2.6	<b>Eletroforese em gel de agarose.....</b>	<b>44</b>
3.2.7	<b>Purificação do produto de PCR.....</b>	<b>45</b>
3.2.7.1	Purificação indireta do produto de PCR.....	45
3.2.7.2	Purificação direta do produto de PCR.....	45
3.2.8	<b>Sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger.....</b>	<b>45</b>
3.2.9	<b>Análise e confirmação da identidade genética das sequências geradas pelo sequenciamento por método de Sanger.....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1	AMOSTRAS TIPIFICADAS.....	48
4.1.1	<b>Isolados caracterizados como compatíveis com a variante antigênica 1 (AgV1) do RABV.....</b>	<b>48</b>

4.1.2	Isolados caracterizados como compatíveis com a variante antigênica 2 (AgV2) do RABV.....	49
4.1.3	Amostras caracterizadas como compatíveis geneticamente com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV.....	49
4.1.4	Amostras caracterizados como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros <i>Tadarida</i> spp.....	50
4.1.5	Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros <i>Lasiurus</i> spp.....	50
4.1.6	Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada em <i>Callithrix jacchus</i> .....	50
4.1.7	Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada em <i>Cerdocyon thous</i> .....	50
4.1.8	Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros <i>Eptesicus</i> spp.....	51
4.1.9	Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros <i>Histiotus</i> spp.....	51
4.1.10	Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros <i>Molossus</i> spp.....	51
4.1.11	Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros <i>Myotis</i> spp.....	51
4.1.12	Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros <i>Nyctinomops</i> spp.....	52
4.2	AMOSTRAS NÃO TIPIFICADAS.....	52
4.3	RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR) COM ENSAIO LN34 PAN- <i>Lyssavirus</i> .....	53
4.3.1	<b>RT-qPCR LN34 Pan-<i>Lyssavirus</i> two-steps</b> .....	53
4.3.1.1	RT-qPCR LN34 Pan- <i>Lyssavirus</i> two-steps utilizando cDNA sintetizado seguindo o item 3.2.2.1.....	53
4.3.1.2	RT-qPCR LN34 Pan- <i>Lyssavirus</i> two-steps utilizando cDNA sintetizado seguindo o item 3.2.2.2.....	54
4.3.2	<b>RT-qPCR LN34 Pan-<i>Lyssavirus</i> one-step</b> .....	55
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	69

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>93</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A raiva, causada pelo vírus da raiva (do inglês *rabies virus* – RABV), é uma enfermidade zoonótica que acomete mamíferos. Essa doença é caracterizada por uma encefalomielite viral aguda, e apresenta uma taxa de letalidade próxima a 100% uma vez que a infecção está estabelecida no sistema nervoso central (SNC) (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017; WUNNER; CONZELMANN, 2020).

Considerada negligenciada devido à limitação ou mesmo inexistência de medidas de vigilância e controle adequadas em algumas regiões, a raiva ainda é um sério problema de saúde pública mundial. Além de se tratar de uma enfermidade de alto custo social e econômico, essa doença causa cerca de 55.000 mortes por ano, principalmente em comunidades rurais e socioeconômicas desfavorecidas dos países em desenvolvimento na Ásia e na África (KUZMIN, 2015).

O RABV pertence ao super-reino *Viruses*, domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricotina*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* (do grego *rhábdos* que significa “forma de bastão”), gênero *Lyssavirus* (derivada do grego *lyssa* ou *lytta*, que representa “a deusa mitológica da loucura”) e espécie *Rabies lyssavirus* (do latim *rabere* ou do sânscrito *rabhas*, que traduz “loucura furiosa ou delírio”) (MORI, 2020; ICTV, 2021).

Segundo a classificação mais recente do “Comitê Internacional de Taxonomia Viral” (do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV), existem 18 espécies (17 estabelecidas e 1 candidata) do gênero *Lyssavirus*, causadoras de encefalites semelhantes àquela do RABV, agrupados em três filogrupos genética e imunopatologicamente distintos, a saber: 1) o filogrupo I inclui o *Rabies lyssavirus*, *Duvenhage lyssavirus*, *European bat 1 lyssavirus*, *European bat 2 lyssavirus*, *Australian bat lyssavirus*, *Aravan lyssavirus*, *Bokeloh bat lyssavirus*, *Gannoruwa bat lyssavirus*, *Irkut lyssavirus*, *Khujand lyssavirus*, *Taiwan bat lyssavirus* e *Kotalahti bat lyssavirus*; 2) o filogrupo II inclui o *Lagos bat lyssavirus*, *Mokola lyssavirus* e *Shimoni bat lyssavirus*; 3) o filogrupo III/IV inclui o *West Caucasian bat lyssavirus*, *Ikoma lyssavirus* e *Lleida bat lyssavirus* (Quadro 1) (ICTV, 2021).

A importância das outras lyssavíroses “semelhantes” à raiva ainda é desconhecida, visto que a ocorrência de casos humanos ainda é rara, parecendo que a distribuição das demais espécies virais de *Lyssavirus* (excluindo o RABV) está restrita em algumas regiões geográficas. No entanto, em algumas áreas consideradas

livres da raiva de origem canina, como por exemplo a Europa ocidental e Austrália, existem relatos recentes de casos humanos e em quirópteros causados por outros *Lyssavirus* distintos do RABV (JOHNSON et al., 2010; WEIR et al., 2014).

Como característica dos membros da família *Rhabdoviridae*, o RABV apresenta formato de “bala de revólver” ou de “bastão”, onde uma extremidade é cônica, e a outra achatada com aproximadamente, 45-100nm de diâmetro e 100-430nm de comprimento (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017).

Estruturalmente, o vírus apresenta um nucleocapsídeo interno de simetria helicoidal que consiste em um complexo de ribonucleoproteína (RNP), que é caracterizado pela ligação do RNA genômico com a nucleoproteína (N), juntamente com a RNA polimerase RNA-dependente (L) e fosfoproteína (P). A RNP está relacionada com a replicação e transcrição, servindo de molde para ser processada pela proteína L junto com seu cofator, proteína P (SCHNELL et al., 2010; JACKSON, 2014; KUZMIN, 2015).

O genoma viral é RNA de fita simples, não segmentado e de senso negativo (ssRNA -), que contém, aproximadamente, 12.000 nucleotídeos. No início do genoma, na porção 3', está presente a região *leader* (Le) não codificante, que é seguida por cinco genes (N, P, M, G e L) que codificam cinco proteínas estruturais, sendo elas, respectivamente: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e RNA polimerase RNA-dependente (L), e ao final da fita de RNA na extremidade 5' está localizada a região *trailer* (Tr) (Figura 1). As unidades de transcrição são separadas por curtas regiões intergênicas não codificantes: N/P (dois nucleotídeos); P/M (5 nucleotídeos); M/G (5 nucleotídeos); G/L (19-28 nucleotídeos) (JACKSON, 2014; KUZMIN, 2015; MACLACHLAN; DUBOVI, 2017).

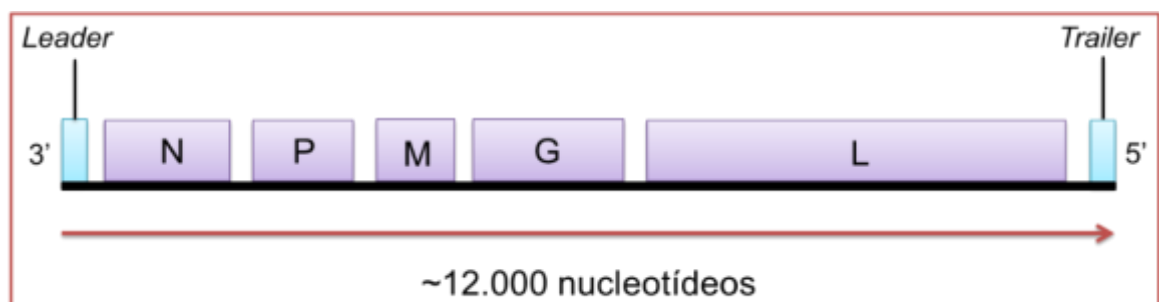


Figura 1 - Representação esquemática do genoma do vírus da raiva (RABV), destacando a região *leader* 3', os cinco genes em ordem (N, P, M, G e L), e a porção final *trailer* 5'.  
Fonte: Adaptado de Wunner e Conzelmann (2020).

Quadro 1 – Classificação das espécies de *Lyssavirus* de acordo com seu filogrupos, destacando a distribuição do vírus pelo mundo.

Filogrupo	Espécie	Vírus	Abreviatura	Distribuição
I	<i>Rabies lyssavirus</i>	Rabies virus	RABV	Mundial*
	<i>Duvenhage lyssavirus</i>	<i>Duvenhage virus</i>	DUVV	África subsaariana
	<i>European bat 1 lyssavirus</i>	<i>European bat lyssavirus 1</i>	EBLV-1	Europa
	<i>European bat 2 lyssavirus</i>	<i>European bat lyssavirus 2</i>	EBLV-2	Noroeste da Europa
	<i>Australian bat lyssavirus</i>	<i>Australian bat lyssavirus</i>	ABLV	Austrália e sudeste da Ásia
	<i>Aravan lyssavirus</i>	<i>Aravan virus</i>	ARAV	Ásia central
	<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	BBVL	Europa oriental
	<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i>	<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i>	GBLV	Ásia (Sri Lanka)
	<i>Irkut lyssavirus</i>	<i>Irkut virus</i>	IRKV	Leste da Ásia
	<i>Khujand lyssavirus</i>	<i>Khujand virus</i>	KHUV	Ásia Central
	<i>Taiwan bat lyssavirus</i>	<i>Taiwan bat lyssavirus</i>	TBLV	Leste da Ásia
<i>Kotalahti bat lyssavirus**</i>	<i>Kotalahti bat lyssavirus</i>	KBLV	Europa (Finlândia)	
II	<i>Lagos bat lyssavirus</i>	<i>Lagos bat virus</i>	LBV	África subsaariana
	<i>Mokola lyssavirus</i>	<i>Mokola virus</i>	MOKV	África subsaariana
	<i>Shimoni bat lyssavirus</i>	<i>Shimoni bat virus</i>	SHIBV	África (Quênia)
III/IV	<i>West Caucasian bat lyssavirus</i>	<i>West Caucasian bat virus</i>	WCBV	Sudeste da Europa e África (Quênia)
	<i>Ikoma lyssavirus</i>	<i>Ikoma lyssavirus</i>	IKOV	África (Tanzânia)
	<i>Lleida bat lyssavirus</i>	<i>Lleida bat lyssavirus</i>	LLEBV	Europa ocidental

\*Com exceção da Antártica, Austrália, Japão, Nova Zelândia e algumas ilhas

\*\*Espécie candidata ao gênero *Lyssavirus*

Fontes: BANYARD et al., 2011; RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017; HU et al., 2018; NOKIREKI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; ICTV, 2021.

A região *leader* (Le) apresenta 58 nucleotídeos, sendo que as nove primeiras bases são conservadas entre as diferentes espécies de *Lyssavirus*. Acredita-se que essa região está relacionada com a replicação viral. Já no final do genoma, está a região *trailer* (Tr) que é mais variável e apresenta por volta de 70 nucleotídeos. (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011).

O gene N, gene mais conservado do genoma e com maior expressão, é formado por aproximadamente 1.424 nucleotídeos, e codifica a nucleoproteína que é constituída de 450 aminoácidos. Além de envolver o genoma para a formação de nucleocapsídeo helicoidal, a proteína N apresenta função durante a replicação do RNA (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; WUNNER; CONZELMANN, 2020).

O gene P apresenta 941 nucleotídeos e codifica a fosfoproteína com, aproximadamente 297 aminoácidos, que é uma das proteínas menos conservadas do RABV. Ela interage com outras proteínas e está relacionada com a transcrição e replicação do genoma viral (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; WUNNER; CONZELMANN, 2020).

A proteína de matriz, codificada pelo gene M (805 bases), é um importante componente estrutural, pois se liga à região externa da ribonucleoproteína garantindo a rigidez necessária para dar o formato de “bala de revólver” característica do vírion. Além disso, é responsável por mediar a ligação da estrutura viral com a membrana da célula hospedeira, está presente na condensação do RNP, e tem importância durante a replicação do *virion* (OKUMURA; HARTY, 2011; WUNNER; CONZELMANN, 2020).

A glicoproteína, formada por 524 aminoácidos, é codificada pelo gene G (1.675 nucleotídeos). A proteína G tem sua conformação apresentada em trímeros na superfície da membrana viral, sendo responsável pela interação com receptores celulares e, conseqüentemente, com a entrada do vírus nas células hospedeiras (GAUDIN et al., 1992; KUZMIN, 2015).

A RNA polimerase RNA-dependente, que contém 2.142 aminoácidos, é codificada pelo gene L, maior gene do RABV contendo 6.475 nucleotídeos. Juntamente com outras proteínas, a proteína L é responsável pela maior parte das reações enzimáticas envolvidas na transcrição e replicação do genoma viral (KUZMIN; RUPPRECHT, 2008).

O ciclo viral, que ocorre no citoplasma da célula hospedeira, tem início com a ligação da glicoproteína com receptores celulares. O vírus entra na célula por



endocitose e, posteriormente, ocorre a transcrição e replicação, que tem como molde o complexo helicoidal de RNA viral e nucleoproteína. A transcrição é realizada pela RNA polimerase RNA-dependente junto com seu cofator, proteína P. Cada gene é copiado individualmente em mRNA monocistrônico, e esses são traduzidos pelos mecanismos da célula hospedeira. Após a tradução dos mRNA, a polimerase viral passa a replicar o genoma, produzindo um antígenoma de senso positivo que serve de molde para a formação do RNA viral de senso negativo (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; HEALY; BANYARD; FOOKS, 2012; PAYNE, 2017; BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

Porém, a replicação do RNA genômico do RABV não apresenta atividade corretiva de inserção de nucleotídeos, o que leva ao desenvolvimento de subpopulações de genomas virais distintos que compartilham uma origem comum (KISSI et al., 1999).

Em decorrência da adaptação viral a determinados hospedeiros animais (reservatórios) ao longo do tempo em determinada região geográfica, os diferentes genomas formaram agrupamentos de mutantes com variações comuns (marcadores moleculares específicos), que podem ser classificados como variantes antigênicas (AgV) e/ou linhagens genéticas distintas. No Brasil, onde até hoje apenas foi descrita a ocorrência do RABV, os principais reservatórios para o vírus são: cães domésticos (AgV1 e AgV2), morcegos hematófagos vampiros-comum (*Desmodus rotundus*) (AgV3), e não-hematófagos frugívoros *Artibeus lituratus* (AgV3) e insetívoros [AgV4 (*Tadarida brasiliensis*), AgV6 [*Lasiurus cinereus* (atual *L. c. villosissimus*)] e sete linhagens genéticas de morcegos insetívoros [(*Tadarida* spp., *Lasiurus* spp., *Molossus* spp., *Histiotus* spp., *Nyctinomops* spp., *Eptesicus* spp., *Myotis* spp.)], saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*); (FAVORETTO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2010).

O ciclo epidemiológico de transmissão da raiva no Brasil pode ser dividido em três partes: 1) ciclo doméstico que apresenta como principal reservatório o cão doméstico, sendo onde ocorre a maior interação com humanos; 2) ciclo silvestre aéreo que é mantido por quirópteros, principalmente o morcego hematófago *Desmodus rodundus* (vampiro-comum), onde pode ocorrer a transmissão de raiva para os seres humanos e animais de produção de interesse econômico; e 3) ciclo silvestre terrestre, onde é mantida a circulação do vírus nos animais selvagens, principalmente em canídeos selvagens (*Cerdocyon thous*) e saguis-de-tufo-branco

(*Callithrix jacchus*) (ACHA; SZYFRES, 2003; MORI, 2020) (Figura 2).

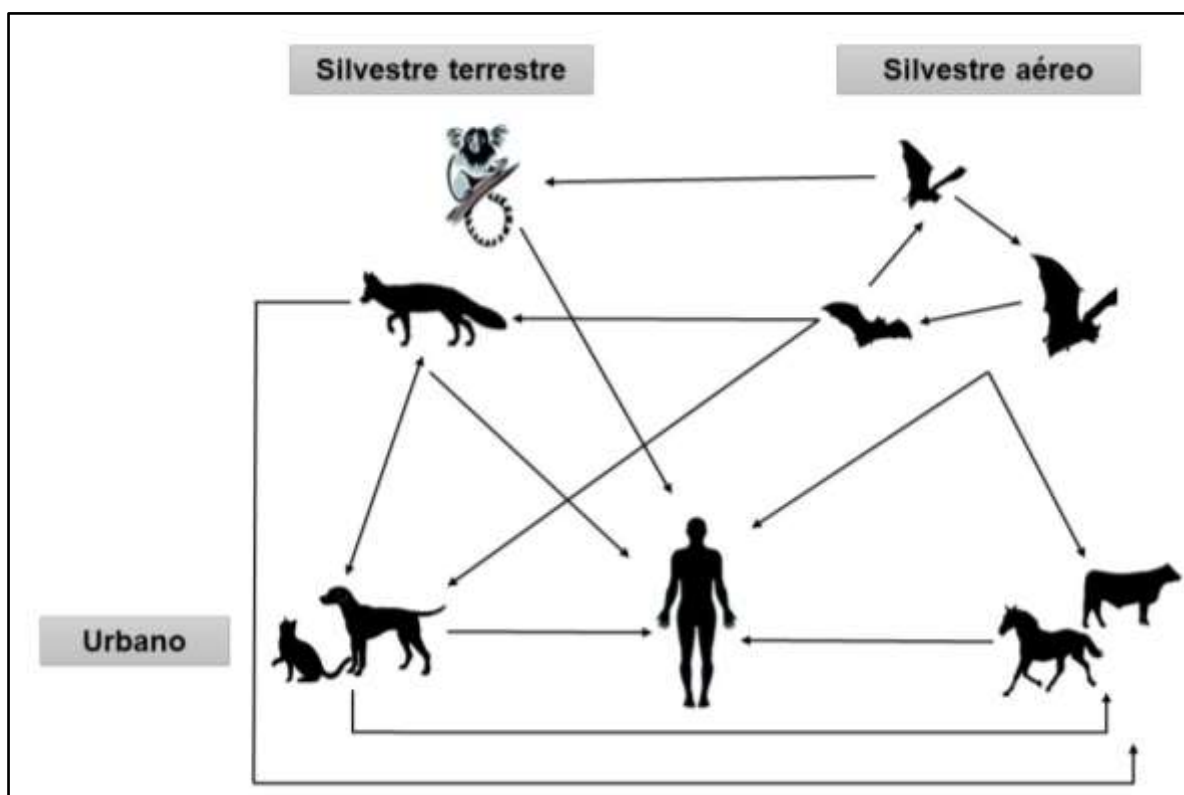


Figura 2 - Representação do ciclo epidemiológico da raiva, mostrando a interação entre os ciclos doméstico, ciclo selvagem aéreo e ciclo selvagem terrestre.  
Fonte: Adaptado de Acha e Szyfres (2003).

Segundo o Ministério da Saúde, apenas nos últimos cinco anos, foram registrados 22 casos de raiva humana compatíveis com AgV3, sendo que a transmissão ocorreu em diferentes espécies animais (quatro por felinos e 18 por morcegos) (BRASIL, 2021).

Em uma série histórica do período de 1986 a 2020, segundo dados do Ministério da Saúde, observou-se que 156 pessoas foram infectadas com o RABV em decorrência de agravos de morcegos. Dentre esses casos, destaca-se os surtos epidêmicos que ocorreram nas comunidades ribeirinhas da Amazônia (estados do Pará e do Maranhão), nos anos de 2004 e de 2005, com 62 mortes humanas devido a raiva causada pela AgV3 isolados em morcegos hematófagos *D. rotundus* (KOTAIT et al., 2019; BRASIL, 2021).

Além da transmissão de raiva aos humanos, o morcego hematófago *D. rotundus* pode gerar grandes perdas econômicas na produção agropecuária (KOTAIT et al., 2007). Apesar da existência da subnotificação, em maior parte por

conta da precária vigilância laboratorial, é estimado uma perda econômica de US\$30 milhões por ano na América Latina em decorrência da infecção de bovinos com RABV (ACHA; MALAGA-ALBA, 1988).

Algumas espécies do gênero *Callithrix* spp são endêmicas no Brasil, porém o RABV só foi encontrado na espécie sagui-de-tufo-branco (*C. jacchus*) no Nordeste do Brasil. Em 34 anos, entre 1986 e 2020, foram registrados 19 casos de raiva humana transmitida por primata não-humano (PNH), sendo que 68,4% dos mesmos (13/19) foram descritos no estado do Ceará consequentes a agravos do *C. jacchus*. Essa variante viral particular presente neste reservatório é considerada muito próxima filogeneticamente daquelas que são isoladas em morcegos insetívoros (KOTAIT et al., 2019; BRASIL, 2021)

Em relação aos 109 casos de raiva em PNH no período de 2002 a 2020, observa-se que a variante viral compatível com o *C. jacchus* circula somente no Nordeste do Brasil, em especial no estado do Ceará (78,9% das detecções, 86/109). Mas também, foi comprovada a presença dessa variante viral em outros estados, tais como, Bahia, Piauí e Pernambuco (KOTAIT et al., 2019; BRASIL, 2021).

Sabe-se que a maioria dos casos de raiva humana no mundo é transmitida por cães, principalmente na Ásia e na África (RUPPRECHT; FOOKS; ABELARIDDER, 2018). No Brasil, por conta das campanhas de imunização contra a raiva canina iniciadas na década de 1970, com alta cobertura vacinal (>70% da população), houve uma queda gradativa tanto no número de casos de raiva em cães domésticos quanto de raiva humana transmitida por esses animais. Os últimos registros de casos de raiva humana causada pela AgV2 foram em 2013, com três óbitos nos municípios (Humberto de Campos, São José de Ribamar e Mirinzal) localizados na mesorregião Norte do estado do Maranhão (BRASIL, 2021).

Exceção a essa tendência de queda da raiva de origem canina aconteceu em 2015, quando ocorreu uma epizootia de raiva em cães (com 71 casos) compatíveis com AgV1 nos municípios de Ladário e Corumbá localizados na mesorregião dos Pantanaís do estado do Mato Grosso do Sul. Além disso, neste mesmo ano houve um caso humano associado com esta variante. É importante salientar que ambas as cidades estão situadas na região fronteira com a Bolívia, país que ainda se apresenta como um local de persistência para a raiva de origem canina na América do Sul (BRASIL, 2021).

No Nordeste do Brasil, também há a circulação da linhagem genética de

RABV isolada em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), filogeneticamente relacionada com a AgV2, a qual apresenta importância epidemiológica pois há registro de casos de raiva humana transmitida por canídeos selvagens, com 14 casos entre os anos de 1986 e 2020. O último relato de raiva humana relacionada com agravo deste animal selvagem foi no ano de 2020 no município de Riacho dos Cavalos, no sertão da Paraíba, no qual uma mulher de 68 anos veio a óbito (BRASIL, 2021).

Baseando-se nos dados do Ministério da Saúde, nos últimos cinco anos foram reportados 194 casos de raiva em canídeos na região Nordeste (47 em cães domésticos e 147 em canídeos selvagens). Além do mais, pode ocorrer a interação entre os canídeos selvagens e domésticos permitindo que aconteça a perpetuação do vírus nas áreas urbanas, possibilitando reemergência da raiva em locais onde ela estava erradicada (KOTAIT et al., 2007; BRASIL, 2021).

Visto que a encefalite causada pelo RABV é quase sempre letal, o diagnóstico confiável para essa doença é de suma importância, uma vez que o resultado laboratorial influencia diretamente nas decisões médicas quanto a profilaxia pós-exposição e, também, nas medidas a serem adotadas em um controle de um foco positivo. Diante disso, se torna necessário a implementação de técnicas que sejam sensíveis, específicas, rápidas e acuradas para que os resultados sejam sempre fidedignos (MESLIN; KAPLAN, 1996; LÉCHENNE et al., 2016).

Como nenhum sinal clínico e/ou lesões *post-mortem* macroscópicas podem ser consideradas patognomônicas, o diagnóstico da raiva deve depender exclusivamente do teste laboratorial (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO, 2018) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2018), a imunofluorescência direta (IFD) é considerada como teste “padrão ouro” para o diagnóstico laboratorial *post-mortem* da raiva, tanto para amostras animais quanto humanas (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996). No entanto, em algumas situações, tais como amostras em estado de autólise avançado, carga viral baixa, amostras de SNC “mutiladas” (com ausência de estruturas importantes para diagnóstico da raiva, tais como cerebelo, tronco encefálico e hipocampo), qualidade dos insumos (em especial o conjugado antirrábico - CAR) inadequada e até mesmo a falta de experiência de profissionais para a leitura das lâminas, podem levar a resultados falso-negativos

(CENTOAMORE et al., 2020). Além disso, a IFD é uma técnica de alto custo relativo, por conta da necessidade de um CAR e de um microscópio de fluorescência de qualidade. Essas desvantagens mostram a necessidade do desenvolvimento de técnicas confirmatórias à IFD que sejam rápidas, específicas, sensíveis, acuradas e de fácil padronização e reprodutibilidade em diferentes laboratórios para o diagnóstico da raiva (SILVA et al., 2013).

Apesar das provas moleculares convencionais baseadas em gel como RT-PCR convencional seguidas do sequenciamento nucleotídico serem preconizadas pela OMS no diagnóstico *ante-mortem* em humanos, elas não são indicadas como teste primário no diagnóstico tradicional *post-mortem* a partir de amostras frescas de SNC. Estas técnicas devem ser realizadas sob rigorosos procedimentos com o intuito de evitar resultados falso-negativos ou falso-positivos. A susceptibilidade a resultados falso-positivos se explica pela contaminação cruzada em amostras negativas por produtos amplificados, como nos casos da *nested* PCR ou *hemi-nested* PCR. Já os resultados falso-negativos podem ocorrer em decorrência da presença de substâncias inibidoras de amplificação de ácido nucleico ou mesmo por falhas durante as etapas de extração, transcrição reversa ou mesmo da amplificação (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019).

Outra prova molecular, a RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) funciona em um sistema de tubo fechado, o que reduz a probabilidade de contaminação cruzada, diminuindo, conseqüentemente, resultados falso-positivos. Além disso, quando comparado com a RT-PCR convencional, a RT-qPCR é um método mais rápido, pois utiliza fragmentos menores de *amplicon* (~100pb) e não existe a necessidade de uma etapa posterior confirmatória, como o gel de eletroforese, minimizando a ocorrência de contaminação com produtos amplificados e conseqüente resultados falso-positivos (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019).

Com a utilização da RT-qPCR para diagnóstico da raiva, em razão das características inerentes à técnica, torna possível a notificação das autoridades de saúde pública e animal de uma forma mais rápida, permitindo que decisões apropriadas sejam tomadas para um paciente ou também para o controle do foco positivo da doença (SILVA et al., 2013).

Um dos ensaios mais utilizados na qPCR é o SYBR® Green, um teste composto por um fluoróforo intercalante de DNA dupla fita, onde a intensidade da fluorescência cresce proporcionalmente com a quantidade de produto de PCR

produzido. No entanto, é necessária uma etapa adicional denominada curva de *melting* ou de dissociação, para se distinguir a especificidade do produto de amplificação (WACHARAPLUESADEE; HEMACHUDHA, 2010). Além disso, neste sistema intercalante de ácido nucleico, para a confirmação da identidade viral, não se descarta a etapa adicional de eletroforese em gel e sequenciamento nucleotídico em amostras com amplificações inconclusivas.

Outro tipo de ensaio para a qPCR é a utilização da sonda (*probe*) de hidrólise 5'-exonuclease da Taq DNA polimerase, denominada comercialmente como sistema TaqMan<sup>®</sup>, que apresenta na região 5' um fluoróforo *reporter* e na porção 3' um silenciador *quencher*. O funcionamento da sonda se dá devido a capacidade do *quencher* absorver a energia liberada pelo fluoróforo *reporter* quando os dois estão próximos, ou seja, uma sonda íntegra – sem clivagem (APPLIED BIOSYSTEMS, 2020). Logo, a produção e detecção de *amplicons* nesse tipo de ensaio é consequente de uma clivagem enzimática da sonda e uma separação de seus componentes *reporter* e *quencher*, produzindo assim um sinal fluorescente, que aumenta em proporção ao acúmulo do produto de amplificação específico (HOFFMANN et al., 2010).

Devido a necessidade de um *reporter* na sonda de hidrólise TaqMan<sup>®</sup>, torna-se possível a realização de ensaios *multiplex* para a detecção e/ou tipificação de patógenos, desde que usadas sondas específicas e marcadas com diferentes fluoróforos com emissão de luz com comprimentos de onda distintos (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019).

Na RT-qPCR com sistema TaqMan<sup>®</sup>, somente observa-se amplificação quando se tem o alvo específico, não sendo necessário etapas adicionais pós-PCR (como eletroforese em gel e sequenciamento nucleotídico) para confirmação do resultado, minimizando assim a possibilidade de contaminação cruzada com *amplicons* (HOFFMANN et al., 2010). No entanto, neste sistema pode haver diminuição da amplificação e/ou detecção do ácido nucleico quando ocorre o não pareamento (*mismatch*) no sítio de ligação entre os nucleotídeos da sonda com a sequência alvo complementar, podendo assim em uma situação extrema apresentar resultado negativo (HUGHES et al., 2004; WACHARAPLUESADEE et al., 2008).

Dentro os tipos de sondas de hidrólise, existe a TaqMan tipo *Minor Groove Binder* (MGB). Esse é um tipo específico de *probe* onde na porção 3', juntamente com o *quencher* não fluorescente, está ligada a molécula de MGB, a qual forma uma

“ponte” entre a sonda de hidrólise e a sequência alvo, aumentando a temperatura de *melting* e, também, reforçando a ligação da sonda. Consequentemente, as sondas TaqMan tipo MGB® podem ser mais curtas do que outros tipos de sonda, como por exemplo, as do tipo tetrametilrodamina (TAMRA) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2020).

Anteriormente à utilização da sonda de hidrólise TaqMan tipo MGB®, era comumente usada uma sonda com fluoróforo TAMRA agindo com *quencher*. Porém, esse tipo de *quencher* apresenta uma fluorescência “nativa” que contribui para o aumento de ruídos durante a reação. Além disso, como a *probe* necessita de uma maior temperatura de anelamento do que os *primers*, as sondas do tipo TAMRA são mais longas, o que pode diminuir a especificidade (APPLIED BIOSYSTEMS, 2020; SIGMA-ALDRICH, 2021a).

O Black Hole Quencher® (BHQ®) é uma opção de *quencher* não fluorescente que, diferente do *quencher* TAMRA, não emite fluorescência “nativa” e é capaz de absorver diferentes comprimentos de onda emitidos por diferentes tipos de *reporter*. Como existem variações do BHQ®, torna-se possível a realização de testes *multiplex*, devido a possibilidade da utilização de diferentes fluoróforos. Isso simplifica o desenho de sondas, além da implementação e interpretação de testes do tipo *multiplex* (SIGMA-ALDRICH, 2021a).

Já as sondas do tipo *Locked Nucleic Acid* (LNA) apresentam nucleotídeos que contém uma ponte de metileno que conecta o oxigênio -2' da ribose com o carbono -4', o que resulta em uma conformação 3' endo bloqueada, reduzindo a flexibilidade conformacional de ribose e aumentando a organização local do esqueleto de açúcar fosfato (*phosphate backbone*). O LNA apresenta vantagens pois aumenta a estabilidade da temperatura das sondas na qPCR, reduz a fluorescência de fundo o que melhora a relação sinal/ruído, aprimora a discriminação de um único nucleotídeo e, também permite uma melhor distinção de incompatibilidade (*mismatch*) entre a sonda e a sequência alvo (SIGMA-ALDRICH, 2021b).

Como comentado, por conta dos diferentes tipos de sonda existentes, o ensaio com sonda de hidrólise Taqman® tem uma maior especificidade analítica quando comparada com o sistema SYBR® Green. Contudo, com a diversidade de sequências nucleotídicas presente no gene codificador da nucleoproteína das diferentes espécies virais do gênero *Lyssavirus*, torna-se difícil o desenvolvimento de um teste de diagnóstico universal utilizando o ensaio com sonda de hidrólise Taqman®. Além disso, devido ao fato da ausência de amplificação no sistema com

sonda de hidrólise quando ocorre *mismatch* entre os nucleotídeos da sonda e a sequência alvo, encontrou-se dificuldade de estabelecer um teste universal com número reduzido de sondas e de baixo custo nos primeiros trabalhos descritos utilizando a técnica de RT-qPCR para detecção do RABV (HUGHES et al., 2004).

Um fator crucial na determinação da especificidade da qPCR é a sequência de nucleotídeos do par de *primers* e da sonda de hidrólise utilizado na reação. Para fins diagnósticos como prova primária de triagem, a RT-qPCR deveria ter menor especificidade analítica, a fim de amplificar todas as espécies do gênero *Lyssavirus*. O gene N, uma das regiões mais conservadas no genoma do *Lyssavirus*, tem sido alvo de estudos para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico para detecção universal (HANLON; NADIN-DAVIS, 2013). Ao longo dos anos, diversos ensaios para RT-qPCR foram desenvolvidos, sendo que alguns foram desenhados para diferenciar espécies dentro do gênero *Lyssavirus*, enquanto outros testes moleculares Pan-*Lyssavirus* foram elaborados para detectar universalmente diferentes espécies em apenas um teste.

Black et al. (2002) descreveram um ensaio do tipo sonda de hidrólise TaqMan para detecção de seis espécies do gênero *Lyssavirus* (RABV, LBV, MOKV, DUVV, EBLV-1 e EBLV-2), onde foi necessário desenhar três diferentes sondas para o RABV devido à alta variabilidade genética, e uma sonda específica para cada espécie viral. A sonda para a detecção do LBV não se mostrou específica, amplificando também MOKV. Com esse ensaio foi possível a diferenciação entre o RABV e as outras espécies de *Lyssavirus* que eram conhecidos na época (BLACK et al., 2002).

Um ensaio diferenciando três diferentes espécies do gênero *Lyssavirus* (RABV, EBLV-1 e EBLV-2) foi descrito por Wakeley et al. (2006). Durante os testes foram utilizados os *primers* JW12 (HEATON et al., 1997) e N165-146 (WAKELEY et al., 2006) para realização da transcrição reversa do RNA para DNA complementar. A qPCR foi feita com três sondas de hidrólise específicas (LysGT1, LysGT5 e LysGT6) para detecção e diferenciação de cada espécie viral a ser testada, marcadas com fluoróforos diferentes, permitindo realização de um ensaio *multiplex* (WAKELEY et al., 2006).

Em 2008, Orlowska et al. publicaram um estudo com RT-qPCR, utilizando um conjunto de primers e sonda para detecção do RABV e um outro ensaio para detecção do EBLV-1. Cada ensaio foi marcado com diferentes fluoróforos, o que



possibilitou a diferenciação dessas duas espécies do gênero *Lyssavirus* em um ensaio *multiplex* (ORŁOWSKA et al., 2008).

Hayman et al. (2011) desenvolveram um ensaio universal de qPCR com SYBR Green para detecção de todas as lissaviroses descritas até então (RABV, LBV, MOKV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, ABLV, IRKV, ARAV, KHUV e WCBV). Para esse ensaio foram testados os *primers* JW12 e N165-146 (HEATON et al., 1997; WAKELEY et al., 2006), que amplificam a região inicial do gene N. O ensaio se mostrou apto a detectar as 11 diferentes espécies de *Lyssavirus*. Como esse teste não consegue diferenciar o RABV com outros *Lyssavirus* semelhantes, se torna necessário uma análise adicional por para confirmação da identidade viral por meio da verificação por sequenciamento nucleotídico do produto da qPCR (HAYMAN et al., 2011).

Em 2017, foi desenvolvido o teste LN34 Pan-*Lyssavirus* de RT-qPCR a partir de uma combinação de *primers* degenerados e múltiplos associados com uma sonda de hidrólise do tipo LNA, elaborado pelo *Centers of Disease Control* (CDC) de Atlanta/EUA (WADHWA et al., 2017). O sistema LN34 amplifica e detecta a região inicial do genoma próxima da extremidade 3' que é conservado nas diferentes espécies de *Lyssavirus*, denominado como sequência *leader* e parte do gene codificador da nucleoproteína (Figura 3) (WADHWA et al., 2017).

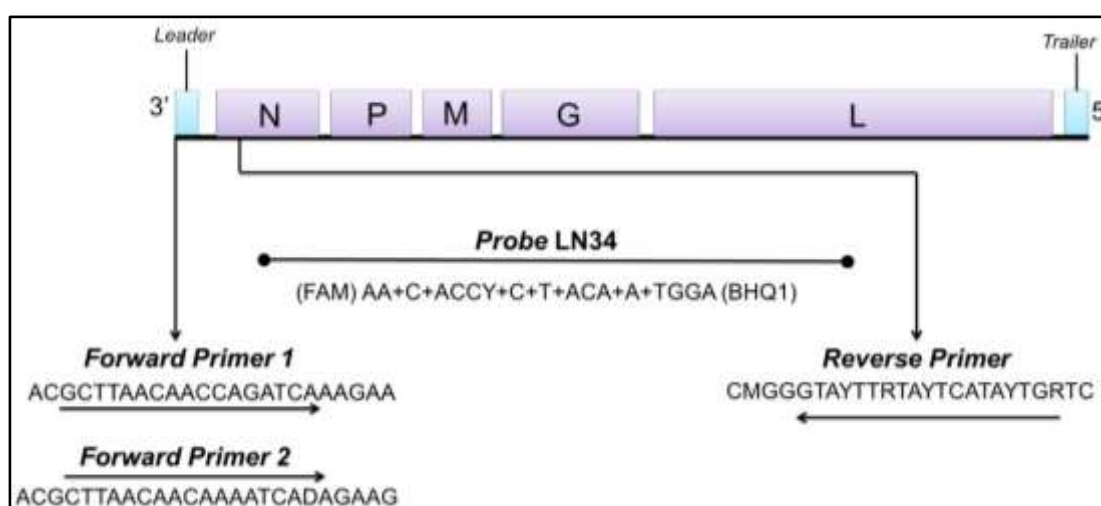


Figura 3 - Representação da estrutura do genoma do RABV, incluindo os *primers forward*, *primer reverse*, e a *probe* LN34 utilizados no ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-PCR em tempo real.

N: nucleoproteína; P: fosfoproteína; M: proteína de matriz; G: glicoproteína; L: *large protein*.

Fonte: WADHWA et al., 2017.

Além da sonda tipo LNA, o ensaio com LN34 inclui um RNA artificial que atua como um controle positivo (LPC) na construção da curva padrão na quantificação absoluta em número de cópias, permitindo uma padronização (uniformidade) dos procedimentos e otimização entre laboratórios e diferentes “corridas”, o que assegura a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados em qualquer região do mundo. Além disso, permite verificar potencial de contaminação (HOFFMANN et al., 2010; WADHWA et al., 2017).

O teste também possui um controle endógeno de  $\beta$ -actina, que detecta a expressão deste gene no mRNA do hospedeiro, o qual é conservado em todos os mamíferos. O teste de RT-qPCR com detecção da expressão do gene da  $\beta$ -actina é um controle da presença de RNA em cada amostra e age como indicador de inibição de amplificação, falha de extração e/ou degradação de RNA (GIGANTE et al., 2018).

Em estudo preliminar com 2.120 amostras provenientes de sete estados norte-americanos, o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* revelou sensibilidade e especificidade diagnósticas elevadas (100% e 99,93%, respectivamente) com o teste LN34 Pan-*Lyssavirus*, que superam aquelas obtidas pela IFD (GIGANTE et al., 2018).

Posteriormente, utilizando o mesmo ensaio, realizou-se um estudo mais abrangente com 2.978 amostras provenientes de diversas regiões (Américas, Ásia e Europa) que foram avaliadas em 14 diferentes laboratórios, onde se observou sensibilidade e especificidade de 99,9% e 99,68%, respectivamente quando comparada com a IFD. Observou-se também repetibilidade e reprodutibilidade nas reações. A partir destes resultados de desempenho associados com a facilidade em detectar universalmente a diversidade de espécies presente no gênero *Lyssavirus*, o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* demonstrou potencial de ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico da raiva em todo mundo (GIGANTE et al., 2018).

Apesar do amplo universo amostral presente nesses trabalhos, apenas uma sequência genética referente a amostra brasileira foi utilizada para o desenho dos *primers* e sonda, e apenas um isolado de morcego hematófago *D. rotundus* foi testado no painel de validação. Ainda, durante a avaliação entre laboratórios também não foram utilizadas amostras brasileiras, sendo que as amostras testadas eram originadas dos Estados Unidos, Canadá, Haiti, Chile, Europa e Ásia. (WADHWA et al., 2017; GIGANTE et al., 2018).

Logo, esse trabalho se justifica com a necessidade da avaliação e padronização do ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR com as diferentes variantes antigênicas e linhagens genéticas do RABV circulantes no Brasil, para que haja uma técnica confirmatória à IFD para diagnóstico *post mortem* da raiva que seja altamente sensível e específica, que apresente robustez, rapidez e seja de fácil de manipulação.



## 2. OBJETIVO

Avaliar e padronizar o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* na técnica de RT-PCR em tempo real utilizando amostras sabidamente positivas compatíveis com as diferentes variantes antigênicas e linhagens genéticas circulantes no Brasil, provenientes do sistema de vigilância da raiva animal do Instituto Pasteur de São Paulo.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAL**

##### **3.1.1. Amostras clínicas<sup>1</sup>**

Foram utilizadas 210 amostras de *pool* de fragmentos do sistema nervoso central (SNC) [encéfalo (tálamo, córtex, hipocampo, cerebelo e tronco encefálico) e medula espinhal] de diferentes espécies animais infectados naturalmente com vírus da raiva enviadas para diagnóstico no Instituto Pasteur de São Paulo. Essas amostras são compatíveis com diferentes linhagens genéticas ou variantes antigênicas (Anexo A).

Do total de amostras clínicas utilizadas nesse estudo, 77,6% (163/210) foram enviadas ao Instituto Pasteur para o diagnóstico da raiva e foram testadas positivas à técnica padrão ouro (Anexo A).

O restante das amostras clínicas de SNC [22,4%(47/210)], previamente classificadas como positivas pela IFD, foram provenientes de diversos laboratórios da rede diagnóstica da raiva [principalmente dos LACENs (Laboratórios Centrais de Saúde Pública) dos demais estados brasileiros], encaminhados ao Instituto Pasteur para caracterização viral das variantes antigênicas ou linhagem genética pela técnica de sequenciamento pelo método de Sanger (Anexo A).

##### **3.1.2. Amostras isoladas em camundongos<sup>1</sup>**

Foram utilizadas 114 amostras positivas isoladas em sistema nervoso de camundongos pela rotina laboratorial do Instituto Pasteur. Essas amostras são compatíveis com diferentes variantes antigênicas ou linhagens genéticas (Anexo B).

Do total de amostras isoladas em camundongos, 24,6% (28/114) apresentaram também resultado positivo na técnica de IFD (Anexo B).

O restante das amostras isoladas em SNC de camundongo [75,4%(86/114)], provenientes de diversos laboratórios da rede diagnóstica da raiva, foram encaminhadas ao Instituto Pasteur para caracterização viral das variantes antigênicas ou linhagens genéticas, sendo testadas nas técnicas de

---

<sup>1</sup>Resultados obtidos a partir da rotina laboratorial de diagnóstico da raiva do Instituto Pasteur de São Paulo.

imunofluorescência indireta (IFI) e/ou RT-PCR convencional seguido do sequenciamento pelo método de Sanger (Anexo B).

### **3.1.3. Amostra de vírus fixo**

O vírus fixo, o *Challenge Virus Standard* (CVS), estirpe CVS/31, foi utilizado nas provas de caracterização viral e RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) como controle positivo.

### **3.1.4. Pesquisa de sequências nucleotídicas provenientes do banco de dados do laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur**

Foram recuperadas 137 sequências nucleotídicas do vírus da raiva provenientes do banco de dados do laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur a partir de amostras clínicas (item 3.1.1) e isolados (item 3.1.2) que foram testadas e submetidas ao sequenciamento pelo método de Sanger pela rotina diagnóstica do Instituto Pasteur de São Paulo (Anexo A; Anexo B).

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Extração de material genético**

#### **3.2.1.1. Extração de RNA de amostras clínicas**

Para a extração de material genético do *pool* de fragmentos de SNC de amostras clínicas foi utilizado o kit *RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit* (QIAGEN) ou TRIzol Reagent (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. O RNA obtido foi armazenado em freezer -80°C até o momento de uso.

#### **3.2.1.2. Extração de RNA do CVS e das amostras isoladas em camundongo**

O RNA de amostras isoladas em SNC de camundongos e do *Challenge Virus Standard* (CVS) foi extraído utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen® Life



Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. O material genético obtido, foi armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

### 3.2.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

#### 3.2.2.1. Transcrição reversa com *primers* início e 304

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA) foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para este protocolo foi feito um *mix*, com volume final de  $47\mu\text{L}$ , contendo  $5\mu\text{L}$  de RNA (item 3.2.1),  $5\mu\text{L}$  de *primer* senso Início,  $5\mu\text{L}$  de *primer* antissenso 304 (Quadro 2), ambos os *primers* na concentração de  $10\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{L}$  de dNTP na concentração de  $10\text{mM}$  ( $2,5\text{mM}$  de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP),  $8\mu\text{L}$  de 5X First-Strand Buffer,  $4\mu\text{L}$  de ditiotreitól (DTT)  $0,1\text{M}$ ,  $1\mu\text{L}$  de SuperSript™II RT ( $2.000\text{U}/\mu\text{L}$ ) e  $13\mu\text{L}$  de água ultrapura. Para síntese do cDNA, o mix foi colocado em um termociclador (*XP Cyclor, Bioer Technology*) a  $42^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos. Ao final da reação, as amostras de cDNA foram armazenadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

#### 3.2.2.2. Transcrição reversa com *primers* início e P784

Foi realizada outra transcrição reversa utilizando diferente par de *primers* [*primer* senso Início e *primer* antissenso P784 (Quadro 2)] nas amostras que tiveram resultado negativo quando testadas na PCR em tempo real (qPCR) LN34 *two-steps* (item 3.2.4.1) com cDNA sintetizado de acordo com o item 3.2.2.1. Para a obtenção do cDNA foi realizada transcrição reversa de modo semelhante ao descrito no item 3.2.2.1.

Quadro 2 – Sequência de *primers* utilizados nas reações de transcrição reversa e de PCR convencional.

<b>Primers</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Região*</b>	<b>Referência</b>
Início	senso	ACGCTTAACAACAARATCARAG	1-22	CAMPOS et al., 2011
304	antissenso	TTGACGAAGATCTTGCTCAT	1514-1533	ORCIARI et al., 2001
P784	antissenso	CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA	784-805	SOARES et al., 2002

O código do nucleotídeo degenerado está de acordo com normas da IUPAC (R: A ou G).

\*A região de hibridização dos *primers* é em relação ao genoma completo do vírus fixo PV (número de acesso no GenBank: M13215.1).

### 3.2.3. PCR em tempo real para caracterização genética de amostras compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV

Para caracterização de amostras clínicas de herbívoros, morcego hematófago *Desmodus rotundus* e morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3), foi utilizado o ensaio de PCR em tempo real (qPCR) descrito por Scheffer (2011). Esse ensaio foi realizado utilizando placa de 96 orifícios *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate*, e em cada orifício foram distribuídos 12,5µL de *2X TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 1,25µL do *Custom Taqman® Gene Expression Assay 20X*, contendo os *primers* senso K1 e antissenso K2, e a sonda de hidrólise KP (Quadro 3), 8,75µL de água livre de nucleases, e 2,5µL de cDNA de amostra (item 3.2.2.1), totalizando um volume de 25µL. Cada amostra foi feita em duplicata e todas as reações contavam com um controle positivo (amostra sabidamente positiva e anteriormente tipificada como AgV3) e um controle negativo (água ultra pura).

A placa foi vedada com *MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems™)* e colocada no aparelho de PCR em tempo real *7500 Real-Time PCR*, e submetida aos ciclos de temperaturas descritos no Quadro 4. Os resultados foram analisados no *7500 Software Applied Biosystems™*, e as amostras que apresentaram ciclo de quantificação (Cq) menor que 35, foram consideradas positivas. Foi considerado inconclusivo, as amostras com Cq entre 35 e 40. E as amostras eram consideradas negativas quando o Cq era maior que 40.

Quadro 3 – Sequência de *primers* e sonda utilizados nos ensaios de qPCR para caracterização de amostras compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV

<b>Primers/sonda</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Região*</b>
Primer K1	senso	GAGACAGCCCCCTTTGCA	590-607
Primer K2	antissenso	GCCAGGAATCTGAAATTTGGTATGG	666-690
Sonda KP	-	(FAM) ACGACCCACAAAATGT (MGB)	635-650

A sonda KP é marcada com *reporter* FAM na porção 5', e *quencher* MGB na porção 3'.

\*A região de hibridização dos *primers* e da sonda é em relação ao genoma completo do vírus fixo PV (número de acesso no GenBank: M13215.1).

Quadro 4 – Condições de temperatura e tempo para cada ciclo da qPCR no aparelho de PCR em tempo real 7500 *Real-Time PCR*.

<b>Etapas do programa</b>	<b>Número de Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Incubação enzima UNG	1 ciclo	50°C	2 minutos
Ativação enzima Amplitaq Gold	1 ciclo	95°C	10 minutos
Desnaturação	45 ciclos	95°C	15 segundos
Hibridização e extensão	45 ciclos	60°C	1 minuto

### 3.2.4. PCR em tempo real com ensaio LN34 Pan-Lyssavirus

#### 3.2.4.1. RT-qPCR *two-steps* com ensaio LN34 Pan-Lyssavirus

Foi utilizado um ensaio de RT-qPCR para a detecção de amostras compatíveis com as diferentes linhagens genéticas e variantes antigênicas do RABV de modo semelhante ao descrito no item 3.2.3. Nas reações foram empregados *primers* (senso 1 LN34, senso 2 LN34 e antissenso LN34) e sonda de hidrólise LN34 conforme descritos no Quadro 5, sendo os *primers* na concentração de 10µM, e a sonda com concentração de 5µM. As reações continham controle negativo (água ultrapura) e controle positivo (vírus fixo CVS), e todas as amostras foram feitas em duplicata.

#### 3.2.4.2. RT-qPCR *one-step* com ensaio LN34

A RT-qPCR *one-step* com o ensaio LN34 foi realizada utilizando o kit *AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents* (Applied Biosystems™) e placa de 96 orifícios *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate* que foi vedada com *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems™). Para o *mix* foi adicionado 12,5µL de 2X RT-PCR Buffer, 1µL 25X RT-PCR Enzyme Mix, 0,5µL *primer* senso 1 LN34, 0,5µL *primer* senso 2 LN34, 1 µL de *primer* antissenso LN34 (todos os *primers* na concentração

de 10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de sonda LN34 na concentração de 5  $\mu$ M (Quadro 5), 6,5 $\mu$ L de água ultrapura e 2 $\mu$ L de RNA (item 3.2.1), totalizando 25 $\mu$ L de reação.

Posteriormente, a placa foi colocada no aparelho de PCR em tempo real 7500 *Real-Time PCR*, e submetida aos ciclos de temperaturas descritos no Quadro 6. As reações continham controle negativo (água ultrapura) e controle positivo (vírus fixo CVS), e todas as amostras foram feitas em duplicata. Os resultados foram analisados no 7500 *Software Applied Biosystems*™, e as amostras que apresentaram ciclo de quantificação (Cq) menor que 35, foram consideradas positivas; Cq entre 35 e 40 foi considerado inconclusivo. E as amostras eram consideradas negativas quando o Cq era maior que 40.

Quadro 5 – Sequência de *primers* e sonda utilizados nos ensaios de RT-qPCR LN34 *two-steps* e *one-step* para detecção do RABV.

<b>Primers/sonda</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Região*</b>
Primer 1 LN34	senso	ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA	1-24
Primer 2 LN34	senso	ACGCTTAACAACAAAATCADAGAAG	1-25
Primer LN34	antissenso	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC	140-164
Sonda LN34	-	(FAM) AA+C+ACCY+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	59-75

As bases modificadas com *locked nucleic acid* (LNA) são indicadas pelo símbolo “+” na sequência da sonda LN34. Os códigos dos nucleotídeos degenerados estão de acordo com normas da IUPAC (D: A ou G ou T; M: A ou C; Y: C ou T; R: A ou G). A sonda é marcada com *reporter* FAM na porção 5', e *quencher* BHQ1 na porção 3'.

\*A região de hibridização dos *primers* e sonda é em relação ao genoma completo do *Lyssavirus* (WADHWA, *et al.*, 2017).

Quadro 6 – Condições de temperatura e tempo para cada ciclo da PCR em tempo real *one-step* no aparelho de qPCR 7500 *Real-Time PCR*.

<b>Etapas do programa</b>	<b>Número de Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Transcrição reversa	1 ciclo	50°C	30 minutos
Inativação da transcriptase reversa/Desnaturação	1 ciclo	95°C	10 minutos
Amplificação	45 ciclos	95°C	15 segundos
		56°C	30 segundos

### 3.2.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

A PCR convencional foi realizada utilizando os *primers* Início e P784 (Quadro 2), gerando um fragmento de, aproximadamente, 805 pares de base que contempla a região *leader* 3' e parte inicial do gene que codifica a nucleoproteína. A PCR convencional foi realizada utilizando o kit *Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen® Life Technologies)*, seguindo o protocolo do fabricante.

A reação, com volume final de 50 $\mu$ L, continha 5 $\mu$ L de cDNA (item 3.2.2.1), 5 $\mu$ L de 10X PCR Buffer -Mg, 8 $\mu$ L de dNTP (dATP, dTTP, dTTG, dTTC) na concentração de 1,25mM, 2,5 $\mu$ L de *primer* senso Início, 2,5 $\mu$ L de *primer* antissenso P784 (Quadro 2), ambos os *primers* na concentração de 10 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> na concentração de 50mM, 0,5 $\mu$ L de *Platinum Taq DNA Polymerase* e 24 $\mu$ L de água ultrapura. Posteriormente, o *mix* da reação foi colocado em um termociclador (*XP Cycler, Bioer Technology*) e submetido as condições de tempo e temperatura que estão descritas no Quadro 7. O produto de PCR foi armazenado em freezer -20°C até o momento de uso.

Quadro 7 – Condições de tempo e temperatura, e número de ciclos para a amplificação pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.

<b>Etapas do programa</b>	<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Desnaturação	1 ciclo	94°C	5 minutos
Desnaturação	35 ciclos	94°C	45 segundos
Hibridização	35 ciclos	55°C	45 segundos
Extensão	35 ciclos	72°C	2 minutos
Extensão	1 ciclo	72°C	10 minutos

### 3.2.6. Eletroforese em gel de agarose

Para analisar o produto amplificado da PCR, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose. Para tal análise, foram produzidos géis de agarose a 1%. O gel foi preparado utilizando 0,5g de agarose e 50mL de tampão TBE –Tris-Borato-EDTA – (Thermo Fisher Scientific) na concentração de 1x.

O gel foi, então, posicionado em uma cuba de eletroforese horizontal *Loccus LCH – 13x15* (Loccus Biotecnologia®) contendo o tampão de corrida TBE 1X com brometo de etídeo na concentração de 0,45mg/mL. Para fazer a aplicação da amostra no gel, foi misturado 4 $\mu$ L de produto de PCR (item 3.2.5) com 1 $\mu$ L de *BlueJuice™ Gel Loading Buffer 10X* (*Invitrogen® Life Technologies*).

A corrida eletroforética foi feita utilizando uma fonte de energia (LPS 300V - Loccus Biotecnologia®) conectado a cuba de eletroforese, com tensão elétrica de 200V, corrente elétrica de 240mA e 70W de potência elétrica durante 30 minutos. O gel pôde ser revelado em um transiluminador com luz UV (*UVP Benchtop UV Transilluminator*), e as bandas formadas foram comparadas com um marcador de

tamanho padrão em pares de base 100 bp *DNA Ladder* (Invitrogen® Life Technologies).

### **3.2.7. Purificação do produto de PCR**

#### **3.2.7.1. Purificação indireta do produto de PCR**

A purificação a partir do gel de agarose foi realizada para as amostras que, no ensaio de eletroforese em gel de agarose (item 3.2.6), apresentaram bandas inespecíficas (espúrias) com diferentes tamanhos de fragmentos, além da banda específica para o RABV. A banda específica (amplicon de aproximadamente 805 pares de base de tamanho) foi recortada do gel de agarose com auxílio de um bisturi estéril. Posteriormente, foi utilizado o kit de purificação *GFX PCR DNA gel band purification* (GE Healthcare Bio-Sciences) conforme as instruções do fabricante. O produto de PCR purificado foi armazenado em freezer -20°C até o momento de uso.

#### **3.2.7.2. Purificação direta do produto de PCR**

A purificação direta do produto de PCR foi realizada para as amostras que não apresentaram banda espúria na corrida de eletroforese em gel de agarose (item 3.2.6). Para realização dessa reação, foi utilizado o kit *GFX PCR DNA gel band purification* (GE Healthcare Bio-Sciences) conforme as instruções do fabricante. O produto de PCR purificado foi armazenado em freezer -20°C até o momento de uso.

### **3.2.8. Sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger**

Com o intuito de comprovar a identidade viral das amostras foi realizado o sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger.

A reação de sequenciamento dos produtos de PCR purificados (item 3.2.5) foi realizada segundo o método enzimático de terminação em cadeia com *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Essa reação foi realizada em termociclador (*BIOER XP Cycler*) com volume final de 10µL, composta de 4µL de *BigDye v3.1*, 1µL de oligonucleotídeo iniciador (senso ou antissenso) na concentração de 3,2µM, 1µL do PCR purificado e 4µL de água ultrapura. Foram

feitas reações independentes para o *primer* senso Início e para o *primer* antissenso P784 para cada amostra (Quadro 2).

As condições de tempo e temperatura para os ciclos foram as seguintes: 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, com temperatura de rampa de 1°C por segundo entre cada etapa. A seguir, a purificação da reação de sequenciamento foi realizada por *Sephadex™ G-50 fine* (GE Healthcare Bio-Sciences), em placas com filtro Multiscreen HV com 96 orifícios. Após essa etapa, as sequências de DNA foram determinadas pelo sequenciador automático *SeqStudio Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.2.9. Análise e confirmação da identidade genética das sequências geradas pelo sequenciamento por método de Sanger**

Para cada um dos nucleotídeos nos eletroferogramas gerados para as sequências senso e antissenso de cada amostra foram atribuídos escores pelo aplicativo *Phred* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), sendo utilizadas as posições que apresentaram nucleotídeos com índice maior que 20.

Os nucleotídeos com índice *Phred* igual ou menor a 20 foram conferidos manualmente com o programa *Chromas* versão 2.31 (© 1998-2002 Technesium Pty LTD) para busca de erros de interpretação e discrepâncias entre as fitas sequenciadas.

A sequência dos nucleotídeos consenso final de cada amostra foi obtida com o aplicativo CAP-contig do programa *Bioedit* versão 7.0.5.3 (© 1997-2001 Tom Hall), sendo a mesma submetida ao *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool*) para confirmação do sequenciamento, onde foi possível relacionar a porcentagem de identidade as sequências encontradas neste estudo com aquelas que estão em um banco de dados (GenBank).

---

RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. AMOSTRAS TIPIFICADAS

Do total geral de amostras 98,8% (320/324) foram tipificadas, ou por RT-PCR convencional seguido pelo sequenciamento pelo método de Sanger, ou imunofluorescência indireta (IFI), ou utilizando a técnica de RT-qPCR com ensaio específico para determinada variante antigênica (Quadro 8).

Quadro 8 – Relação da quantidade de variante antigênica ou linhagem genética do RABV tipificadas para a realização do presente estudo.

Variante antigênica*/ Linhagem genética	Técnica	Qntd. de amostras
AgV1 (cão doméstico)	IFI	4
	IFI/ Sequenciamento	5
AgV2 (cão doméstico)	IFI	5
	IFI/ Sequenciamento	5
AgV3 ( <i>Desmodus rotundus</i> )	RTq-PCR	130
	Sequenciamento	15
<i>Tadarida</i> spp.	Sequenciamento	16
<i>Lasiurus</i> spp.	Sequenciamento	10
<i>Callithrix jacchus</i>	Sequenciamento	15
<i>Cerdocyon thous</i>	Sequenciamento	29
<i>Eptesicus</i> spp.	Sequenciamento	19
<i>Histiotus</i> spp.	Sequenciamento	7
<i>Molossus</i> spp.	Sequenciamento	1
<i>Myotis</i> spp.	Sequenciamento	16
<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenciamento	43
Total		320

\*Amostras compatíveis geneticamente; AgV1: Variante antigênica 1; AgV2: Variante antigênica 2; AgV3: Variante antigênica 3; IFI: Imunofluorescência indireta; RT-qPCR: transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; Qntd.: quantidade.

#### 4.1.1. Isolados caracterizados como compatíveis com a variante antigênica 1 (AgV1) do RABV

Nove amostras de cão isoladas em SNC de camundongos foram caracterizadas antigênica e geneticamente como compatíveis com a variante antigênica 1 (AgV1) do RABV. Cinco foram tipificadas pela IFI e sequenciamento pelo método de Sanger (item 3.2.8), enquanto as outras quatro foram tipificadas utilizando apenas a IFI (Anexo B).

#### **4.1.2. Isolados caracterizados como compatíveis com a variante antigênica 2 (AgV2) do RABV**

Dez amostras, três provenientes de gato e sete de cão, isoladas em SNC de camundongos foram caracterizadas antigênica e geneticamente como compatíveis com a variante antigênica 2 (AgV2) do RABV. Cinco dessas amostras foram tipificadas pela IFI e/ou sequenciamento pelo método de Sanger (item 3.2.8), e as outras cinco utilizando a IFI (Anexo B).

#### **4.1.3. Amostras clínicas caracterizadas como compatíveis geneticamente com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV**

Cento e trinta e cinco amostras clínicas de SNC, sendo elas provenientes de diferentes espécies animais: bovinos *Bos taurus* (n=70), equinos *Equus ferus caballus* (n=17), ovinos *Ovis aries* (n=7), morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (n=5), morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* (n=24), morcegos frugívoros *A. planirostris* (n=2), capivaras *Hydrochoerus hydrochaeris* (n=3), gatos domésticos *Felis catus* (n=2), cães domésticos *Canis lupus familiaris* (n=3), cervídeo sem espécie identificada (n=1), e primata não humano *Callithrix penicillata* (n=1), foram caracterizadas geneticamente como compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV. Dessas amostras, 124 foram tipificadas utilizando a técnica de RT-qPCR específica para detecção de amostras compatíveis com a AgV3 (item 3.2.3) e o restante (n=11) foi submetido ao sequenciamento pelo método de Sanger (item 3.2.8) para a determinação da identidade nucleotídica (Anexo A).

Dez amostras isoladas em SNC de camundongos, sendo elas provenientes de diferentes espécies animais: morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (n=3), morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* (n=5), gato doméstico *Felis catus* (n=1) e primata não humano sem identificação da espécie (n=1), foram tipificadas geneticamente como compatíveis com AgV3. Dessas amostras, seis foram tipificadas utilizando a técnica de RT-qPCR específica para detecção de amostras compatíveis com a AgV3 (item 3.2.3) e o restante (n=4) foi submetido ao sequenciamento pelo método de Sanger (item 3.2.8) para a determinação da identidade nucleotídica (Anexo B).

#### **4.1.4. Amostras caracterizados como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Tadarida* spp.**

Oito amostras clínicas (Anexo A) e oito isolados em SNC camundongos (Anexo B), provenientes de morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* (n=2), morcego insetívoro *Myotis albescens* (n=1), e de morcegos sem a identificação da espécie (n=13), foram tipificadas geneticamente pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8) como compatíveis com a linhagem isoladas nos morcegos insetívoros *Tadarida* spp.

#### **4.1.5. Amostras caracterizados como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Lasiurus* spp.**

Sete amostras clínicas (Anexo A) e três isolados em camundongos (Anexo B), provenientes de morcego insetívoro *Lasiurus blossevillii* (n=1), morcego insetívoro *Eumops glaucinus* (n=1), e de morcegos sem a identificação da espécie (n=8), foram tipificadas geneticamente pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8) como compatíveis com a linhagem isolada nos morcegos insetívoros *Lasiurus* spp.

#### **4.1.6. Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada em *Callithrix jacchus***

Catorze amostras clínicas (Anexo A) e um isolado em camundongos (Anexo B), todas provenientes da espécie de primata não humano sagui-de-tufo-branco, foram tipificadas pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8) como compatíveis com a linhagem genética isolada em sagui-de-tufo-branco *Callithrix jacchus*.

#### **4.1.7. Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada em *Cerdocyon thous***

Vinte e oito amostras isoladas em SNC de camundongos (Anexo B), e uma amostra clínica (Anexo A), provenientes de diferentes espécies animais: cão (n=11), “raposa” *Cerdocyon thous* (n=14), bovino *Bos taurus* (n=1), caprino *Capra aegagrus hircus* (n=1), gato *Felis catus* (n=1) e guaxinim *Procyon sp.* (n=1), foram tipificadas

pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8) como compatíveis com a linhagem genética isolada em cachorro-do-mato *Cerdocyon thous*.

#### **4.1.8. Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Eptesicus* spp.**

Nove amostras clínicas (Anexo A) e dez isoladas em SNC de camundongos (Anexo B), provenientes de diferentes espécies animais: morcego insetívoro *Eptesicus furinalis* (n=10), morcego insetívoro *Myotis nigricans* (n=1), morcego insetívoro *M. albescens* (n=1), morcegos sem a identificação da respectiva espécie (n=6) e lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (n=1), foram tipificadas pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8) como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Eptesicus* spp.

#### **4.1.9. Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Histiotus* spp.**

Duas amostras clínicas e cinco isoladas em SNC de camundongos, provenientes de morcego insetívoro *Histiotus velatus* (n=1), e de quirópteros sem a respectiva identificação da espécie (n=6), foram tipificadas pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8) como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Histiotus* spp. (Anexo A; Anexo B).

#### **4.1.10. Amostra caracterizada como compatível com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Molossus* spp.**

Apenas uma amostra clínica, proveniente de quiróptero sem identificação da espécie, foi tipificada como compatível com linhagem genética isolada em morcegos insetívoros *Molossus* spp. pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8) (Anexo A).

#### **4.1.11. Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Myotis* spp.**

Sete amostras clínicas (Anexo A) e nove isoladas em SNC de camundongos (Anexo B), provenientes de morcego insetívoro *Myotis nigricans* (n=6), morcego insetívoro *M. albescens* (n=4), e de morcegos com a espécie não identificada (n=6), foram tipificadas como compatíveis com a linhagem genética isolada em morcegos insetívoros *Myotis* spp. pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8).

#### **4.1.12. Amostras caracterizadas como compatíveis com a linhagem genética isolada nos morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp.**

Vinte e três amostras clínicas (Anexo A) e vinte isoladas em SNC de camundongos (Anexo B), provenientes de diferentes espécies animais: “raposa” *Cerdocyon thous* (n=1), primata não humano sem espécie identificada (n=1), morcego insetívoro *Nyctinomops laticaudatus* (n=11), morcego insetívoro *N. macrotis* (n=2), morcego insetívoro *Eptesicus furinalis* (n=1), e morcegos sem a espécie identificada (n=27), foram tipificadas como compatíveis com a linhagem genética isolada em morcegos insetívoros *Nyctinomops* spp. pela técnica de sequenciamento de Sanger (item 3.2.8).

## **4.2. AMOSTRAS NÃO TIPIFICADAS**

Do total geral de amostras apenas 1,2% (4/324) não foram tipificadas, sendo elas provenientes tanto de amostragem clínica, quanto de amostras isolados em SNC de camundongos.

Das amostras clínicas sem tipificação (n=3), todas são provenientes da espécie de morcego insetívoro *Eptesicus furinalis* (Anexo A).

A amostra isolada em camundongo que não foi tipificada (n=1), é proveniente de amostra de morcego sem classificação morfométrica (Anexo B).

#### 4.3. RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR) COM O ENSAIO LN34 PAN-*Lyssavirus*

##### 4.3.1. RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus two-steps*

###### 4.3.1.1. RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus two-steps* utilizando cDNA sintetizado seguindo o item 3.2.2.1

Quando realizada a RT-qPCR com o ensaio LN34 utilizando o cDNA sintetizado com os *primers* senso Início e antissenso 304, foi observado a confirmação da positividade em 87,3% (283/324) amostras, sendo que 185 são amostras clínicas (item 3.1.1) e 98 são amostras isoladas em camundongo (item 3.1.2).

Do total de amostras que tiveram resultado negativo ou inconclusivo [12,7%(41/324)], 25 são provenientes de amostras clínicas (item 3.1.1) e 16 são originadas de amostras isoladas em sistema nervoso de camundongo (item 3.1.2). Além disso, essas amostras são de diferentes espécies animais e são compatíveis com diferentes linhagens genéticas ou variantes antigênicas, a saber: uma compatível com AgV1, três compatíveis com AgV2, seis compatíveis com *Desmodus rotundus*, seis compatíveis com *Cerdocyon thous*, cinco compatíveis com *Eptesicus spp.*, duas compatíveis com *Histiotus spp.*, três compatíveis com *Myotis spp.*, onze compatíveis com *Nyctinomops spp.*, e quatro amostras não apresentam tipificação (Quadro 9).

Quadro 9 – Relação das amostras, de acordo com o tipo (clínica ou isolado em sistema nervoso de camundongo) e a tipificação genética, que apresentaram resultado falso negativo quando testadas na técnica RT-qPCR LN34 *Pan-Lyssavirus two steps* utilizando cDNA sintetizado conforme com os *primers* início e 304.

Tipo	Amostra	Tipificação	Tipo	Amostra	Tipificação
Isolado	7008-v/2008	AgV1	Clínica	182410000357	<i>Nyctinomops</i> spp.
Isolado	7855-v/2009	<i>C. thous</i>	Clínica	182410000404	<i>Nyctinomops</i> spp.
Isolado	7857-v/2009	AgV2	Clínica	182410000434	<i>Nyctinomops</i> spp.
Isolado	5048-v/2010	AgV2	Clínica	182410000435	<i>D. rotundus</i>
Isolado	5053-v/2010	<i>C. thous</i>	Clínica	182410000485	<i>Nyctinomops</i> spp.
Isolado	1081-v/2011	AgV2	Clínica	182410000536	NT
Isolado	2352-v/2013	NT	Clínica	182410001421	<i>Nyctinomops</i> spp.
Isolado	3337-v/2014	<i>Eptesicus</i> spp.	Clínica	190108002070	<i>D. rotundus</i>
Isolado	4183-v/2014	<i>C. thous</i>	Clínica	190108002622	<i>D. rotundus</i>
Isolado	4184-v/2014	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	190108005270	<i>C. thous</i>
Isolado	141-v/2015	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	191733000130	<i>Eptesicus</i> spp.
Isolado	1064-v/2015	<i>Histiopus</i> spp.	Clínica	191733000142	<i>Myotis</i> spp.
Isolado	1068-v/2015	<i>Histiopus</i> spp.	Clínica	191733000439	NT
Isolado	2551-v/2015	<i>C. thous</i>	Clínica	191733000463	<i>Eptesicus</i> spp.
Isolado	2915-v/2015	<i>C. thous</i>	Clínica	191733000614	<i>Eptesicus</i> spp.
Isolado	2237-v/2016	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	191733000749	<i>D. rotundus</i>
Clínica	180108001687	<i>Eptesicus</i> spp.	Clínica	191733000860	<i>D. rotundus</i>
Clínica	181733000107	<i>Myotis</i> spp.	Clínica	192410000301	NT
Clínica	181733000306	<i>Myotis</i> spp.	Clínica	192410000310	<i>Nyctinomops</i> spp.
Clínica	182410000325	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	192410000335	<i>Nyctinomops</i> spp.
			Clínica	200108000121	<i>D. rotundus</i>

NT: não apresenta tipificação; AgV1: Variante antigênica 1; AgV2: Variante antigênica 2.

#### 4.3.1.2. RT-qPCR LN34 *Pan-Lyssavirus two-steps* utilizando cDNA sintetizado seguindo o item 3.2.2.2

As amostras que apresentaram resultado negativo ou inconclusivo no item 4.3.1.1 (Quadro 9) [12,7%(41/324)], foram testadas na RT-qPCR *two-steps* com ensaio LN34 *Pan-Lyssavirus* utilizando cDNA sintetizado de acordo com o item 3.2.2.2.

Do total de amostras testadas neste ensaio (n=41), apenas 7 apresentaram resultado positivo, e 34 continuaram apresentando resultado falso negativo.

As amostras que continuaram apresentando resultado negativo (n=34) são compatíveis com diferentes linhagens genéticas ou variantes antigênicas, a saber: uma compatível com AgV1, duas compatíveis com AgV2, cinco compatíveis com *D. rotundus*, duas compatíveis com *Cerdocyon thous*, cinco compatíveis com *Eptesicus* spp., uma compatível com *Histiopus* spp., três compatíveis com *Myotis* spp., onze

compatíveis com *Nyctinomops* spp., e quatro amostras não apresentam tipificação (Quadro 10).

Quadro 10 – Relação das amostras, de acordo com o tipo (clínica ou isolado em sistema nervoso de camundongo) e a tipificação genética, que apresentaram resultado falso negativo quando testadas na técnica RT-qPCR *two steps* utilizando cDNA sintetizado com os *primers* início e P784.

Tipo	Amostra	Tipificação	Tipo	Amostra	Tipificação
Isolado	7008-v/2008	AgV1	Clínica	182410000434	<i>Nyctinomops</i> spp.
Isolado	7857-v/2009	AgV2	Clínica	182410000435	<i>D. rotundus</i>
Isolado	1081-v/2011	AgV2	Clínica	182410000485	<i>Nyctinomops</i> spp.
Isolado	2352-v/2013	NT	Clínica	182410000536	NT
Isolado	3337-v/2014	<i>Eptesicus</i> spp.	Clínica	182410001421	<i>Nyctinomops</i> spp.
Isolado	4184-v/2014	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	190108002070	<i>D. rotundus</i>
Isolado	141-v/2015	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	190108002622	<i>D. rotundus</i>
Isolado	1068-v/2015	<i>Histiotus</i> spp.	Clínica	191733000130	<i>Eptesicus</i> spp.
Isolado	2551-v/2015	<i>C. thous</i>	Clínica	191733000142	<i>Myotis</i> spp.
Isolado	2915-v/2015	<i>C. thous</i>	Clínica	191733000439	NT
Isolado	2237-v/2016	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	191733000463	<i>Eptesicus</i> spp.
Clínica	180108001687	<i>Eptesicus</i> spp.	Clínica	191733000614	<i>Eptesicus</i> spp.
Clínica	181733000107	<i>Myotis</i> spp.	Clínica	191733000749	<i>D. rotundus</i>
Clínica	181733000306	<i>Myotis</i> spp.	Clínica	191733000860	<i>D. rotundus</i>
Clínica	182410000325	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	192410000301	NT
Clínica	182410000357	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	192410000335	<i>Nyctinomops</i> spp.
Clínica	182410000404	<i>Nyctinomops</i> spp.	Clínica	192410000310	<i>Nyctinomops</i> spp.

NT: não apresenta tipificação; AgV1: Variante antigênica 1; AgV2: Variante antigênica 2.

#### 4.3.2. RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus one-step

Todas as amostras de RNA [n=324 (item 3.2.1)] foram testadas no ensaio de RT-qPCR *one-step* (item 3.2.4.2), e 100% apresentaram resultado verdadeiro positivo.





## 5. DISCUSSÃO

A raiva, sendo uma doença com elevada letalidade (próxima a 100%), apresenta necessidade de técnicas de diagnóstico que sejam altamente sensíveis, específicas e fidedignas, uma vez que os resultados positivos podem servir para ajudar a controlar focos da doença e adoção bem-sucedida da profilaxia pós-exposição em pacientes que sofreram agravos pelos animais agressores. Segundo a OMS e a OIE, o padrão ouro para diagnóstico da raiva é a IFD, porém em algumas situações, pode apresentar resultados inconclusivos ou mesmo falsos negativos (CENTOAMORE et al., 2020).

Como prova confirmatória à IFD, ao longo dos anos, tem sido utilizada técnicas “multiplicadoras”, como isolamento viral em camundongos (IVC) e isolamento viral em cultura de células (IVCC) (CDC, 2011). No entanto, por diversas razões, os laboratórios da rede de diagnóstica de raiva no Brasil e na América Latina tem encontrado dificuldades na implantação e manutenção destas metodologias como prova diagnóstica<sup>1</sup>.

Por razões éticas, demora na obtenção dos resultados e alto custo; o uso de animais de laboratório como técnica diagnóstica da raiva deve ser descontinuado e métodos alternativos validados devem ser implantados (CASTILHO et al., 2007; BONES et al., 2015). Já o IVCC como técnica confirmatória à IFD tem sido adotado com sucesso em alguns laboratórios da rede diagnóstica no Brasil, com vantagens em relação ao IVC, tais como menor custo, menor espaço das instalações e rapidez na obtenção dos resultados (CASTILHO et al., 2007; CORONA et al., 2018). No entanto, tem-se observado em algumas situações problemas na execução da técnica de IVCC que poderiam influenciar nos resultados obtidos, tais como: discordâncias de resultados com aqueles obtidos pela IFD, sensibilidade reduzida em amostras com baixa carga viral com resultados falso-negativos, resultados inconclusivos, perda da viabilidade viral ou mesmo citotoxicidade em amostras armazenadas em condições inadequadas (CENTOAMORE et al., 2016).

As técnicas moleculares, como RT-PCR convencional seguido do sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger, tem sido utilizada como testes confirmatórios dos resultados da IFD conforme descrito pela OMS (OIE, 2018; WHO,

---

<sup>1</sup>Comunicação pessoal PqC do Instituto Pasteur Dr. Enio Mori.

2018). Todavia, essas provas apresentam limitações metodológicas. A RT-PCR convencional está propensa a ação de inibidores durante o processo de extração de RNA (gerando resultados falso-negativos) ou a contaminações nas reações cruzadas com produto amplificado (resultando em resultados falso-positivos). Dentre os principais inibidores da amplificação de ácidos nucleicos que geralmente são introduzidos durante o processo de extração do RNA, cujo os resquícios podem atuar diretamente na enzima DNA polimerase na PCR: 1) solventes orgânicos fenol e clorofórmio (são inibidores da ação enzimática); 2) proteinase-K (podem causar degradação da enzima); 3) EDTA (quelante dos íons  $MgCl_2$  - que é importante cofator para ação enzimática) (GREEN, 2012).

Para minimizar os resultados falso-positivos, faz-se o sequenciamento nucleotídico com intuito de descartar contaminação cruzada do produto amplificado por meio da confirmação da identidade viral (MACEDO et al., 2006). É importante ressaltar que essa associação das técnicas de RT-PCR e sequenciamento nucleotídico são metodologias laboriosas e demoradas (CENTOAMORE et al., 2020).

Por outro lado, o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus one step* apresenta dois controles: 1) a beta actina, que funcionaria como controle de extração, o que pode reduzir o número de resultados falso-negativos; 2) o RNA artificial que serve como substitutivo para os controles positivos convencionais, pela possibilidade de monitorar riscos de contaminações cruzadas (HOFFMANN et al., 2010; WADHWA et al., 2017). Como o ensaio descrito por Wadhwa et al. (2017) utiliza sonda de hidrólise do tipo LNA, não há necessidade de etapas posteriores, como a curva de *melting* preconizada nas reações com fluoróforos intercalantes tipo SYBR Green, pois as características intrínsecas desta sonda juntamente com o *Locked Nucleic Acid*, garantem a especificidade da reação (WADHWA et al., 2017; SIGMA-ALDRICH, 2021b).

A tipificação prévia das amostras durante esse trabalho se deu importância pois foi necessário confirmar a universalidade do ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* para analisar a capacidade do mesmo em detectar e amplificar as diferentes variantes antigênicas e linhagens genéticas do RABV presentes no Brasil (WADHWA et al., 2017; WHO, 2018)

Vale salientar que este é o primeiro estudo avaliando o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* utilizando as diferentes linhagens genéticas e variantes antigênicas

presentes no Brasil. Em trabalhos publicados anteriormente, para o painel de validação do ensaio de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, apenas foram utilizadas duas variantes presentes no Brasil, sendo elas compatíveis com aquelas isoladas em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (AgV3) e em canídeos domésticos (AgV2) (WADHWA et al., 2017).

A variante antigênica 1 (AgV1), isolada de cão doméstico, não é circulante no Brasil, sendo os casos aqui presentes resultado de surtos em países vizinhos, como por exemplo na Bolívia. Esta variante foi introduzida no país no ano de 2006, quando foi identificada pela primeira vez no município de Corumbá – MS (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011; BRASIL, 2021). Os nove isolados de cães utilizados neste trabalho e compatíveis com a AgV1 (IFI e/ou sequenciamento pelo método de Sanger para a caracterização viral) são provenientes das cidades de Corumbá e Ladário, no estado do Mato Grosso do Sul, municípios próximos da fronteira entre Brasil e Bolívia (Anexo B).

No ano de 2015 ocorreu um surto de raiva canina, compatível com a variante antigênica 1 (AgV1), no estado do Mato Grosso do Sul, especificamente nos municípios de Corumbá e Ladário. Além do mais, foram registrados treze casos de cães positivos para raiva na região de fronteira entre o Brasil e Bolívia nos anos anteriores (2006, 2007, 2008, 2009 e 2012), evidenciando uma circulação prévia desta variante antes da epizootia de 2015 (GALHARDO et al., 2019).

Na epizootia de raiva canina ocorrida no Mato Grosso do Sul em 2015, com o registro de 71 cães infectados, foi registrado um óbito humano causada por raiva compatível com a AgV1 (BRASIL, 2021). Sabe-se que a raiva canina ocasionada por essa variante, ainda é considerada endêmica na região fronteira Bolívia e Brasil (GALHARDO et al., 2019), o que justifica a necessidade e importância de se realizar monitoramento da raiva nessa região, e o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus*, pela característica intrínseca de poder identificar as diferentes variantes antigênicas do RABV e de ser de fácil manuseio e implementação, poderia servir como ferramenta de vigilância laboratorial nesses locais.

O registro de raiva em cães domésticos causada pela variante antigênica 2 (AgV2), apresentou uma queda significativa no Brasil após o início da campanha de vacinação profilática em cães e gatos na década de 1970 pelo Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR), que teve como objetivo controlar o número de casos de raiva humana.

Segundo os dados do Ministério da Saúde, de 2015 a 2020 foram registrados 135 casos de cães domésticos com raiva no país. Além disso, entre os anos 2010 e 2020 ocorrem nove casos de raiva humana por agravo de cães no Brasil, sendo que os últimos registros de mortes humanas foram no ano de 2013 (GALHARDO et al., 2019; BRASIL, 2021). Os dez isolados compatíveis com AgV2 (sete canídeos e três felídeos) utilizados nesse trabalho são originados da região Nordeste do Brasil, sendo três amostras provenientes do Estado do Maranhão, cinco de Pernambuco, uma da Paraíba, e uma do Rio Grande do Norte (Anexo B).

Como existe uma concentração no Nordeste de casos de raiva em cães domésticos, é de importância epidemiológica o desenvolvimento de técnicas mais exequíveis como RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, quando comparadas à IFD, que possam ser implantadas nos laboratórios diagnósticos regionais. Além do mais, a ausência de casos registrados pode ser consequência da falta de vigilância, ou seja, subnotificação de casos.

A linhagem genética compatível com isolado do cão selvagem *Cerdocyon thous*, predominantemente concentrada na região Nordeste, ainda é encontrada em casos recentes de raiva humana no país (BRASIL, 2021). Além do mais, os cães selvagens podem interagir com animais domésticos, conforme mostrado no ciclo epidemiológico (ACHA; SZYFRES, 2003), aumentando a probabilidade de agravo em humanos (KOTAIT et al., 2007). O caso de óbito humano por raiva transmitida por cão selvagem mais recente no Brasil aconteceu no ano de 2020 no município de Riacho dos Cavalos, no estado da Paraíba (BRASIL, 2021).

Todas as amostras coletadas para esse estudo, provenientes de diversas espécies e compatíveis com a linhagem genética do cão selvagem *C. thous*, são originadas de diferentes estados da região Nordeste do Brasil, a saber: uma amostra do Maranhão, sete do Ceará, cinco de Pernambuco, 13 da Bahia, uma de Sergipe, e duas do Rio Grande do Norte (Anexo A; Anexo B).

Com o passar dos anos, o perfil epidemiológico da raiva no país apresentou uma mudança, isto porque entre os anos 2000 e 2009 foi observado um aumento no número de casos causados por quirópteros no Brasil (morcegos hematófagos nas áreas rurais, e morcegos não-hematófagos em áreas urbanas) (FAVORETTO et al., 2002; WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011; VARGAS; ROMANO; MERCHÁN-HAMANN, 2019; BRASIL, 2021).

Carini (1911) foi o primeiro a propor que a raiva que acometia bovinos, em Santa Catarina, estava sendo transmitida por morcegos hematófagos. Diaz et al. (1994) já apontavam que os morcegos se tornariam de grande importância para a saúde pública. A partir de 2004, os morcegos foram considerados o principal animal transmissor da raiva no Brasil. Desta forma, a raiva silvestre obteve uma maior atenção, uma vez que há uma tendência do aumento da circulação de animais silvestre em áreas urbanas, possivelmente devido à procura de alimento, o que aumenta o contato destes animais com os humanos (KOTAIT et al., 2007; GONÇALVES; SOARES; SANTOS, 2018).

Os casos mais recentes de raiva humana de ciclo epidemiológico secundário registrados no Brasil ocorreram nos estados da Paraíba em 2015 (um caso), Roraima em 2016 (dois casos), Pernambuco em 2017 (um caso), e Santa Catarina em 2019 (um caso). Todos foram causados por agravos de felinos, e são compatíveis com a variante isolada em morcegos hematófagos *D. rotundus* e morcegos frugívoros *A. lituratus* – AgV3 (BRASIL, 2021).

A variante antigênica 3 (AgV3) circula por todo território brasileiro, constatação possível de ser inferida por conta dos casos de raiva humana causados por essa variante ocorridos nas regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste do país (BRASIL, 2021). Entre 2004 e 2005 ocorreram dois surtos de raiva em humanos causados por agravo de morcegos hematófagos, um no estado do Pará com 38 casos, e outro em Maranhão com registro de 24 pessoas (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011; BRASIL, 2021). Recentemente, em 2018, outro surto de raiva humana transmitida por morcego *D. rotundus* aconteceu em Melgaço, no Pará, com o registro de 10 pessoas infectadas. No mesmo ano, foi registrado um caso de raiva humana, também transmitida por morcego, em Ubatuba, litoral Norte de São Paulo (BRASIL, 2021).

Além de casos de raiva humana compatíveis com a AgV3, a circulação do vírus nos morcegos hematófagos – ciclo aéreo silvestre (ACHA; SZYFRES, 2003) – tem importância econômica em relação a produção agropecuária no Brasil (ACHA; MALAGA-ALBA, 1988), pois a raiva pode causar elevado número de mortes em herbívoros domésticos (bovídeos, equídeos, ovídeos e caprídeos), como pode ser visualizado no Anexo A e no Anexo B o alto número de amostras desses animais compatíveis com a AgV3. Os herbívoros domésticos acometidos pela raiva podem servir como sentinelas para a doença, principalmente para controle o controle da

AgV3 em certas regiões, uma vez que a maioria dos casos nesses animais é compatível com essa variante (CENTOAMORE, 2017).

As amostras compatíveis com AgV3 usadas para avaliar o ensaio LN34 Pan-Lyssavirus, originadas de diferentes espécies animais (bovino *Bos taurus*, equino *Equus ferus caballus*, ovino *Ovis aries*, morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, morcego frugívoro *A. planirostris*, morcego hematófago *Desmodus rotundus*, cão doméstico *Cannis lupus familiaris*, capivara *Hydrochoerus hydrochaeris*, cervídeo sem espécie identificada, gato domésticos *Felis catus*, primata não humano *C. penicillata*, e primata não humano sem espécie identificada) são provenientes de diferentes regiões do país: Sudoeste (136 do estado de São Paulo e cinco de Minas Gerais), Centro-Oeste (uma amostra do estado de Goiás), Sul (uma amostra do Paraná), Norte (uma amostra do Acre), e Nordeste (uma amostra da Bahia) (Anexo A; Anexo B).

Com a queda dos números de casos de raiva em cães e humanos, devido aos programas de profilaxia, além dos casos registrados compatíveis com a variante antigênica isolada em morcego hematófago *D. rotundus*, os morcegos não hematófagos nas áreas urbanas passaram a apresentar importância no ciclo epidemiológico (FAVORETTO et al., 2002; VARGAS; ROMANO; MERCHÁN-HAMANN, 2019; BRASIL, 2021).

O primeiro caso de raiva causada por um morcego insetívoro *Dasypterus floridanus* (atual *Lasiurus intermedius*) foi registrado na Flórida, Estados Unidos, em 1953 (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). Em 1957, foi isolado pela primeira vez no Brasil o vírus da raiva em morcego não hematófago da espécie onívora *Phyllostomus hastatus hastatus* (SILVA; RIVELLO; NILSSON, 1961). Já o primeiro óbito humano por raiva relacionado com quiróptero não hematófago ocorreu em 1958, após mordedura por morcego insetívoro da espécie *Lasionycteris noctivagans* no estado da Califórnia, Estados Unidos.

Segundo Sodré, Gama e Almeida (2010), 41 espécies de quirópteros pertencentes a 25 gêneros e três famílias foram diagnosticadas como positivas para raiva no Brasil. Segundo este trabalho, foi detectada uma ampla diversidade em relação aos hábitos alimentares entre as espécies quirópteras positivas para raiva, a saber: 26 insetívoros, seis frugívoros, três nectarívoros, três hematófagos, dois carnívoros e um onívoro. Apesar de não haver relatos de casos de raiva humana transmitidos por variantes de morcegos não hematófagos no Brasil, uma vez que esses quirópteros se encontram nas áreas urbanas, pode haver contato com

humanos e, também, animais domésticos, faz-se necessário o aumento da vigilância laboratorial da raiva (FAVORETTO et al., 2002; ALBAS et al., 2011).

As variantes antigênicas e linhagens genéticas do RABV circulantes em morcegos insetívoros no Brasil são sete: *Tadarida brasiliensis* (AgV4) ou *Tadarida* spp., *Lasiurus cinereus* (atual *L. villosissimus*) (AgV6) ou *Lasiurus* spp., *Eptesicus* spp., *Histiotus* spp., *Molossus* spp., *Myotis* spp. e *Nyctinomops* spp. (OLIVEIRA et al., 2010; ALBAS et al., 2011; MENOZZI et al., 2017). As amostras do presente estudo que são compatíveis com as diferentes linhagens genéticas ou variantes antigênicas de morcegos insetívoros são provenientes de diversas regiões do país: Sudeste (46 amostras do estado de São Paulo, e 11 de Minas Gerais), Sul (25 amostras do Paraná; uma do Rio Grande do Sul), Centro-Oeste (oito amostras do Mato Grosso do Sul), e Nordeste (nove amostras do estado do Ceará, seis do Rio Grande do Norte, e seis da Bahia) (Anexo A; Anexo B).

A linhagem genética do RABV compatível com amostras isoladas em sagui-de-tufo-branco *Callithrix jacchus* apresenta um ancestral comum com aquelas linhagens genéticas isoladas em morcegos insetívoros (KOTAIT et al., 2019). Os dois últimos casos registrados de raiva humana provenientes de agravos de primatas não humano (PNH) ocorreram no ano de 2013 (BRASIL, 2021). Além disso, entre os anos de 2015 e 2020, foram registrados 46 casos de PNH com raiva, em diferentes estados do Brasil, a saber: 27 no Ceará, sete em Pernambuco, seis na Bahia, quatro no Piauí, um no Espírito Santo, e um no Rio de Janeiro. Em alguns lugares do Nordeste, é comum a “domesticação” de animais silvestres, o que mostra a necessidade da vigilância da doença devido à proximidade desses animais com os humanos (ARAUJO et al., 2014).

No presente estudo, das amostras compatíveis com a linhagem genética *C. jacchus*, todas são provenientes de diferentes estados do Brasil: nove do estado do Ceará, uma de Pernambuco, uma da Paraíba e quatro do Piauí (Anexo A; Anexo B). Foram coletadas o número de amostras disponíveis no Instituto Pasteur de São Paulo compatíveis com essa linhagem genética, e estes dados epidemiológicos corroboram com o que é evidenciado pelo Ministério da Saúde, que mostra a circulação dessa linhagem apenas na região Nordeste do país (BRASIL, 2021).

As amostras que não foram tipificadas, são provenientes de amostras clínicas (n=3) e amostra antiga isolada em sistema nervoso de camundongo (n=1) (Anexo A;



Anexo B), as quais podem apresentar baixa carga viral, dificultando a detecção durante o sequenciamento pelo método de Sanger.

O ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* deve ser realizado pelo método *one-step*, ou seja, a síntese de DNA complementar (cDNA) e a PCR em tempo real (qPCR) ocorrem simultaneamente, em um único “tubo”, e em um mesmo tampão de reação (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019). Em comparação com o *two-steps* (quando o cDNA é sintetizado em uma reação à parte, e uma alíquota da reação final é utilizada para a técnica de qPCR), a RT-qPCR *one-step* é mais rápida, e apresenta menor chance de contaminação, pois é realizada em apenas em tubo, o que pode reduzir os erros de pipetagem. Porém, nesta técnica só é possível a análise de apenas um gene de interesse por reação (WACKER; GODARD, 2005).

No presente experimento a síntese de cDNA também foi realizada separadamente da PCR em tempo real, demonstrando ser possível a realização dessa reação em duas etapas. A escolha da RT-qPCR *two-steps*, se justificou frente à necessidade de criar um banco de amostras, devido ao fato de que o sistema nervoso central de animais pequenos, como por exemplo quirópteros, apresenta pouco material o que poderia impossibilitar a realização de uma segunda extração de material genético caso fosse necessário.

Conforme visto nos resultados de RT-qPCR *two-steps* utilizando cDNA sintetizado com os *primers* senso Início e antissenso 304 (item 4.3.1.1), o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* foi capaz de detectar e amplificar as doze diferentes variantes antigênica e linhagens genéticas presentes no Brasil. Já os resultados falsos negativos [12,7% (41/324)], provenientes de amostras compatíveis com as linhagens genéticas isoladas em *Desmodus rotundus*, *Cerdocyon thous*, *Eptesicus spp.*, *Histiotus spp.*, *Myotis spp.*, *Nyctinomops spp.*, e variantes genéticas AgV1 e AgV2, além das amostras sem tipificação (Quadro 9), podem ter ocorrido devido a não extensão da região de interesse durante a transcrição reversa para DNA complementar.

Além disso, vale ressaltar que a maioria das amostras que apresentaram resultado falso negativo são clínicas (item 3.1.1), as quais provavelmente apresentam baixa carga viral, tornado mais difícil a detecção do vírus da raiva durante a reação de RT-qPCR.

Como a RNA polimerase RNA-dependente do RABV não apresenta atividade corretiva (KISSI et al., 1999) de inserção de bases nucleotídicas, isso pode acarretar

em mutações pontuais que acaba aumentando a variabilidade das bases entre diferentes variantes antigênicas ou linhagens genéticas, e até mesmo entre uma mesma variante antigênica/linhagem genética. Portanto, a inferência possível de ser feita, é que o *primer* senso Início, utilizado tanto na transcrição reversa (itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2), que anela no começo do genoma, apresenta *mismatches* com a sequência alvo devido ao alto número de disparidades de bases, o que impossibilita o alongamento da fita de cDNA. Dessa maneira, a técnica de LN34 Pan-Lyssavirus *two-steps* não funcionaria para algumas amostras, pois os *primers* senso e antissenso deste ensaio anelam na região não codificante 3' *leader* e no começo do gene da nucleoproteína, respectivamente (Figura 3). Isso poderia diminuir a concentração da região alvo para o ensaio LN34 Pan-Lyssavirus e, conseqüentemente, diminuir a eficiência da técnica de PCR em tempo real. Além disso, mesmo utilizando outro *primer* antissenso para realização da transcrição reversa (*primer* P784), ainda foi possível observar trinta e quatro amostras com resultados falso-negativos na técnica de RT-qPCR *two-steps* com o ensaio LN34 Pan-Lyssavirus (item 4.3.1.2).

A enzima promotora de reação de transcrição reversa do kit *Super Script II Reverse Transcriptase*, proveniente do vírus *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV), é capaz de copiar 12 mil bases durante a técnica de transcrição reversa (INVITROGEN, 2021), o que mostra que a dificuldade da técnica possivelmente não se encontra na quantidade de bases que a enzima é capaz de alongar.

Do total de amostras que obtiveram resultado falso negativo no item 4.3.1.1, 70,7% (29/41) (Anexo A; Anexo B) foram sequenciadas pelo método de Sanger. As sequências nucleotídicas foram editadas, conforme o item 3.2.9, e alinhadas no programa *BioEdit* com a sequência completa do vírus fixo *Pasteur Virus*, para análise *in silico*. Porém não foi possível provar que há alta variabilidade genética no começo do genoma dessas amostras, pois o sequenciamento não contempla a região *leader* 3' (Anexo C).

O *primer* senso 21G utilizado para sequenciamento das amostras 7855-v/2009, 5053-v/2010, 1081-v/2011, 4183-v/2014, 141-v/2015, 1064-v/2015, 1068-v/2015, 2551-v/2015, e 2915-v/2015, anela na posição 55 – 73 do genoma (ORCIARI et al., 2001), ou seja, no final da região *leader* e no começo do gene da nucleoproteína (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011), deste modo se perde o começo do genoma no sequenciamento. Isso também vale para as amostras que

foram sequenciadas com o *primer* senso Início (3337-v/2014, 4184-v/2014, 2237-v/2016, 180108001687, 181733000306, 182410000325, 182410000357, 182410000404, 182410000434, 182410000485, 182410001421, 190108005270, 191733000107, 191733000130, 191733000142, 191733000463, 191733000614, 191733000749 192410000310, e 192410000335), que apesar de ser um oligonucleotídeo iniciador que anela nas 22 primeiras bases do genoma do RABV (CAMPOS et al., 2011), durante a análise do sequenciamento essa região não é aproveitada.

Nos bancos de dados, como o GenBank, não há sequências nucleotídicas completas das diferentes linhagens genéticas ou variantes antigênicas descritas até hoje no Brasil que complemente a região inicial do genoma do vírus da raiva na porção 3' *leader*, o que também impossibilitou a análise *in silico*.

Testes *in silico* devem ser realizados para comprovar a disparidade entre o *primer* senso Início e a sequência alvo, e para mostrar que os *primers* do ensaio LN34 Pan-Lyssavirus são capazes de anelar na região de interesse mesmo com alta variabilidade genética.

Já utilizando o ensaio LN34 Pan-Lyssavirus na técnica de PCR em tempo real *one-step*, todas as amostras apresentaram resultado verdadeiro positivo. Além do mais, quando as amostras que obtiveram resultado falso-negativo na técnica RT-qPCR *two-steps* (Quadro 9; Quadro 10) foram testadas na PCR em tempo real em uma etapa com ensaio LN34 Pan-Lyssavirus, todas apresentaram resultado verdadeiro positivo. A confirmação da positividade nessas amostras pode ser explicada por conta da transcrição reversa ser realizada com os mesmos *primers* utilizados na detecção da técnica de PCR em tempo real.

O ensaio LN34 Pan-Lyssavirus apresenta dois *primers* senso (Quadro 7), o que confere ao ensaio dois fragmentos diferentes durante a reação em cadeia da polimerase, o que pode auxiliar no anelamento do oligonucleotídeos iniciadores com amostras que apresentam maior variabilidade genética no início do genoma. Quando comparados com o *primer* senso Início utilizado para a transcrição reversa no item 3.2.2 (Quadro 2), é possível observar que, além do diferente número de bases (*primer* senso Início apresenta 22 bases, enquanto os *primers* senso LN34 1 e LN34 2 apresentam 24 e 25 bases, respectivamente), na vigésima base dos *primers* senso Início e LN34 2 existe degeneração, porém o primeiro apenas é degenerado para as bases A e G, enquanto que o segundo é degenerado para as bases A, G e T.

De forma geral, a técnica RT-qPCR *one-step* com o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* recomendada pela OMS para diagnóstico da raiva, foi capaz de detectar as diferentes variantes antigênicas e linhagens genéticas do RABV presentes no Brasil. Todas as amostras positivas foram detectadas com sucesso, sugerindo que esta técnica seja capaz de detectar universalmente até as amostras de RABV extremamente polimórficas do ponto de vista genético, como, por exemplo, aquelas isolados em diferentes espécies de morcegos insetívoros.

Além da parte de análise genética, estudos comparativos de sensibilidade e especificidade diagnóstica devem ser realizados com o intuito de verificar o desempenho da técnica de RT-qPCR *one-step* com o ensaio LN34 em relação ao padrão ouro imunofluorescência direta (IFD). Além disso, faz-se necessário avaliar a performance deste ensaio em relação a sensibilidade e especificidade analítica, estimando o limiar de detecção desta reação para definir a quantidade mínima de cópias de ácido nucleico detectável, associado com a capacidade de detectar exclusivamente as espécies do gênero *Lyssavirus*, descartando outros agentes causadores de encefalites (como por exemplo, vírus da cinomose e da encefalite equina). A partir dos resultados obtidos dessas análises, vai ser possível inferir, de modo mais definitivo, se o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* poderia ser ou não utilizado com uma prova confirmatória à IFD no Brasil.

No presente estudo, o ensaio em questão foi validado utilizando amostras animais para diagnóstico da raiva incluindo tecido encefálico *post-mortem* e amostras isoladas em sistema nervo central de camundongos. Seria necessário, também, validar outras amostras, a saber: 1) *ante-mortem* humano, tais quais folículo piloso, saliva (coletada de modo seriado) e líquido cefalorraquidiano; 2) amostras encefálicas humanas *post-mortem*; 3) amostras de SNC, positivas para raiva, fixadas em formalina provenientes de blocos parafinados que poderiam ser utilizados em estudos retrospectivos (CONDORI et al., 2020); 4) amostras de SNC, positivas para raiva, conservadas em cartão FTA.

---

CONCLUSÕES

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que:

- a) A técnica de RT-qPCR *one-step* com ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus*, recomendada pela OMS para diagnóstico da raiva, apresentou um caráter universal na detecção de diferentes linhagens genéticas e variantes antigênicas brasileiras do RABV.
- b) A RT-qPCR *two-steps* com ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* também foi capaz de detectar diferentes linhagens genéticas e variantes antigênicas brasileiras do RABV. No entanto, observou-se, em algumas amostras, diminuição da sensibilidade em relação a técnica de RT-qPCR *one-step*, gerando resultado falso-negativo.
- c) A técnica de RT-qPCR com ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus*, em especial o tipo *one-step*, demonstrou potencial para ser utilizado como prova confirmatória à IFD para o diagnóstico da raiva no Brasil. Contudo, estudos adicionais são necessários para conclusões definitivas.



## REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; MALAGA-ALBA, A. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U. (Eds.). **Natural History of Vampire Bats**. 1. ed. [s.l.: s.n.]. p. 207–214, 1988.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Rabies. In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Eds.). . **Zoonoses and Communicable Disases Commom to Man and Animals**. 3rd. ed. [s.l.: s.n.]. p. 246–275, 2003.

ALBAS, A. et al. Os morcegos e a raiva na região oeste do Estado de São Paulo. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, 2011.

ALBERTINI, A. A. V.; RUIGROK, R. W. H.; BLONDEL, D. Rabies Virus Transcription and Replication. In: **Advances in Virus Research**. [s.l.] Elsevier. p. 1–22, 2011.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real Time PCR Handbook 2.0**. 2020. Disponível em: <[https://rise.articulate.com/share/CzJ69zEmF4MgocDs26iDJscAyM-xxAt-#/>](https://rise.articulate.com/share/CzJ69zEmF4MgocDs26iDJscAyM-xxAt-#/). Acesso em: fevereiro de 2021.

ARAUJO, J. L. et al. Aspectos histopatológicos e imonu-histoquímicos da raiva em raposas *Cercopithecus thomasi*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, 2014.

BANYARD, A. C. et al. Bats and Lyssaviruses. In: **Advances in Virus Research**. [s.l.] Elsevier, p. 239–289, 2011.

BLACK, E. M. et al. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. **Journal of Virological Methods**, v. 105, n. 1, p. 25–35, 2002.

BONES, V. C. et al. Comparative Costs of the Mouse Inoculation Test (MIT) and Virus Isolation in Cell Culture (VICC) for Use in Rabies Diagnosis in Brazil. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 43, n. 2, p. 81–87, 2015.

BRASIL. **Raiva**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br>>. Acesso em: fevereiro 2021.

BURRELL, J. C.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. Rhabdoviruses. In: BURRELL,



J. C.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. (Eds.). **Fenner and White's Medical Virology**. 5. ed. [s.l.] Academic Press, p. 383–394, 2017.

CAMPOS, A. C. DE A. et al. One-step protocol for amplification of near full-length cDNA of the rabies virus genome. **Journal of Virological Methods**, v. 174, n. 1–2, p. 1–6, 2011.

CARINI, A. Sur une grande épizootie de rage. **Ann de L'Inst Pasteur**, v. 25, p. 843–846, 1911.

CASTILHO, J. G. et al. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, p. 1–7, 2007.

CDC. **Amplification methods**, 2011. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/amplification\\_methods.html](https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/amplification_methods.html)>. Acesso em março de 2021.

CENTOAMORE, N. H. F. et al. Análise crítica do desempenho do isolamento viral em células como método substitutivo ao isolamento viral em camundongos no diagnóstico da raiva. In: **revista da sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório**. Porto Alegre - RS: 14º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório e 3º Encontro Latino Americano de Ciências em Animais de Laboratório, v. 4p. 68–69, 2016.

CENTOAMORE, N. H. F. **Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

CENTOAMORE, N. H. F. et al. Comparison of five different laboratory techniques for the rabies diagnosis in clinically suspected cattle in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 283, 2020.

CONDORI, R. E. et al. Using the LN34 Pan-Lyssavirus Real-Time RT-PCR Assay for Rabies Diagnosis and Rapid Genetic Typing from Formalin-Fixed Human Brain Tissue. **Viruses**, v. 12, n. 1, 2020.

CORONA, T. F. et al. Comparative analysis of Mouse Inoculation Test and Virus Isolation in Cell Culture for rabies diagnosis in animals of Parana, Brazil. **Revista**

da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 1, p. 39–43, 2018.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The Fluorescent Antibody Test. In: **Laboratory Techniques in Rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization (WHO), p. 88–95, 1996.

DIAZ, A.-M. et al. Antigenic Analysis of Rabies-virus Isolates from Latin America and the Caribbean. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 41, n. 1–10, p. 153–160, 1994.

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

GALHARDO, J. A. et al. Canine Rabies in the Brazil-Bolivia Border Region from 2006 to 2014. **Annals of Global Health**, v. 85, n. 1, 2019.

GAUDIN, Y. et al. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 182, n. 2, p. 627–632, 1992.

GIGANTE, C. M. et al. Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for postmortem rabies diagnostics. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, 2018.

GONÇALVES, N. S.; SOARES, P. S.; SANTOS, D. C. O panorama epidemiológico geral da raiva humana no Brasil com foco principal na região sul do país nos últimos anos. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 3, p. 268–275, 2018.

GREEN, M. R. Molecular cloning: a laboratory manual. In: GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. (Eds.). **Molecular cloning: a laboratory manual**. Fourth ed. [s.l.: s.n.]. p. 1890–1890, 2012.

HANLON, C. A.; NADIN-DAVIS, S. A. Laboratory Diagnosis of Rabies. In: JACKSON, A. C. (Ed.). **Rabies: scientific basis of the disease and its management**. 3. ed. [s.l.] Academic Press, p. 409–459, 2013.

HAYMAN, D. T. S. et al. A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 177, n. 1, p. 87–93, 2011.

HEALY, D. M.; BANYARD, A. C.; FOOKS, A. R. Rhabdoviruses. In: GREENWOOD,

D. et al. (Eds.). **Medical Microbiology**. 8. ed. [s.l.] Churchill Livingstone, p. 594–601, 2012.

HEATON, P. R. et al. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2762–2766, 1997.

HOFFMANN, B. et al. Improved safety for molecular diagnosis of classical rabies viruses by use of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR “double check” strategy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 3970–3978, 2010.

HU, S. C. et al. Lyssavirus in Japanese pipistrelle, Taiwan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 782–785, 2018.

HUGHES, G. J. et al. Evaluation of a TaqMan PCR Assay to Detect Rabies Virus RNA: Influence of Sequence Variation and Application to Quantification of Viral Loads. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 299–306, 2004.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: fevereiro de 2021.

INVITROGEN. **SuperScript™ II Reverse Transcriptase**. Disponível em: <[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/superscriptII\\_pps.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/superscriptII_pps.pdf)> Acesso em: abril de 2021.

JACKSON, A. C. Rabies. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 123, p. 601–618, 2014.

JOHNSON, N. et al. Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3–4, p. 151–159, 2010.

KISSI, B. et al. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 8, p. 2041–2050, 1999.

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

KOTAIT, I. et al. Non-human primates as a reservoir for rabies virus in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 1, p. 47–59, 2019.

KUZMIN, I. V. Basic Facts about Lyssaviruses. In: RUPPRECHT, C. E.;

- NAGARAJAN, T. (Eds.). **Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention**. [s.l.] Academic Press, p. 3–21, 2015.
- KUZMIN, I. V.; RUPPRECHT, C. E. Rabies Virus. In: **Encyclopedia of Virology**. 4. ed. Winnipeg, Canada: Elsevier, p. 367–373, 2008.
- LÉCHENNE, M. et al. Validation of a Rapid Rabies Diagnostic Tool for Field Surveillance in Developing Countries. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1–16, 2016.
- MACEDO, C. I. et al. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, 2006.
- MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. **Fenner's Veterinary Virology**. 5. ed. [s.l.] Elsevier, 2017.
- MENOZZI, B. D. et al. No TitleAntigenic and genotypic characterization of rabies virus isolated from bats (Mammalia: Chiroptera) from municipalities in São Paulo State, Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, n. 5, p. 1201–1209, 2017.
- MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M. An Overview of Laboratory Techniques in the Diagnosis and Prevention of Rabies and in Rabies Research. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 4. ed. [s.l.] World Health Organization, p. 9–27, 1996.
- MORI, E. Raiva. In: VERONESI-FOCACCIA (Ed.). **Tratado de Infectologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, p. 937–964, 2020.
- NOKIREKI, T. et al. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 3, p. 593–596, 2018.
- OIE. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 8. ed. Genova: [s.n.]. p. 578–612, 2018.
- OKUMURA, A.; HARTY, R. N. Rabies Virus Assembly and Budding. In: **Advances in Virus Research**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., v. 79p. 23–32, 2011.
- OLIVEIRA, R. DE N. et al. Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the

diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**, v. 405, n. 2, p. 352–360, 2010.

OLIVEIRA, R. N. et al. Rabies virus diversification in aerial and terrestrial mammals. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. 1–12, 2020.

ORCIARI, L. A. et al. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v. 19, n. 31, 2001.

ORŁOWSKA, A. et al. Comparison of real-time pcr and heminested rt-pcr methods in the detection of rabies virus infection in bats and terrestrial animals. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 52, n. 3, p. 313–318, 2008.

PAYNE, S. Family Rhabdoviridae. In: **Viruses**. [s.l.] Academic Press, p. 165–172, 2017.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. Fifth ed. Geneva: World Health Organization (WHO), v. 1, 2018.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. Rabies real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. In: RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. Fifth ed. Laboratory techniques in rabies: World Health Organization (WHO), v. 2, p. 17–34, 2019.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 327–343, 2002.

RUPPRECHT, C.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. Lyssaviruses and rabies : current conundrums , concerns , contradictions and controversies [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status : v. 6, n. 0, p. 1–22, 2017.

SCHEFFER K.C. Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leadh, 1821) por meio de RT-PCR, hemi – nestedRT-PCR e Real Time RT-PCR. Tese de doutorado da FMVZ-USP. São Paulo, 145f, 2011.

SCHNELL, M. J. et al. The cell biology of rabies virus: Using stealth to reach the brain. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 51–61, 2010.

SIGMA-ALDRICH. **Sigma-Aldrich**. Disponível em:

<<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/black-hole->

quenchers.html>. Acesso em: fevereiro de 2021a.

SIGMA-ALDRICH. **Sigma-Aldrich**. Disponível em:

<<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/locked-nucleic-acids-faq.html>>. Acesso em: fevereiro de 2021b.

SILVA, R. A.; RIVELLO, G. V.; NILSSON, M. R. Isolamento do vírus rábico de morcego não hematófago da espécie *Phyllostomus hastatus hastatus* (Pallas). **Arq Inst Bio Anim**, v. 4, p. 115–120, 1961.

SILVA, S. R. et al. **Biotechnology advances: A perspective on the diagnosis and research of rabies virus** *Biologicals*, 2013.

SOARES, R. M. et al. A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 109–111, 2002.

SODRÉ, M. M.; GAMA, A. R.; ALMEIDA, M. F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, n. 2, 2010.

VARGAS, A.; ROMANO, A. P. M.; MERCHÁN-HAMANN, E. Raiva humana no Brasil: estudo descritivo, 2000-2017\*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 28, n. 2, 2019.

WACHARAPLUESADEE, S. et al. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n. 2, p. 317–320, 2008.

WACHARAPLUESADEE, S.; HEMACHUDHA, T. Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 2, p. 207–218, 2010.

WACKER, M. J.; GODARD, M. P. Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR Using SuperScript III. **Journal of Biomolecular Techniques**, p. 266–271, 2005.

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

WADHWA, A. et al. A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2017.

WAKELEY, P. R. et al. Development of a real-time, differential RT-PCR TaqMan® assay for lyssavirus genotypes 1, 5 and 6. **Developments in Biologicals**, v. 126, n. 6, p. 227–236, 2006.

WEIR, D. L. et al. Recent observations on Australian bat lyssavirus tropism and viral entry. **Viruses**, v. 6, n. 2, p. 909–926, 2014.

WHO. **WHO expert consultation on rabies: third report**. Geneva: [s.n.], 2018.

WUNNER, W. H.; CONZELMANN, K. Rabies. In: FOOKS, A. R.; JACKSON, A. C. (Eds.). **Rabies Virus**. 4. ed. [s.l.] Elsevier, p. 43–81, 2020.





ANEXO A – Relação das amostras clínicas utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
170108006896	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Uruburetama - CE
180108001687	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
180108002006	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Hortolândia - SP
180108003214	<i>T. brasiliensis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Tadarida</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Americana - SP
180108003769	<i>N. laticaudatus</i>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Campo Grande - MS
180108004456	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Lasiurus</i> spp.	Sequenc.	Mandaguaçu - PR
180108004458	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Lasiurus</i> spp.	Sequenc.	Toledo - PR
180108004461	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp.	Sequenc.	Foz do Iguaçu - MS
180108004467	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp.	Sequenc.	Foz do Iguaçu - MS
180108004496	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp.	Sequenc.	Bituruna - PR
180108004498	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	Imbituva - PR
180108004568	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Belo Horizonte - MG
180108004818	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Limoeiro do Norte - CE
180108004822	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Limoeiro do Norte - CE
180108004849	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Quixeré - CE
180108004850	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Camocim - CE
180108004854	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Ibiapina - CE
180108004888	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Aquiraz - CE
180108004890	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Ibiapina - CE
180108004892	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Molossus</i> spp.	Sequenc.	Araçatuba - SP
180108004962	<i>M. nigricans</i>	positivo	negativo	positivo	<i>Myotis</i> spp.	Sequenc.	Votuporanga - SP
180108005298	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Natal - RN
180108005305	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Taipu - RN
180108005306	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Guamaré - RN
180108005309	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Presidente Juscelino - MG
180108005310	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Parnamirim - RN
180108005376	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Natal - RN
180108005380	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Serra talhada - PB
181733000107	<i>M. albescens</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
181733000138	<i>M. nigricans</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; \*material em autólise; \*\*: positivo apenas no tronco encefálico; NT: sem resultado; #animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger; +: rara presença de antígenos; ++: pouca inclusão e presença de campos negativos; +++: distribuição homogênea de inclusões com presença de campos negativos; ++++: distribuição homogênea de inclusões.

ANEXO A [Cont.] – Relação das amostras clínicas utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
181733000306	<i>M. nigricans</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
181733000535	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
182410000306	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
182410000325	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
182410000357	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
182410000364	<i>A. planirostris</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ribeirão Preto - SP
182410000404	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
182410000434	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
182410000435	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ribeirão Preto - SP
182410000485	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
182410000536	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	NT	NT	-	Ribeirão Preto - SP
182410000719	<i>A. planirostris</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ribeirão Preto - SP
182410001421	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
190108000288	<i>M. albescens</i>	positivo	negativo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Holambra - SP
190108000300	Bovino	positivo+	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Socorro - SP
190108000302	Equino	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	São José dos Campos - SP
190108000311	Bovino	positivo+	negativo	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Guareí - SP
190108000735	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Teresina - PI
190108000736	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Teresina - PI
190108000831	Sagui	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	Toledo - PR
190108000834	Sagui	NT	NT	positivo	<i>Lasiurus</i> spp.	Sequenc.	Curitiba - PR
190108000838	Sagui	NT	NT	positivo	<i>Myotis</i> spp.	Sequenc.	Curitiba - PR
190108000839	Sagui	NT	NT	positivo	<i>Histiotus</i> spp.	Sequenc.	Rio Bonito do Iguaçú - PR
190108000846	Sagui	NT	NT	positivo	<i>Lasiurus</i> spp.	Sequenc.	Curitiba - PR
190108000999	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itapetininga - SP
190108001044	Bovino	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itaberá - SP
190108001094	<i>T. brasiliensis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Tadarida</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	São Bernardo do Campo - SP
190108001162	Equino	positivo	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Tietê - SP
190108001370	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	Brumadinho - MG
190108001396	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; \*material em autólise; \*\*: positivo apenas no tronco encefálico; NT: sem resultado; #animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger; +: rara presença de antígenos; ++: pouca inclusão e presença de campos negativos; +++: distribuição homogênea de inclusões com presença de campos negativos; ++++: distribuição homogênea de inclusões.

ANEXO A [Cont.] – Relação das amostras clínicas utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
190108001407	<i>M. albescens</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Tadarida</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Mogi das Cruzes - SP
190108001428	Equino	positivo	NT	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Porto Feliz - SP
190108001429	Equino	positivo	NT	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Porto Feliz - SP
190108001430	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Porto Feliz - SP
190108001437	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108001512	Equino	positivo++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Tietê - SP
190108001543	Bovino	positivo++++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108001573	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Nova Campina - SP
190108001626	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itararé - SP
190108001630	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108001732	<i>D. rotundus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Cerquilha - SP
190108001792	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Tietê - SP
190108001868	Bovino	positivo+++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itapetininga - SP
190108001965	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Joanópolis - SP
190108001997	Bovino	positivo+	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108001998	Bovino	positivo++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108002001	Equino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Araçariguama - SP
190108002013	Bovino	positivo+++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Tietê - SP
190108002069	Ovino	positivo+++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002070	<i>D. rotundus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002116	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Teresina - PI
190108002129	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itararé - SP
190108002132	Canídeo	positivo+++	positivo	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Cesário Lange - SP
190108002179	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Joanópolis - SP
190108002181	Bovino	positivo+++	inconclusivo	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002206	Bovino	positivo+	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Porto Feliz - SP
190108002226	Equino	positivo+**	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Eloi Mendes -MG
190108002260	Ovino	positivo+	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002261	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002267	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; \*material em autólise; \*\*: positivo apenas no tronco encefálico; NT: sem resultado; #animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger; +: rara presença de antígenos; ++: pouca inclusão e presença de campos negativos; +++: distribuição homogênea de inclusões com presença de campos negativos; ++++: distribuição homogênea de inclusões.

ANEXO A [Cont.] – Relação das amostras clínicas utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
190108002291	Bovino	positivo+	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Porto Feliz - SP
190108002292	Bovino*	positivo+++	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002295	Bovino	positivo++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002296	Bovino	positivo+	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002306	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108002320	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itaóca - SP
190108002341	<i>E. glauciuns</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Lasiurus spp.</i> <sup>2</sup>	Sequenc.	Tietê - SP
190108002387	Bovino	positivo++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002415	<i>A. lituratus</i>	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itapira - SP
190108002420	Ovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002421	Bovino	positivo++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002422	Bovino	positivo+	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108002427	Equino	positivo+	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002502	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Cerquilha - SP
190108002511	Bovino	positivo+++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108002512	Bovino	positivo++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108002514	Equino	positivo	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Joanópolis - SP
190108002516	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Cerquilha - SP
190108002519	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Lasiurus spp.</i>	Sequenc.	Foz do Iguaçu - MS
190108002520	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida spp.</i>	Sequenc.	Curitiba - PR
190108002529	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida spp.</i>	Sequenc.	Curitiba - PR
190108002541	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Limoeiro do Norte - CE
190108002543	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Ibiapina - CE
190108002546	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Cerquilha - SP
190108002549	Bovino	positivo+	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002550	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002561	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108002622	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	São João da Boa Vista - SP
190108002682	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Santa Isabel - SP
190108002683	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Cerquilha - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; \*material em autólise; \*\*: positivo apenas no tronco encefálico; NT: sem resultado; #animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger; +: rara presença de antígenos; ++: pouca inclusão e presença de campos negativos; +++: distribuição homogênea de inclusões com presença de campos negativos; ++++: distribuição homogênea de inclusões.

ANEXO A [Cont.] – Relação das amostras clínicas utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
190108002737	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002739	Ovino	positivo++++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002766	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	São João da Boa Vista - SP
190108002854	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Cariré - CE
190108002878	Sagui	NT	NT	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Eusébio - CE
190108002967	Equino	positivo++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108002969	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108003082	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Jarinu - SP
190108003084	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108003085	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108003100	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Santa Isabel - SP
190108003309	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Cerquilha - SP
190108003311	<i>D. rotundus</i>	positivo++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108003315	Bovino*	positivo+++	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108003318	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Joanópolis - SP
190108003390	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	São João da Boa Vista - SP
190108003471	Gato	positivo++++	positivo	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Ourinhos - SP
190108003476	Bovino*	positivo+	negativo	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Salesópolis - SP
190108003477	Bovino	positivo+++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108003525	Bovino	positivo+++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Timburi - SP
190108003537	Equino	positivo++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Nova Campina - SP
190108003609	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Socorro - SP
190108003623	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108003624	Ovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108003649	Sagui	positivo+++	positivo	positivo	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Teresina - PI
190108003688	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	São João da Boa Vista - SP
190108003783	Equino	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Taubaté - SP
190108003804	Bovino	positivo+	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Socorro - SP
190108003811	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Paulínia - SP
190108003824	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	São João da Boa Vista - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; \*material em autólise; \*\*: positivo apenas no tronco encefálico; NT: sem resultado; #animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger; +: rara presença de antígenos; ++: pouca inclusão e presença de campos negativos; +++: distribuição homogênea de inclusões com presença de campos negativos; ++++: distribuição homogênea de inclusões.

ANEXO A [Cont.] – Relação das amostras clínicas utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
190108003834	Bovino	positivo++	inconclusivo	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itaberá - SP
190108003911	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Alambari - SP
190108003913	Bovino	positivo+++	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Alambari - SP
190108003953	<i>A. lituratus</i>	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Sertãozinho - SP
190108003973	Equino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Porto Feliz - SP
190108004011	Equino	positivo+	positivo	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Indaiatuba - SP
190108004047	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Joanópolis - SP
190108004072	Ovino	pos++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108004090	Bovino	pos++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itapetininga - SP
190108004110	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ibiúna - SP
190108004229	Bovino	positivo++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Jarinu - SP
190108004268	Bovino	positivo++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Porto Walter - AC
190108004315	Ovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108004345	Bovino	positivo++++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Santa Isabel - SP
190108004456	Equino	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itapetininga - SP
190108004458	<i>L. blossevillii</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Lasiurus spp.</i> <sup>2</sup>	Sequenc.	Itapetininga - SP
190108004491	Gato	positivo	negativo	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Mococa - SP
190108004492	Cão	positivo	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Mococa - SP
190108004704	<i>D. rotundus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Santa Isabel - SP
190108004729	Bovino	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108004730	Bovino	positivo	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108004732	<i>D. rotundus</i>	positivo	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Salesópolis - SP
190108004790	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Histiotes spp.</i>	Sequenc.	Uberlândia - MG
190108004999	Bovino	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Itaberá - SP
190108005206	Equino	positivo+ <sup>**</sup>	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Taubaté - SP
190108005269	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops spp.</i>	Sequenc.	Sobral - CE
190108005270	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Sobral - CE
191733000130	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus spp.</i> <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
191733000142	<i>M. nigricans</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Myotis spp.</i> <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
191733000341	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; \*material em autólise; \*\*: positivo apenas no tronco encefálico; NT: sem resultado; #animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger; +: rara presença de antígenos; ++: pouca inclusão e presença de campos negativos; +++: distribuição homogênea de inclusões com presença de campos negativos; ++++: distribuição homogênea de inclusões.

ANEXO A [Cont.] – Relação das amostras clínicas utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
191733000341	<i>A. lituratus</i>	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733000408	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
191733000421	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733000439	<i>E. furinalis</i>	positivo	NT	NT	NT	-	Campinas - SP
191733000463	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
191733000614	<i>E. furinalis</i>	positivo	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
191733000687	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733000749	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>D. rotundus</i> <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
191733000773	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733000860	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733000941	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733001375	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
192410000301	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	NT	NT	-	Ribeirão Preto - SP
192410000310	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
192410000335	<i>N. laticaudatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
192410000477	<i>A. lituratus</i>	positivo+++	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ribeirão Preto - SP
192410000569	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ribeirão Preto - SP
192410000587	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ribeirão Preto - SP
192410000636	<i>A. lituratus</i>	positivo+++	negativo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ribeirão Preto - SP
192410000765	<i>N. laticaudatus</i>	positivo+	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
200108000099	Capivara	positivo	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Ubatuba - SP
200108000121	Equino	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Taubaté - SP
200108000463	Capivara	positivo	positivo	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Ubatuba - SP
200108000464	Capivara	positivo	positivo	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Ubatuba - SP
200108002394	Sagui	NT	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Inhumas - GO
200108002429	Lobo Guará	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp.	Sequenc.	Catanduva - SP
200108002691	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Patos de Minas - MG
200108002692	Cervo	NT	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Juiz de Fora - MG
200108002722	Cão	NT	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Pérola - PR
201733000495	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; \*material em autólise; \*\*: positivo apenas no tronco encefálico; NT: sem resultado; #animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger; +: rara presença de antígenos; ++: pouca inclusão e presença de campos negativos; +++: distribuição homogênea de inclusões com presença de campos negativos; ++++: distribuição homogênea de inclusões.





ANEXO B – Relação das amostras isoladas em sistema nervoso de camundongo utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
5412-v/2007	Cão	NT	NT	NT	AgV2	IFI	Recife - PE
1723-v/2008	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Recife – PE
3465-v/2008	Cão	NT	NT	NT	AgV1	IFI	Corumbá – MS
4105-v/2008	Cão <sup>1</sup>	NT	NT	positivo	AgV2	Sequenc.	Panelas – PE
7008-v/2008	Cão	NT	NT	NT	AgV1	IFI	Corumbá – MS
9915-v/2008	Cão	NT	NT	NT	AgV2	IFI	Juarez Távora – PB
7846-v/2009	Cão	NT	NT	NT	Agv2	IFI	Ouricuri – PE
7855-v/2009	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Ouricuri – PE
7857-v/2009	Gato	NT	NT	NT	Agv2	IFI	João Alfredo – PE
5048-v/2010	Gato do mato	NT	NT	NT	Agv2	IFI	Mirandiba – PE
5053-v/2010	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salgueiro – PE
1081-v/2011	Cão <sup>1</sup>	NT	NT	positivo	AgV2	Sequenc.	Serra de São Bento – RN
4955-v/2012	Cão <sup>1</sup>	NT	NT	positivo	AgV1	Sequenc.	Corumbá – MS
5981-v/2012	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Eldorado do Sul – RS
2309-v/2013	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Belo Horizonte – MG
2352-v/2013	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	NT	-	Natal – RN
3418-v/2013	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Histiotes</i> spp.	Sequenc.	Cambé – PR
4039-v/2013	Cão	NT	NT	positivo	AgV2	Sequenc.	Humberto de Campos – MA
4040-v/2013	Felino	NT	NT	positivo	AgV2	Sequenc.	São Luís – MA
4041-v/2013	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Alto Alegre do Maranhão – MA
5121-v/2013	Morcego <sup>#</sup>	positivo	positivo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto – SP
5173-v/2013	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Campinas – SP
5309-v/2013	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Myotis</i> spp.	Sequenc.	Campinas – SP
6296-v/2013	Guaxinim	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Amontada – CE
6300-v/2013	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Amontada – CE
1288-v/2014	Morcego <sup>#</sup>	positivo	NT	positivo	<i>Myotis</i> sp	Sequenc.	Caraguatatuba – SP
2773-v/2014	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salgado – SE
3333-v/2014	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
3335-v/2014	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
3337-v/2014	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; IFI: Imunofluorescência indireta; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; NT: sem resultado; <sup>1</sup>: amostras que também apresentam resultado de tipificação antigênica pela técnica de IFI; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger <sup>#</sup>animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV.

ANEXO B [Cont.] – Relação das amostras isoladas em sistema nervoso de camundongo utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
4183-v/2014	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Fortaleza – CE
4184-v/2014	Raposa	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Fortaleza – CE
141-v/2015	Morcego <sup>1#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Caicó – RN
1057-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
1059-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
1064-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Histiotus</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
1068-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Histiotus</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
1174-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	AgV1	Sequenc.	Corumbá – MS
1175-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	AgV1	IFI	Corumbá – MS
1176-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	AgV1	IFI	Corumbá – MS
1277-v/2015	Cão <sup>1</sup>	NT	NT	positivo	AgV1	Sequenc.	Ladário – MS
1313-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
1439-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	Belo Horizonte – MG
1448-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	AgV1	Sequenc.	Corumbá – MS
1592-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Lasiurus</i> spp.	Sequenc.	Belo Horizonte – MG
2551-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Fortaleza – CE
2912-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Quixeré – CE
2914-v/2015	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Jaguaribe – CE
2915-v/2015	Gato	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Tabuleiro do Norte – CE
3662-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
3665-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Histiotus</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
3670-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
4265-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
4266-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
4267-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
4269-v/2015	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
4272-v/2015	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
4274-v/2015	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
4276-v/2015	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
4278-v/2015	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; IFI: Imunofluorescência indireta; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; NT: sem resultado; <sup>1</sup>: amostras que também apresentam resultado de tipificação antigênica pela técnica de IFI; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger <sup>#</sup>animal sem resultado da técnica de morfometria; <sup>&</sup>: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV.

ANEXO B [Cont.] – Relação das amostras isoladas em sistema nervoso de camundongo utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
4280-v/2015	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
4283-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Salvador – BA
4284-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Salvador – BA
4285-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Tadarida</i> spp.	Sequenc.	Salvador – BA
4286-v/2015	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Salvador – BA
752-v/2016	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
753-v/2016	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp.	Sequenc.	São José dos Pinhais – PR
997-v/2016	Cão	NT	NT	positivo	AgV1	Sequenc.	Campo Grande – MS
1510-v/2016	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Lasiurus</i> spp.	Sequenc.	Corumbá – MS
1542-v/2016	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Tabuleiro do Norte – CE
1925-v/2016	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Serra Negra do Norte – RN
1926-v/2016	Cão	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Araripina – PE
1933-v/2016	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Retirolândia – BA
1935-v/2016	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Senador Elói de Souza – RN
1937-v/2016	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Salvador – BA
1972-v/2016	Cão	NT	NT	positivo	AgV2	Sequenc.	São Luís - MA
2237-v/2016	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Tabuleiro do Norte - CE
3347-v/2016	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Salvador - BA
3348-v/2016	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Salvador - BA
3350-v/2016	Caprino	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Retirolândia - BA
3352-v/2016	Bovino	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Retirolândia – BA
180108004599	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Estrela D'Oeste - SP
180108005502	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	São Bernardo do Campo - SP
181733000703	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
181733000704	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Campinas - SP
190108001294	<i>M. albescens</i>	positivo	NT	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Limeira - SP
190108001297	<i>M. nigricans</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Limeira - SP
190108001405	<i>E. furinalis</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Mogi das Cruzes - SP
190108001538	<i>D. rotundus</i>	positivo	NT	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Boituva - SP
190108001609	<i>M. nigricans</i>	positivo	negativo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	São João da Boa Vista - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; IFI: Imunofluorescência indireta; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; NT: sem resultado; <sup>1</sup>: amostras que também apresentam resultado de tipificação antigênica pela técnica de IFI; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger <sup>#</sup>animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV.

ANEXO B [Cont.] – Relação das amostras isoladas em sistema nervoso de camundongo utilizadas durante o estudo, mostrando resultados das técnicas de IFD, IVCC e PCR, a respectiva tipificação e técnica utilizada, além da procedência de cada uma.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	PCR	Tipificação	Técnica <sup>&amp;</sup>	Procedência
190108002364	<i>N. macrotis</i>	positivo	positivo	NT	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Campo Grande - MS
190108002366	<i>N. macrotis</i>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Campo Grande - MS
190108002412	Raposa	NT	NT	positivo	<i>C. thous</i>	Sequenc.	Ouricuri - PE
190108002424	Sagui	positivo	NT	NT	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Salvador - BA
190108002425	Sagui	positivo	NT	NT	<i>C. jacchus</i>	Sequenc.	Mirandiba - PE
190108002678	<i>M. nigricans</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ilhabela - SP
190108002724	Sagui	NT	positivo	NT	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Fortaleza - CE
190108002949	Morcego <sup>#</sup>	positivo	positivo	NT	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Varginha - MG
190108002950	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Varginha - MG
190108002952	Gato	NT	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Itaú de Minas - MG
190108003245	Morcego <sup>#</sup>	NT	NT	positivo	<i>Lasiurus</i> spp.	Sequenc.	Campo Grande - MS
190108003248	Morcego <sup>#</sup>	positivo	positivo	NT	<i>Nyctinomops</i> spp.	Sequenc.	Belo Horizonte - MG
190108003249	<i>D. rotundus</i>	NT	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Belo Horizonte - MG
190108003250	<i>D. rotundus</i>	NT	NT	positivo	<i>D. rotundus</i>	Sequenc.	Belo Horizonte - MG
190108003648	<i>E. furinalis</i>	positivo	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Indaiatuba - SP
190108004828	<i>M. nigricans</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Amparo - SP
191733000727	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733000733	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733000778	<i>A. lituratus</i>	positivo	positivo	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
191733000940	<i>A. lituratus</i>	positivo	NT	NT	<i>D. rotundus</i>	RT-qPCR	Campinas - SP
192410000418	<i>H. velatus</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Histiotus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
192410000668	<i>E. furinalis</i>	positivo	NT	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Ribeirão Preto - SP
200108000786	<i>M. albescens</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Myotis</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Jacareí - SP
200108001270	<i>M. albescens</i>	positivo	positivo	positivo	<i>Eptesicus</i> spp. <sup>2</sup>	Sequenc.	Jacareí - SP

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: Inoculação viral em cultivo celular; IFI: Imunofluorescência indireta; Sequenc.: Sequenciamento; PCR: Reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real; NT: sem resultado; <sup>1</sup>: amostras que também apresentam resultado de tipificação antigênica pela técnica de IFI; <sup>2</sup>: amostras sequenciadas no presente estudo pelo método de Sanger <sup>#</sup>animal sem resultado da técnica de morfometria; &: técnica utilizada para determinação da variante antigênica ou linhagem genética do RABV.



	10	20	30	40
Pasteur Virus	ACGCTTAA	CAACCAGATCAAAG	AAAAAACAGACAGCGT	CAATGGC
7855-v/2009				
5053-v/2010				
1081-v/2011				
3337-v/2014				
4183-v/2014				
4184-v/2014				
141-v/2015				
1064-v/2015				
1068-v/2015				
2551-v/2015				
2915-v/2015				
2237-v/2016				
181733000107				
180108001687				
181733000306				
182410000325				
182410000357				
182410000404				
182410000434				
182410000485				
182410001421				
190108005270				
191733000130				
191733000142				
191733000463				
191733000614				
191733000749				
192410000310				
192410000335				

Anexo C – Sequências nucleotídicas de algumas amostras que apresentaram resultado falso negativo quando testadas no item 4.3.1.1.

A região destacada em vermelho indica a região que deveria ser realizada a análise *in silico* para comprovar a existência de *mismatches* com o *primer* início e a região alvo.

Essas sequências estão alinhadas com a sequência completa do vírus fixo *Pasteur Virus* (número de acesso no GenBank: M13215.1).